

UNIVERZITET U BEOGRADU  
HEMIJSKI FAKULTET

Milica Đ. Selaković

**Razvoj novih inhibitora proliferacije  
parazita *Plasmodium falciparum* i  
malignih ćelija**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY

Milica Đ. Selaković

**Development of new inhibitors of  
parasite *Plasmodium falciparum* and  
malignant cells proliferation**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Članovi komisije:

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

---

dr Dragana Milić,  
redovni profesor Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta

---

dr Igor Opsenica,  
vanredni profesor Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta

---

dr Vlatka Vajs,  
naučni savetnik Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju  
Univerziteta u Beogradu

---

dr Tatjana Srdić-Rajić,  
naučni savetnik Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

---

---

Datum odbrane

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

*Svom profesoru, dr Bogdanu Šolaji, zahvaljujem se na pruženoj prilici da se bavim istraživačkim radom u podsticajnoj radnoj atmosferi. Hvala mu što me je naučio da se samo uz marljivost, samokritičnost i studioznost postižu vredni rezultati. Zahvaljujem mu se na ukazanom poverenju, posvećenosti i prenesenom znanju i iskustvu.*

*Zahvaljujem se dr Igoru Opsenici, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta, na velikodušnoj pomoći tokom izrade i upućenim savetima i podršci tokom pisanja ove disertacije.*

*Dr Dragani Milić, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta, zahvaljujem se na konstruktivnim diskusijama i dragocenim smernicama tokom pisanja ove disertacije.*

*Dr Vlatki Vajs, naučnom savetniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, zahvaljujem se na prihvatanju učešća u komisiji za ocenu i odbranu teze, stalnom interesovanju za tok istraživanja i korisnim sugestijama prilikom pisanja ovog rada.*

*Dr Tatjani Srdić-Rajić, naučnom savetniku Instituta za onkologiju i radiologiju, zahvaljujem se na učešću u komisiji za pregled i ocenu disertacije. Neizmerno joj hvala na izvođenju bioloških testova na ćelijama, predanosti i strpljivosti kojima mi nesebično prenosi znanje i veštine tokom naše višegodišnje saradnje i danas.*

*Naročito se zahvaljujem dr Mariji Mojsin i dr Aleksandru Paviću iz Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo na prijatnoj saradnji i izvođenju eksperimenata značajnih za celovitost ove disertacije. Dugujem im zahvalnost za iscrpne odgovore na moja mnogobrojna pitanja.*

*Dr Olgici Đurković-Đaković zahvaljujem se što je omogućila ispitivanje toksičnosti jedinjenja u Institutu za medicinska istraživanja, a dr Jeleni Srbljanović na izvođenju oglada. Zahvaljujem se i Nedi Bauman na korisnim uputstvima u vezi sa upotrebom medicinskih termina.*

*Dr Tatjani Verbić zahvaljujem se na eksperimentalnim rezultatima koji su upotpunili ovu disertaciju.*

*Dr Sandri Šegan zahvaljujem se na velikoj pomoći u savladavanju rukovanja instrumentom za tečnu hromatografiju.*

*Naročitu zahvalnost dugujem dragim kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu na brojnim spektralnim analizama i prijatnoj saradnji. Veliko hvala dr Dejanu Gođevcu, dr Milki Jadranin, dr Bobanu Anđelkoviću, dr Nini Todorović, Marini Todosijević, Dejanu Vučetiću, Ivani Sofrenić, Gordani Krstić, dr Ljubodragu Vujisiću, dr Miroslavu Novakoviću, dr Jovani Stanković i dr Mirjani Cvetković.*

*U laboratoriji 432 o profesionalnoj otmenosti sam godinama učila od dr Ivane Aljančić. Dragoj Ivani veliko hvala i na dobronamernosti i podstreku, posebno u momentima ključnim za privođenje kraju izrade ove disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Dejanu Opsenici koji je prepoznao i razvijao moj istraživački duh. Hvala mu na nebrojenim savetima i konstruktivnim diskusijama.*

*Zahvaljujem se kolegi Nikoli Pavloviću na divnoj saradnji tokom izrade njegovog diplomskog rada.*

*Mojim kolegama i prijateljima dr Nini Božinović, dr Jeleni Konstantinović, dr Jovani Periša, dr Nataši Terzić-Jovanović, Katarini Komatović, Miklošu Totu, Vuku Filipoviću, Vladimiru Ajdačiću, Jeleni Lazić, Mariji Vranić, Mariji Lazić, Dušanu Kolarskom i dr Miljanu Bigoviću hvala na velikodušnosti. Zadovoljstvo je učiti sa njima i od njih. Našoj Mirjani Živadinović hvala na ljubaznosti i druženju.*

*Zahvaljujem se svojim novim kolegama Andrei Nikolić, Stefanu Simiću, Ljiljani Koračak, Filipu Živkoviću, Aleksi Milosavljeviću i Pavlu Stojkoviću na vedrini i prijatnoj atmosferi u laboratorijama 432 i 524.*

*Svojim roditeljima i bratu zahvaljujem se na naporima koje su uložili kako bih se ja obrazovala. Porodici i prijateljima hvala na bezrezervnoj podršci.*

*Neizrecivu zahvalnost na snazi i inspiraciji dugujem svom suprugu i kolegi Životi.*

*Disertaciju posvećujem uspomeni na Viki, čije se istrajnosti setim u trenucima kada posustanem.*

## Naslov:

# Razvoj novih inhibitora proliferacije parazita *Plasmodium falciparum* i malignih ćelija

## Sažetak

Malarija spada u najrasprostranjenije parazitske bolesti na svetu. Širenje rezistencije parazita malarije prema dostupnim antimalaricima i potreba za efikasnijim delovanjem u više faza životnog ciklusa parazita, razlozi su za intenzivno istraživanje na polju iznalaženja novih potencijalnih lekova. U ovoj disertaciji prikazana je sinteza novih jedinjenja koja sadrže poznatu 4-aminohinolinsku farmakoforu, kao i rezultati ispitivanja njihove biološke aktivnosti u različitim fazama životnog ciklusa parazita malarije. Jedinjenje **38 (MVNP001)** se istaklo svojom izuzetnom aktivnošću u eritrocitnoj i sporozoitnoj fazi, a umerenom aktivnošću prema gametocitima u *in vitro* uslovima. Inhibitor proliferacije parazita u *in vitro* uslovima, nije toksičan prema zdravim miševima i embrionima zebra-ribica. U modelu eksperimentalne malarije na miševima, jedinjenje **38 (MVNP001)** dva puta produžava život inficiranih jedinki u poređenju sa kontrolom. Dodatno, jedinjenje **38 (MVNP001)** iskazalo je i značajnu *in vitro* antitumorsku aktivnost prema ćelijskim linijama karcinoma dojke MCF-7 i MDA-MB-231, kao i u ksenograft modelu tumora u embrionima zebra-ribica uz supresiju angiogeneze. Rezultati ispitivanja antimalarijske i posebno antitumorske aktivnosti derivata **38 (MVNP001)** pokazane ksenograft testom, nedvosmisleno ukazuju na značaj daljeg istraživanja farmakoloških osobina ovog jedinjenja.

Sintetisani su i novi derivati benzotiazola i ispitano je njihovo antiproliferativno dejstvo prema malignim ćelijama u *in vitro* uslovima. Pokazano je da najaktivnija jedinjenja prema MCF-7 ćelijskoj liniji karcinoma dojke dovode do apoptoze zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G2/M fazi. Paralelno sa indukcijom apoptoze, jedinjenja smanjuju nivo produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta. Karbamati benzotiazola, koji efikasno inhibiraju rast NT2/D1 ćelijske linije humanog teratokarcinoma u *in vitro* uslovima, remete adhezivnu sposobnost ćelija sukcesivno ih uvodeći u apoptozu. Sposobnost novih derivata da inhibiraju migraciju i invanzivnost NT2/D1 ćelija ukazuje na moguće antimetastazno dejstvo.

**Ključne reči:** aminohinolini, antimalarici, *Plasmodium falciparum*, benzotiazol, tumor, inhibitori proliferacije, apoptoza, ksenograft

**Naučna oblast:** Hemija

**Uža naučna oblast:** Organska hemija, medicinska hemija

**UDK broj:** 547(043.3)

**Title:****Development of new inhibitors of parasite *Plasmodium falciparum* and malignant cells proliferation****Abstract**

Malaria is one of the most widespread parasitic diseases throughout world. With the spread of malaria parasite resistance to currently available drugs and need for more efficient inhibitors that target multiple stages of malaria parasite growth, there is an extensive research in the field of new therapeutics development. This doctoral dissertation presents synthesis of new derivatives of the known 4-aminoquinoline pharmacophore for evaluation of their antimalarial activity at various stages of the parasite life cycle. The compound **38 (MVNP001)** showed excellent activity against both erythrocytic and exoerythrocytic stages, and moderate activity against late stage gametocytes *in vitro*. Moreover, derivative **38 (MVNP001)** proved to be non-toxic in host toxicity studies *in vivo*, both in mice and zebrafish. The evaluation of antimalarial activity in mice showed that compound **38 (MVNP001)** prolonged survival of infected mice twice in comparison to untreated infected animals. In addition, compound **38 (MVNP001)** showed significant antitumor activity against human breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231 *in vitro*, as well as in embryonic zebrafish xenograft assay of human cancer development with anti-angiogenic potential. The results obtained during investigation of antimalarial and especially antitumor activity using embryonic zebrafish xenograft assay of derivative **38 (MVNP001)**, clearly emphasizes the importance of further research on pharmacological properties of this drug.

New benzothiazole derivatives were also synthesized and their antiproliferative activity was evaluated against malignant cells *in vitro*. It is shown that the most potent compounds against MCF-7 human breast cancer cell line induced apoptosis caused by cell cycle arrest in G2/M phase. Along with apoptosis induction, new benzothiazoles reduced intracellular ROS level. Benzothiazole carbamates, the most potent inhibitors of NT2/D1 human teratocarcinoma cell line growth, affected cell adhesion leading to apoptosis. Reduction in cell ability to migrate and invade, indicated possible antimetastatic potential.

**Keywords:** aminoquinolines, antimalarials, *Plasmodium falciparum*, benzothiazole, tumor, inhibitors of proliferation, apoptosis, xenograft

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific subfield:** Organic chemistry, medicinal chemistry

**UDK number:** 547(043.3)



## LISTA SKRAĆENICA

<b>ACT</b>	kombinovana terapija zasnovana na artemizininu
<b>ART</b>	artemizinin
<b>ATP</b>	adenozin-trifosfat
<b>A375</b>	ćelijska linija humanog melanoma
<b>Bcl-2</b>	B-ćelijski limfom 2
<b>BHIA</b>	inhibicija nastajanja $\beta$ -hematina (engl. <i><math>\beta</math>-hematin inhibitory activity</i> )
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
<b>BSA</b>	albumin goveđeg seruma (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
<b>CNS</b>	centralni nervni sistem
<b>CQ</b>	hlorokin
<b>CYP1A1</b>	protein iz citohrom P450 superfamilije enzima
<b>DCF</b>	dihlorfluorescein
<b>DCFH-DA</b>	2',7'-dihlordihidrofluorescein-diacetat
<b>dba</b>	dibenzilidenaceton
<b>DEAE</b>	dietilaminoetil
<b>DIPEA</b>	diizopropiletilamin
<b>DMEM</b>	(engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -dimetil-formamid
<b>DMSO</b>	dimetil-sulfoksid
<b>DNK</b>	dezoksiribonukleinska kiselina
<b>DTP</b>	Program za razvoj lekova (engl. <i>Developmental Therapeutics Program</i> )
<b>D6</b>	hlorokin-osetljiv <i>P. falciparum</i> soj (Afrika)
<b>D10</b>	hlorokin-osetljiv <i>P. falciparum</i> soj
<b>EC<sub>90</sub></b>	koncentracija jedinjenja koja pokazuje efektivnu aktivnost na ispitivanu biološku funkciju 90% u poređenju sa kontrolom

<b>EDTA</b>	etilendiamintetrasirćetna kiselina
<b>FACS</b>	sortiranje ćelija aktivirano fluorescencijom (engl. <i>fluorescence-activated cell sorter</i> )
<b>FBS</b>	fetalni goveđi serum (engl. <i>fetal bovine serum</i> )
<b>FCS</b>	fetalni goveđi serum (engl. <i>fetal calf serum</i> )
<b>FDA</b>	Agencija za hranu i lekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FITC</b>	fluorescein-izotiocijanat
<b>FQ</b>	ferokin
<b>GC/MS</b>	gasna hromatografija/masena spektrometrija
<b>GI<sub>50</sub></b>	koncentracija jedinjenja koja inhibira rast 50% ispitivane populacije u poređenju sa kontrolom
<b>G6PD</b>	glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
<b>HeLa</b>	ćelijska linija adenokarcinoma grlića materice
<b>HEPES</b>	4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonska kiselina
<b>HIV</b>	virus humane imunodeficijencije (engl. <i>human immunodeficiency virus</i> )
<b>HPLC</b>	tečna hromatografija visokih performansi (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
<b>HRMS</b>	masena spektrometrija visoke rezolucije (engl. <i>high resolution mass spectrometry</i> )
<b>Huh7</b>	ćelijska linija humanog hepatoma
<b>IC<sub>50</sub></b>	koncentracija jedinjenja koja dovodi do inhibicije ispitivane biološke funkcije 50% u poređenju sa kontrolnim uzorkom
<b>IP</b>	intraperitonealno
<b>IR</b>	infracrvena spektroskopija (engl. <i>infrared</i> )
<b>ISV</b>	intersegmentalni krvni sud (engl. <i>intersegmental vessel</i> )
<b>K1</b>	višestruko rezistentan soj <i>P. falciparum</i>
<b>K562</b>	ćelijska linija mijeloidne leukemije
<b>LC<sub>50</sub></b>	koncentracija jedinjenja koja dovodi do smrti 50% ispitivane populacije u poređenju sa kontrolom
<b>LDH</b>	laktat-dehidrogenaza
<b>MB</b>	metilensko plavo (engl. <i>methylene blue</i> )

<b>MCF-7</b>	ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke
<b>mCPBA</b>	<i>m</i> -hlorperbenzoeva kiselina (engl. <i>m-chloroperoxybenzoic acid</i> )
<b>MDA-MB-231</b>	ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke
<b>MIC</b>	minimalna inhibitorna koncentracija (engl. <i>minimum inhibitory concentration</i> )
<b>MFQ</b>	meflokin
<b>MRC-5</b>	ćelijska linija fetalnih fibroblasta pluća
<b>MST</b>	srednje vreme preživljavanja (engl. <i>medium survival time</i> )
<b>MTD</b>	maksimalna tolerisana doza
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid
<b>MW</b>	mikrotalasi (engl. <i>microwave</i> )
<b>NAD(P)H</b>	nikotinamidadenindinukleotid-fosfat
<b>NBS</b>	<i>N</i> -bromsukcinimid
<b>NCCD</b>	Komitet za nomenklaturu ćelijske smrti (engl. <i>Nomenclature Committee on Cell Death</i> )
<b>NCI</b>	Nacionalni institut za rak (engl. <i>National Cancer Institute</i> )
<b>NMR</b>	nuklearna magnetna rezonancija
<b>NT2/D1</b>	ćelijska linija embrionalnog humanog teratokarcinoma
<b>PBS</b>	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PCC</b>	piridinijum-hlorhromat
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PEG</b>	polietilenglikol
<b>PfATP4</b>	katjonska ATP-aza 4 <i>P. falciparum</i>
<b>PfDHODH</b>	enzim <i>P. falciparum</i> dihidroorotat-dehidrogenaza
<b>PfCRT</b>	transporter hlorokin-rezistentnog soja <i>P. falciparum</i>
<b>PI</b>	propidijum-jodid
<b>PMA</b>	forbol-12-miristat-13-acetat (engl. <i>phorbol-12-myristate-13-acetate</i> )
<b>PQ</b>	primakin
<b>RI</b>	indeks rezistencije (engl. <i>resistance index</i> )
<b>RDT</b>	brzi dijagnostički test (engl. <i>rapid diagnostic test</i> )
<b>ROS</b>	reaktivne kiseonične vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i> )

<b>RP</b>	reverzna faza (engl. <i>reversed phase</i> )
<b>RPMI</b>	(engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
<b>RT</b>	retenciono vreme (engl. <i>retention time</i> )
<b>SDS</b>	natrijum-dodecilsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>SEM</b>	standardna devijacija distribucije srednjih vrednosti (engl. <i>standard error of the mean</i> )
<b>SI</b>	indeks selektivnosti
<b>SPhos</b>	2-dicikloheksilfosfino-2',6'-dimetoksibifenil
<b>SRB</b>	sulforamid B
<b>s. t.</b>	sobna temperatura
<b>SZO</b>	Svetska zdravstvena organizacija
<b>TCA</b>	trihlorsirćetna kiselina
<b>TGI</b>	koncentracija jedinjenja koja dovodi do potpune inhibicije rasta ispitivane populacije (engl. <i>total growth inhibition</i> )
<b>TFA</b>	trifluorsirćetna kiselina
<b>THP-1</b>	ćelijska linija humanih monocita
<b>THF</b>	tetrahidrofuran
<b>TMS</b>	trimetilsilan
<b>TM91C235</b>	višestruko rezistentan soj <i>P. falciparum</i> (Tajland)
<b>t. t.</b>	tačka topljenja
<b>W2</b>	hlorokin-rezistentan i meflokin-osetljiv <i>P. falciparum</i> soj (Indokina)
<b>Xphos</b>	2-dicikloheksilfosfino-2',4',6'-triizopropilbifenil
<b>3D7</b>	višestruko osetljiv soj <i>P. falciparum</i>
<b>4,7-DCQ</b>	4,7-dihlorhinolin

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPŠTI DEO</b> .....	3
<b>2.1 Malaria</b> .....	3
2.1.1 Zastupljenost i transmisija malarije.....	4
2.1.2 Životni ciklus parazita malarije.....	4
2.1.3 Klinički simptomi malarije.....	6
2.1.4 Tretman malarije.....	7
<b>2.2 Kancer</b> .....	19
2.2.1 Onkogeneza i karakteristike malignih ćelija.....	19
2.2.2 Terapija kancera.....	20
2.2.3 Ćelijski ciklus.....	23
2.2.4 Programirana ćelijska smrt – apoptoza.....	25
2.2.5 Invazivnost i metastaza.....	27
2.2.6 Derivati benzotiazola u medicinskoj hemiji.....	28
2.2.7 Antitumorska aktivnost hinolinskih antimalarika.....	32
<b>3. NAŠI RADOVI</b> .....	34
<b>3.1 Naša dosadašnja istraživanja u oblasti sinteze i bioloških ispitivanja potencijalnih antimalarika</b> .....	34
<b>3.2 Sinteza novih potencijalnih inhibitora proliferacije parazita <i>P. falciparum</i></b> .....	36
3.2.1 Primena koncepta multifunkcionalnih molekula.....	40
<b>3.3 Antimalarijska aktivnost sintetisanih derivata</b> .....	46
3.3.1 Ispitivanje inhibicije proliferacije parazita malarije u <i>in vitro</i> uslovima...46	
3.3.2 Akutna toksičnost i antimalarijska aktivnost jedinjenja u <i>in vivo</i> uslovima54	
<b>3.4 Antilajšmanijska aktivnost odabranih derivata 4-aminohinolina u <i>in vitro</i> uslovima</b> .....	57
<b>3.5 Sinteza i ispitivanje antitumorske aktivnosti derivata benzotiazola</b> .....	58
3.5.1 Sinteza derivata benzotiazola.....	58
3.5.2 Ispitivanje antitumorske aktivnosti derivata benzotiazola.....	61

3.5.3	Antitumorska aktivnost hinolinskog derivata 38 (MVNP001) .....	83
<b>3.6</b>	<b>Diskusija</b> .....	<b>90</b>
<b>4.</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	<b>94</b>
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>162</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>164</b>
<b>7.</b>	<b>PRILOG</b> .....	<b>166</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>180</b>

# 1. UVOD

Malarija je infektivna bolest koja predstavlja veliki zdravstveni problem za polovinu svetske populacije. Ukoliko se na vreme i adekvatno ne leči, malarija može dovesti do ozbiljnih komplikacija sa fatalnim ishodom. Zbog široko rasprostranjene rezistencije parazita malarije na postojeće lekove i klimatskih promena koje doprinose razvoju pogodnih životnih uslova za komarce, prenosnike infekcije, malarija predstavlja globalnu pretnju i neophodno je iznaći terapeutik koji bi se efikasno primenjivao u lečenju i prevenciji ove bolesti.

Kancer predstavlja grupu bolesti i stanja izazvanih nekontrolisanom i intenzivnom proliferacijom ćelija bilo kog tkiva u organizmu. Predstavlja jednu od najsmrtonosnijih bolesti modernog doba. Terapija kancera je izuzetno kompleksna usled heterogenog karaktera malignog tkiva i nepredvidivog odgovora na terapijske pristupe. Sličnosti zdravih i ćelija kancera najčešće su uzroci čitavog niza neželjenih dejstava za vreme tretmana malignih oboljenja, pa je toksičnost antitumorskih lekova jedan od vodećih faktora neefikasnosti terapije. Opsežna istraživanja usmerena su ka iznalaženju agenasa sa većom selektivnošću i učinkovitijom kliničkom primenom.

Predmet ovog rada predstavlja razvoj struktura jedinjenja koja iskazuju inhibitornu aktivnost prema intenzivnoj proliferaciji uzročnika malarije i jedinjenja koja inhibiraju proliferaciju kancerogenih ćelija. Postavljeni cilj podstaknut je nedavnim razvojem istraživanja koja ukazuju na moguću vezu ova dva oboljenja. Sintetisani su derivati 4-aminohinolina sa ciljem ispitivanja njihove inhibitorne aktivnosti prema proliferaciji malarijskog parazita roda *Plasmodium* u više faza životnog ciklusa parazita, kao i novi derivati 2-aminobenzotiazola sa biološkom aktivnošću na maligne ćelije. Antitumorsko dejstvo odabranog derivata 4-aminohinolina ispitano je u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

Ova doktorska disertacija sastoji se iz četiri dela:

- U **OPŠTEM DELU** navedeni su literaturni podaci o malariji, parazitu *Plasmodium falciparum*, pregled postojećih antimalarika i aktuelnih strategija u razvoju novih terapijskih pristupa. Izloženi su opšti podaci o kanceru, uzrocima nastanka, osnovnim metodama lečenja i dat je pregled značajnih derivata benzotiazola sa antitumorskom aktivnošću.
- U **NAŠIM RADOVIMA** prikazana je sinteza novih derivata 4-aminohinolina i rezultati ispitivanja njihove antimalarijske aktivnosti. Opisana je i sinteza novih derivata 2-aminobenzotiazola i analiziran je ishod eksperimenata ispitivanja njihove inhibitorne aktivnosti prema MCF-7 i NT2/D1 ćelijskim linijama humanog kancera. Dodatno, prikazano je ispitivanje antitumorske aktivnosti odabranog 4-aminohinolinskog derivata prema ćelijskim linijama adenokarcinoma dojke u *in vitro* i *in vivo* uslovima.
- U **EKSPERIMENTALNOM DELU** dat je detaljan opis sinteze novih jedinjenja i podaci o njihovoj karakterizaciji, kao i eksperimentalni postupci izvođenja bioloških testova.
- U **ZAKLJUČKU** su navedeni najznačajniji nalazi proistekli iz prikazanih rezultata.

U **PRILOGU** se nalaze parametri dobijeni tokom ispitivanja antiproliferativne aktivnosti jedinjenja na pet koncentracija (Nacionalni institut za rak, SAD) i **CD** sa snimljenim spektrima sintetisanih jedinjenja (NMR, IR, HRMS, GC/MS) i HPLC hromatogramima.

Na kraju, dat je pregled korišćene literature.



## 2. OPŠTI DEO

Malarija i kancer su bolesti koje odnose živote širom sveta. Tretman oba oboljenja zahteva supresiju intenzivne proliferacije parazita roda *Plasmodium*, kada je u pitanju malarija, odnosno malignih ćelija u slučaju kancera. Poslednjih godina aktuelna su istraživanja na polju iznalaženja zajedničkih metaboličkih parametara koji su posledica visokog stepena proliferacije, a koji bi se mogli iskoristiti u iznalaženju efikasnijeg terapijskog tretmana.<sup>1</sup> Pored toga, nađeno je da afinitet malarijskog proteina VAR2CSA, zastupljenog na površini eritrocita inficiranih parazitom, prema glukozaminoglikan-hondroitin-sulfatu, isključivo eksprimovanom na placenti, predstavlja osnovu za detekciju cirkulišućih malignih ćelija u krvotoku, na čijoj je površini u velikoj meri prisutan hondroitin-sulfat.<sup>2</sup> Takođe, ispituje se koincidencija malarije i kancera,<sup>3</sup> kao i primena antimalarika različitih klasa u smislu senzitivizacije malignih ćelija na antitumorsku terapiju.<sup>4</sup> Na primer, sinergizam antimalarika i antitumorskih agenasa pokazan je povećanjem antiangiogenog potencijala doksorubicina u prisustvu hlorokina (CQ).<sup>5</sup> U nastavku, ove dve indikacije, malarija i kancer, razmatrane su svaka ponaosob usled različite prirode, rasprostranjenosti i terapije koja se primenjuje.

### 2.1 Malarija

Malarija je infektivna bolest izazvana parazitom iz roda *Plasmodium* koji na ljude prenose ubodom inficirane ženke komaraca roda *Anopheles*. Poznato je pet vrsta roda *Plasmodium* koje izazivaju infekciju kod ljudi: *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* i *P. knowlesi*,<sup>6</sup> koje se razlikuju po geografskoj zastupljenosti, morfologiji i kliničkim manifestacijama koje uzrokuju. Do najopasnijih zdravstvenih komplikacija dovode *P. falciparum* i *P. vivax*, dok *P. falciparum* iskazuje najveću stopu mortaliteta.<sup>7</sup>

Prema najnovijim podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO) u 2017. godini preko 200 miliona ljudi obolelo je od malarije sa više od 400 hiljada smrtnih ishoda.<sup>8</sup> Poražavajuća je činjenica da, uprkos napretku ostvarenom u suzbijanju malarije u periodu do 2015. godine, broj registrovanih slučajeva ponovo raste.

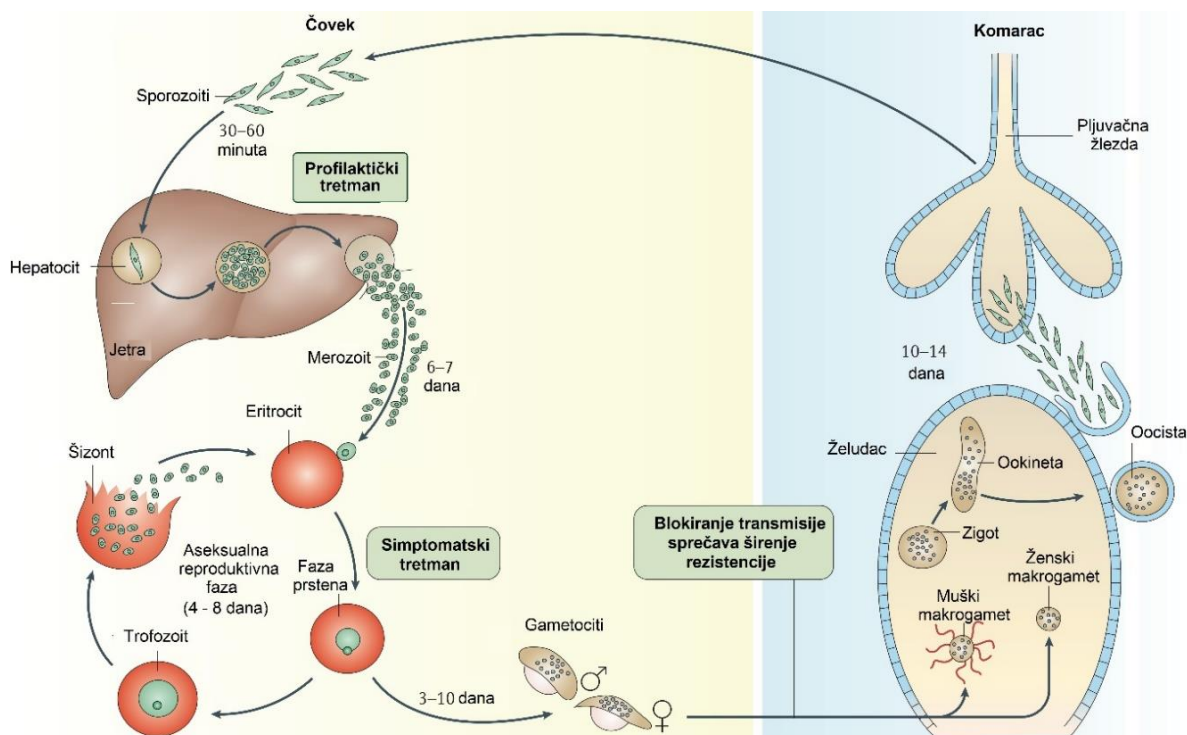
### 2.1.1 Zastupljenost i transmisija malarije

Stepen zastupljenosti malarije u različitim geografskim oblastima određen je klimatskim uslovima pogodnim za razvoj parazita i komarca, prenosnika infekcije. Visoka temperatura, velika vlažnost vazduha i obilne padavine preduslovi su za razmnožavanje komaraca i razvoj parazita u samom komarcu, pa se tako malarija tokom čitave godine javlja u pojasu oko ekvatora, u uslovima tropske i suptropske klime.<sup>9</sup> Najugroženija područja su podsaharska Afrika, Indija i Okeanija. U Centralnoj i Južnoj Americi u oblasti Amazona preovlađuje soj *P. vivax*, koji podnosi i nešto niže ambijentalne temperature. *P. falciparum* preovladava u Africi, Aziji i regionu istočnog Mediterana.<sup>10</sup> Globalno zagrevanje indukovano ljudskim faktorom dovodi do opasnosti od širenja endemskog pojasa usled promena ekosistema i temperature u smeru koji pogoduje dinamici razvoja populacije komaraca i parazita, prenosnika infekcije.<sup>11</sup> Migracije stanovništva i putovanja u mesta sa endemskom malarijom pospešuju pojavu malarije i u područjima gde se obično ne javlja ova bolest. U oblastima u kojima je malarija iskorenjena, dalje prisustvo *Anopheles* komaraca može dovesti do sekundarne transmisije parazita malarije, čiji je prenosnik inficirani posetilac endemskog regiona.<sup>12</sup>

Kako se parazit malarije nalazi u eritrocitima inficirane osobe, pored uobičajene transmisije parazita ubodom komarca iz roda *Anopheles*, malarija se može preneti i transfuzijom krvi pacijenta, transplantacijom organa, nepravilnom upotrebom medicinskog pribora kontaminiranog zaraženom krvlju<sup>13</sup> i transplacentno, pre ili tokom porođaja.<sup>14</sup>

### 2.1.2 Životni ciklus parazita malarije

Kompleksni životni ciklus parazita malarije<sup>15</sup> odvija se u dva domaćina (slika 1). Inficirani komarac, tokom krvnog obroka, prenosi parazite u formi sporozoita u krvotok čoveka i otpočinje aseksualnu fazu ciklusa, šizogoniju. Sporozoiti putuju do jetre i nastanjuju se u hepatocitima.



**Slika 1.** Životni ciklus parazita malarije<sup>i</sup>

Iz sporozoitā višestrukā asexualnom fisijom nastaje na hiljade merozoitā koji se oslobađaju u krvotok gde napadaju eritrocite. Sa invazijom parazita na eritrocite javljaju se prvi simptomi oboljenja. U slučaju *P. vivax*, deo sporozoitā ne podleže odmah replikaciji do merozoitā, već ostaje u uspavanoj formi hipnozoitā i do nekoliko meseci, što odlaže znake infekcije i otežava terapiju. U eritrocitima merozoiti podležu asexualnoj replikaciji i preko faze prstena i trofozoitā formiraju zrele šizonte. Prskanjem šizonta, u krvotok se oslobađa veliki broj merozoitā, koji napadaju nove eritrocite i nastavljaju replikaciju. Deo merozoitā u krvotoku diferencira u muške i ženske gametocite, koji se akumuliraju u kapilarama kože.<sup>16</sup> Ponovnim ubodom, komarac unosi gametocite iz krvotoka čoveka u svoj želudac gde nastaju gameti. U komarcu otpočinje seksualna faza životnog ciklusa parazita, sporogonija. Fuzijom muškog i ženskog gameta nastaje zigot. Zigot formira pokretljivu ookinetu koja napušta lumen želuca kroz epitel u vidu oociste. Oocista, daljom replikacijom, obrazuje sporozoite koji prelaze iz abdomena komarca u pljuvačne žlezde, odakle se prenose u novog domaćina.

<sup>i</sup> Izvor slike 1: *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, 3:17050

Intenzivni metabolički procesi parazita tokom replikacije, koji se odvijaju u eritrocitima inficirane osobe, zahtevaju veliku količinu nutrijenata. Neophodne hranljive materije parazit obezbeđuje razgradnjom 60–80% ukupnog hemoglobina iz citoplazme eritrocita. Razgradnja hemoglobina, koja je najintenzivnija u stadijumu trofozoita, važna je i radi oslobađanja prostora u eritrocitu za nove merozoite i regulaciju osmotskog pritiska u eritrocitu tokom sazrevanja parazita.<sup>17</sup> Katabolizam hemoglobina do aminokiselina i hema odvija se u digestivnoj vakuoli parazita. Paraziti koriste aminokiseline za sintezu sopstvenih proteina. Autooksidacijom oslobođenog hema (feroprotoporfirin IX) nastaje hematin (feriprotoporfirin IX), koji je toksičan za parazite. Parazit se štiti od toksičnog efekta hematina prevodeći ga, nedovoljno poznatim mehanizmom, u hemozin,<sup>18</sup> koji ostavlja za sobom nakon napuštanja eritrocita.

### **2.1.3 Klinički simptomi malarije**

Ozbiljnost posledica inficiranja parazitom malarije zavisi od vrste parazita *Plasmodium* koji je uzrokuje i imuniteta zaražene osobe, te tako simptomi oboljenja mogu izostati ili se javiti u blažem ili komplikovanim vidu.<sup>19</sup> U oblastima sa kontinuiranom transmisijom malarije, u najugroženiju kategoriju spadaju deca uzrasta do pet godina i trudnice. Obično se simptomi oboljenja javljaju 7–10 dana nakon inicijalne infekcije.<sup>16</sup> U slučaju vrsta *P. vivax* i *P. ovale*, koje mogu razviti uspavane forme parazita u jetri, simptomi se mogu javiti aktivacijom hipnozoita godinama posle inficiranja.<sup>20</sup> Hemoliza eritrocita je prvi korak u patogenom mehanizmu malarije kada se u krvotok oslobađa ogroman broj merozoita i sadržaj inficiranog eritrocita, što uzrokuje povišenu telesnu temperaturu, praćenu mučninom, glavoboljom, anemijom, prekomernim znojenjem i drhtavicom. Dodatno, krutost membrana inficiranih eritrocita, dovodi do opstrukcije kapilara, što može oštetiti vitalne organe.<sup>21</sup> Životno ugroženi su pacijenti kod kojih se manifestuje hipoglikemija, oštećenje bubrega i pluća, ili stanje kome.<sup>19</sup>

Uobičajena je pojava koinfekcije malarije sa drugim patogenima. Često pacijenti kod kojih je dijagnostifikovana tuberkuloza ili HIV oboljevaju od malarije što dodatno komplikuje klinički tok ove bolesti.<sup>22</sup>

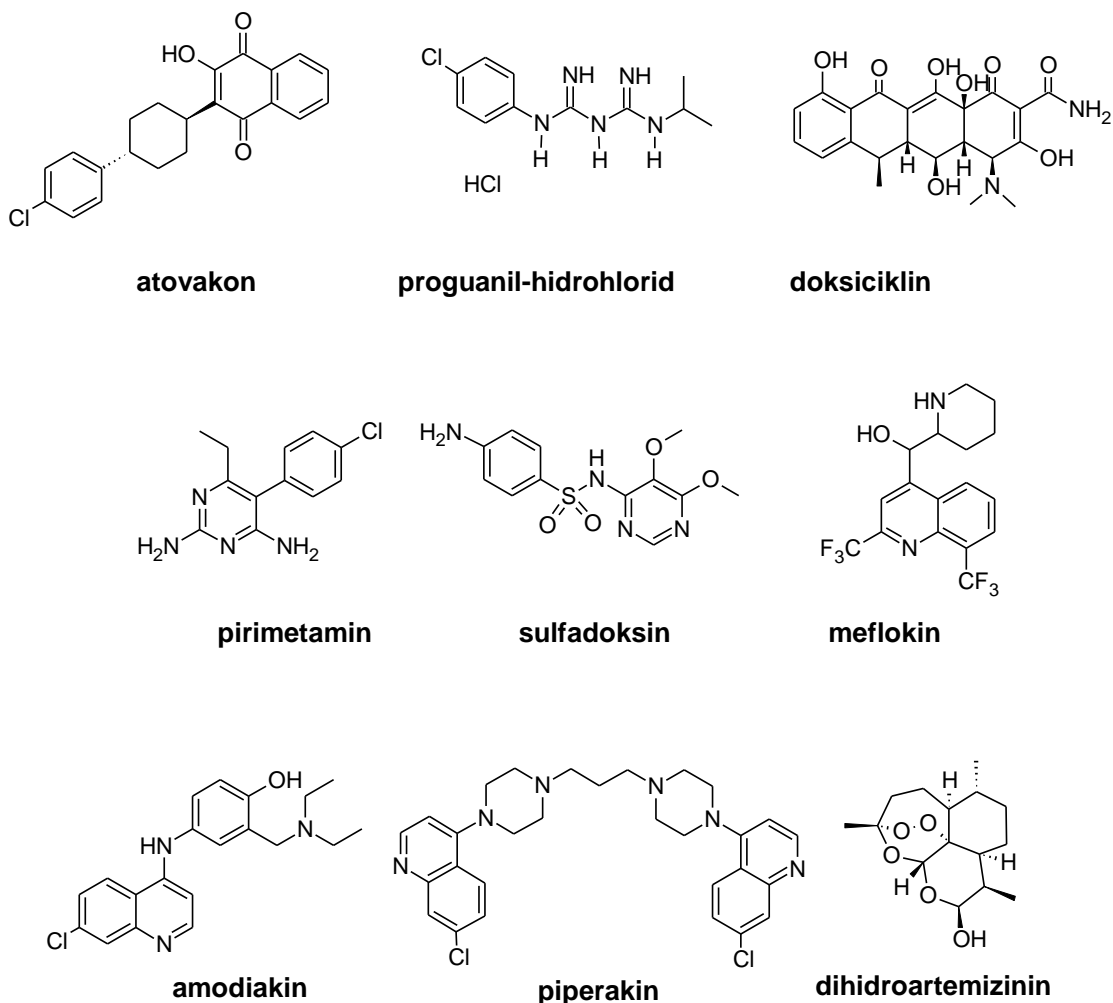
#### **2.1.3.1 Koinfekcija: malarija-lajšmanijaza**

Lajšmanijaza je infektivna bolest uzrokovana parazitima iz roda *Leishmania*, koji na ljude, pse i glodare prenosi ubodom zaražena ženka insekta iz roda *Phlebotomus* i

*Lutzomyia*.<sup>23</sup> Javlja se kao kožna, mukokutana i viscelarna forma oboljenja. Najčešći oblik je kožna lajšmanijaza, koja je zastupljena na Bliskom Istoku, u Južnoj Americi i istočnim delovima Afrike. Najopasnija viscelarna lajšmanijaza (*kala-azar*, crna groznica) sa fatalnim ishodom u više od 90% nelečenih slučajeva, javlja se u Sudanu, Brazilu i na Indijskom poluostrvu.<sup>24</sup> Usled geografskog preklapanja, malarija i lajšmanijaza se neretko javljaju kod istog pacijenta.<sup>25</sup> Iako dele endemska područja, pojava koinfekcije malarije sa lajšmanijazom privlači pažnju istraživača tek poslednjih nekoliko godina. Pretpostavlja se da ne dolazi do direktne interakcije dva patogena, uprkos činjenici da se paraziti mogu naći u istim tkivima u organizmu domaćina.<sup>26</sup> U svakom slučaju, modulacije imunosistema, kao posledica jedne infekcije, mogu uticati na kliničku sliku i ishod druge. Istovremena infekcija malarijom i viscelarnom lajšmanijazom u najvećoj meri pogađa decu starosti do pet godina.<sup>25b</sup>

#### **2.1.4 Tretman malarije**

Tretman malarije obuhvata preventivne i zaštitne mere, uspostavljanje dijagnoze, terapiju bolesti i sprečavanje transmisije. Kompleksnost genoma *Plasmodium* parazita otežava iznalaženje vakcine koja bi efikasno delovala protiv malarije, pa su preventivne mere usmerene ka kontroli prenosnika infekcije i primeni profilaktičkih hemoterapeutika. Kontrola prenosnika infekcije uključuje primenu insekticida i larvicida, isušivanje močvarnih područja i drugih rezervoara vode, gde je to moguće, i korišćenje repelenata i mreža za komarce impregniranih insekticidima. Sa ciljem privremene zaštite posetilaca endemskih područja od infekcije, ili u slučajevima kada postoji opasnost od pojave epidemije malarije, kao najdelotvorniji hemoprotektanti pokazali su se kombinacija atovakona i proguanil-hidrohlorida, doksiciklin i meflokin. Prevencija se obavlja i sa ciljem zaštite od infekcije stanovništva endemskih regija, prvenstveno dece i trudnica. U zavisnosti od susceptibilnosti parazita u oblasti u kojoj se sprovodi prevencija, koriste se odgovarajući agensi.<sup>16</sup> Tako se u podsaharskoj Africi primenjuje kombinacija sulfadoksin/pirimetamin i amodiakin,<sup>27</sup> dok se južno od Ekvatora, usled rezistencije parazita, koristi dihidroartemizinin u kombinaciji sa piperakinom.<sup>28</sup> Strukture navedenih agenasa koji se primenjuju u profilaktičke srhe prikazane su na slici 2.



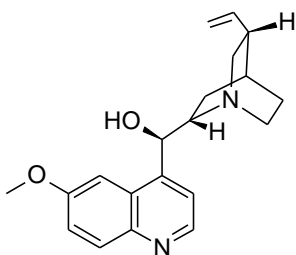
**Slika 2.** Strukture antimalarika koji se primenjuju u profilaktičke svrhe

Važan korak u tretmanu malarije je precizno i praktično uspostavljanje dijagnoze i zasniva se na prepoznavanju simptoma oboljenja i detekcije parazita. Određivanje parazitemije u uzorcima krvi obavlja se mikroskopiranjem krvnih razmaza. Nizak nivo parazita može se detektovati primenom PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) metode, što je veoma važno kada je reč o asimptomatičnim slučajevima, potencijalnim prenosnicima parazita. Manje osetljivu, ali vrlo jednostavnu metodu predstavlja RDT (**R**apid **D**iagnostic **T**est), kojom se u krvi najčešće detektuju laktat-dehidrogenaza, ili histidinom bogat protein 2, proteini specifični za *P. falciparum*.<sup>29</sup> Poslednjih godina velika pažnja posvećena je razvoju neinvazivnih metoda za dijagnozu, koje ne zahtevaju uzorkovanje krvi,<sup>30</sup> i metoda koje detektuju neke od markera rezistencije parazita.<sup>31</sup>

Terapija malarije sprovodi se na način koji zavisi od ozbiljnosti kliničke slike i vrste parazita uzročnika infekcije. Trenutno, primena antimalarika u vidu monoterapije

ne daje zadovoljavajuće rezultate. Preporučena terapija, koja se za sada najuspešnije primenjuje, je kombinovana terapija zasnovana na peroksidnom antimalariku artemizininu (*Artemisinin-based combination therapy*, ACT).<sup>32</sup> Pojava sojeva *P. falciparum* sa smanjenom osetljivošću prema primenjivanim antimalaricima, toksičnost terapeutika i relaps bolesti (*P. vivax* i *P. ovalae*) su ključni razlozi za razvoj novih antimalarika čija bi primena uspešno prevazilazila nedostatke postojećih.

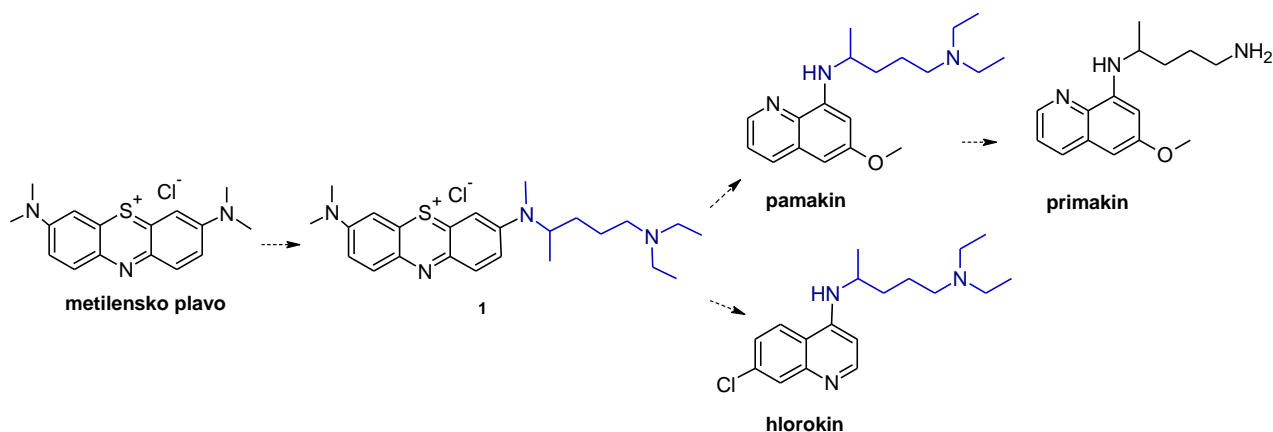
#### 2.1.4.1 Najznačajniji antimalarici XX veka - mehanizam dejstva i nedostaci aktuelne terapije



**Slika 3.** Struktura kinina

Alkaloid kore cinhona drveta, kinin, najstariji je antimalarik (slika 3). Strukturno, spada u grupu arilamino-alkohola i hinolina. Kinin se intenzivno primenjivao sve dok nisu sintetisani derivati hinolina sa unapređenom aktivnošću. Kinin deluje u eritrocitnoj fazi parazita, dok gametocitocidnu aktivnost ispoljava samo kod *P. vivax* i *P. malariae*. Rezistencija parazita na kinin razvija se sporo u poređenju sa drugim hinolinskim antimalaricima. Smanjena osetljivost parazita na kinin zabeležena je u Aziji i Južnoj Americi, dok se u afričkim zemljama kinin i danas koristi u terapiji u kombinaciji sa antibioticima, u slučaju kada ACT nije dostupna.<sup>33</sup>

Krajem XIX veka u terapiji malarije primenjen je prvi sintetički antimalarik, metilensko plavo (slika 4). Metilensko plavo se nije dalje koristilo u lečenju. Ideja o uvođenju dialkilaminoalkil-bočnog niza u strukturu metilenskog plavog (jedinjenje 1, slika 4) kasnije je dovela do sinteze **8-aminohinolina** pamakina i primakina (PQ) i **4-aminohinolina** hlorokina (CQ). Za razliku od pamakina koji je toksičan, **PQ** i **CQ** su i danas u upotrebi.<sup>34</sup> Primakin ispoljava svoju aktivnost prema hipnozoitima, *uspavanoj* formi parazita u jetri. Iz tog razloga, efikasno se primenjuje u terapiji *P. vivax*.<sup>32</sup> Takođe, primakin je aktivan i prema zrelim gametocitima *P. falciparum*.<sup>35</sup> Gametocitocidno dejstvo je vrlo važno u sprečavanju dalje transmisije infekcije sa čoveka na komarca. Međutim, terapija primakinom zahteva administraciju leka tokom 14 dana, što dovodi do niza neželjenih efekata poput gastrointestinalnih tegoba i hemolize kod G6PD (glukoza-6-fosfat dehidrogenaza) deficitarnih pacijenata.<sup>16</sup>



**Slika 4.** Od metilenskog plavog do hinolinskih antimalarika

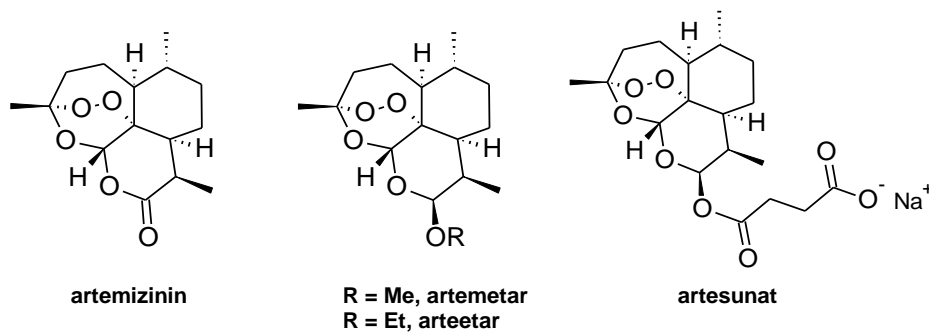
Hlorokin je skoro četiri decenije predstavljao osnovni antimalarik u kliničkoj upotrebi. U poređenju sa drugim antimalaricima, hlorokin je jeftin, relativno netoksičan, jednostavno se sintetiše i pruža brz terapijski odgovor.<sup>36</sup> Primjenjuje se oralno u obliku fosfatne ili sulfatne soli.<sup>37</sup> Hlorokin ispoljava svoje dejstvo prema parazitu malarije u eritrocitnoj formi. Naime, zahvaljujući baznim svojstvima ( $pK_{a1}=8,1$ ;  $pK_{a2}=10,2$ )<sup>38</sup> hlorokin lako difunduje u kiselu digestivnu vakuolu parazita ( $pH=5,0-5,2$ )<sup>39</sup> koji se nalazi u eritrocitu, i biva protonovan. Jonska forma  $CQ^{2+}$ , akumulira se u vakuoli, gde se odvija razgradnja hemoglobina. Ostvarivanjem  $\pi-\pi$  slažućih interakcija između hinolinskog jezgra i porfirina hematina, hlorokin onemogućava nastajanje hemozoina u procesu detoksifikacije hema od strane parazita.<sup>36</sup> Toksičnost prema parazitu malarije u eritrocitnoj fazi usled interakcije sa hematinom, svojstvena je i drugim antimalaricima derivatima 4-aminohinolina.<sup>34</sup> Nađeno je i da prisustvo hlora u položaju C(7) hinolinskog jezgra doprinosi ukupnoj aktivnosti hlorokina i strukturno sličnih jedinjenja.<sup>40</sup> Međutim, intenzivna primena hlorokina u terapiji malarije dovela je do širenja rezistencije parazita prema ovom terapeutiku u gotovo svim endemskim područjima. Uočeno je da se u rezistentnim sojevima parazita, usled mutacije na genu za transportni protein PfCRT, hlorokin ne akumulira u dovoljnoj meri u hranljivoj vakuoli parazita, gde ispoljava svoju aktivnost.<sup>41</sup>

S ciljem prevazilaženja rezistencije parazita i unapređenja strukture sa već iskazanim povoljnim farmakološkim karakteristikama, različite istraživačke grupe sintetisale su i ispitale veliki broj derivata hlorokina,<sup>36</sup> od kojih su neki ušli u kliničku primenu. Važniji među novim lekovima su amodiakin i bishinolinski derivat piperakin (slika 2), koji su u kombinaciji sa drugim terapeutikima i danas u upotrebi. Amodiakin je



aktivan prema CQ-rezistentnim sojevima parazita, ali je nađeno da izaziva nezanemarljive toksične efekte, agranulocitozu i hepatitis.<sup>42</sup> Osamdesetih godina počinje i primena **arilamino-alkohola**, derivata kinina, meflokina (**MFQ**, slika 2). Mehanizam dejstva meflokina sličan je mehanizmu hlorokinških derivata, ali se, monoprotovan, u manjoj meri nagomilava u hranljivoj vakuoli parazita.<sup>38</sup> Sa pojavom sojeva *P. falciparum* rezistentnih na meflokin u jugoistočnoj Aziji, zapadnoj Africi i dolini Amazona, meflokin se upotrebljava u terapiji malarije u kombinaciji sa derivatima artemizinina.<sup>42</sup>

Paralelno sa antimalaricima čija se struktura zasniva na hinolinskom jezgru, razvijaju se i **peroksidni** antimalarici, derivati prirodnog proizvoda artemizinina (ART), koji je izolovan iz slatkog pelena (*Artemisia annua*) sedamdesetih godina prošlog veka. Strukture artemizinina i njegovih najznačajnijih derivata prikazane su na slici 5. Prvi sintetisani derivat artemizinina, dihidroartemizinin, prikazan je na slici 2.



**Slika 5.** Peroksidni antimalarik artemizinin i njegovi derivati

Artemizinini su brzodelujući, vrlo efikasni antimalarici, koji ispoljavaju svoje dejstvo u eritrocitnoj i ranoj gametocitnoj fazi parazita.<sup>43</sup> U kombinovanoj terapiji (ACT) primenjuju se sa hinolinskim derivatima koji se duže zadržavaju u organizmu. Kombinovana terapija dva antimalarika različite strukture i mehanizma dejstva otežava razvijanje rezistencije parazita prema takvom vidu tretmana i pruža veću terapeutsku efikasnost.<sup>44</sup> Mehanizam dejstva derivata artemizinina predmet je brojnih proučavanja. Endoperoksidni most trioksanske farmakofore artemizinina esencijalan je za antimalarijsku aktivnost. Smatra se da u reakciji sa gvožđem (II) u hranljivoj vakuoli parazita od artemizinina nastaju radikalske vrste koje mogu da se kovalentno vežu za različite proteine parazita i tako inhibiraju njihovu funkciju.<sup>45</sup> Iako ACT i dalje predstavlja najefikasniji način borbe protiv malarije, pojava smanjene osetljivosti *P.*

*falciparum* u Kambodži i Tajlandu na ART,<sup>46</sup> a odnedavno i u istočnoj Indiji,<sup>47</sup> ukazuje na hitnu potrebu za antimalaricima sa novim mehanizmom dejstva.

#### **2.1.4.2 Novi pristup u razvoju antimalarika i pregled eksperimentalnih jedinjenja**

Širenje rezistentnih vrsta *Plasmodium* parazita, klimatske promene, stagnacija u efikasnosti istrebljenja malarije u ugroženim područjima i sve veći broj prijavljenih slučajeva neefikasnog tretmana dostupnim antimalaricima nalažu hitan razvoj novih pristupa problemu iznalaženja efikasnog terapijskog agensa.

Sa automatizacijom testova i daljim razvojem *in vitro* eseja omogućeno je testiranje velikog broja jedinjenja istovremeno. Ovakav pristup omogućava brzu identifikaciju jedinjenja pogodnih za dalja ispitivanja. Sa druge strane, veliki značaj u ispitivanju potencijalnih meta za dejstvo novih antimalarika predstavlja razvoj na polju istraživanja genoma parazita. Nakon identifikacije proteina koji su esencijalni za razvoj parazita i otkrivanja njihove uloge u infektivnosti i samoj bolesti, može se pristupiti osmišljavanju strukture odgovarajućih inhibitora molekulskim modelovanjem, ili testiranjem poznatih jedinjenja na sposobnost inhibicije identifikovane mete.<sup>48</sup> Sofisticiranost životnog ciklusa parazita malarije pruža veliki broj mogućnosti za intervenciju agensima sa potencijalnim antimalarijskim dejstvom, ali inhibicija samo jednog procesa uključenog u razvoj parazita u čoveku ili komarcu uglavnom nije dovoljna za efikasnu monoterapiju. Međutim, strukturu multifunkcionalnog jedinjenja, koje bi bilo aktivno na više meta, u potpunosti eliminisalo simptome malarije, onemogućilo relaps i sprečilo transmisiju parazita, teško je predvideti, pa je **fenotipski skrining** velikog broja jedinjenja najbolji način za identifikaciju potencijalnih agenasa sa višestrukim dejstvom.<sup>49</sup>

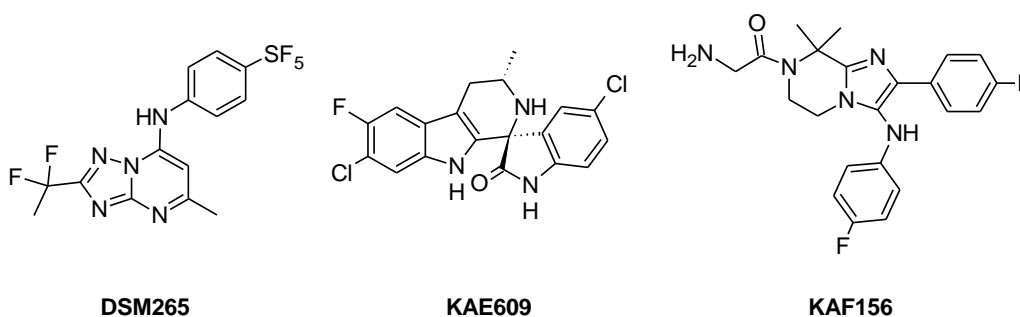
Nakon identifikacije enzima *P. falciparum* dihidroorotat-dehidrogenaze (PfDHODH), koji učestvuje u biosintezi pirimidina, kao potencijalne mete u prevenciji i tretmanu malarije, optimizovana je struktura potencijalnih inhibitora i nađeno je da **DSM265** (slika 6) iskazuje značajnu selektivnost prema ovom enzimu. **DSM265**, derivat triazolpirimidina, aktivan je prema rezistentnim izolatima parazita i efikasno deluje na eritrocitnu fazu i fazu jetre. Predikcija farmakokinetičkih osobina i režima doziranja kod ljudi, na osnovu prethodno određenih parametara na različitim modelima životinja, pokazala je da bi se **DSM265**, primenjen oralno u samo jednoj dozi 200 – 400 mg/kg,

nalazio u ljudskoj plazmi u koncentraciji iznad minimalne terapijske koncentracije (1 – 2 mg/mL) duže od osam dana.<sup>50</sup> Očekivan farmakokinetički profil i dejstvo u eritrocitnoj fazi *P. vivax* i *P. falciparum* pokazani su tokom druge faze kliničkih ispitivanja u Peruu 2016. godine. Naime, jedinjenje **DSM265** primenjeno oralno u dozama 250 mg i 450 mg, kod dobrovoljaca inficiranih u eksperimentalnim uslovima parazitom *P. falciparum*, dovodi do potpunog odsustva parazitemije 72 sata nakon administracije. Jednokratna primena 400 mg jedinjenja **DSM265** 24 sata pre infekcije sporozoitima *P. falciparum*, efikasno sprečava razvoj infekcije kod odraslih ljudi.<sup>51</sup>

Klasa spiroazepinindola se izdvojila iz grupe od 12000 prirodnih proizvoda i jedinjenja sa strukturnim segmentima prirodnih proizvoda, na osnovu rezultata testiranja na sposobnost inhibicije proliferacije parazita *P. falciparum* u endoeritrocitnoj fazi. Optimizacijom strukture dobijen je spiroindolon **KAE609** (cipargamin, slika 6). Jedinjenje **KAE609** pokazalo je izuzetnu aktivnost prema osetljivim i rezistentnim sojevima *P. falciparum* u *in vitro* uslovima ( $IC_{50} = 0,5 - 1,4$  nM), kao i svežim izolatima multirezistentnih sojeva parazita iz Tajlanda ( $IC_{50} < 10$  nM). Jedinjenje je podjednako efikasno prema svim eritrocitnim fazama parazita. Nađeno je da zaustavlja sintezu proteina u *P. falciparum* i iskazuje visok indeks selektivnosti prema parazitu u poređenju sa ćelijskim linijama različitog porekla ( $SI > 10000$ ), sa izuzetno malim rizikom za kardiotsičnost i mutagenost (inhibicija hERG kanala i Amesov test). Ispitivanje uticaja na parazitemiju kod miševa inficiranih sojem *P. berghei* pokazalo je da je jedna doza 100 mg/kg oralno primenjenog **KAE609** dovoljna za potpuno izlečenje tretiranih miševa.<sup>52</sup> Mehanizam dejstva cipargamina obuhvata inhibiciju membranskog transportera *P. falciparum* ATP-aze 4 (PfATP4), što dovodi do poremećaja transporta  $Na^+$  i  $H^+$  između parazita i citoplazme eritrocita.<sup>53</sup> Posledica ovog poremećaja je akumulacija holesterola u membrani parazita, što povećava njenu rigidnost, čineći parazit podložnim oštećenjima i ubrzava klirens parazita iz krvotoka.<sup>54</sup> **KAE609** je prvi molekul sa potpuno novim mehanizmom dejstva u drugoj fazi kliničkih ispitivanja u poslednjih dvadeset godina.<sup>53</sup>

Fenotipskim testiranjem velike biblioteke jedinjenja 2011. godine ustanovljeno je da derivati imidazolpiperazina pokazuju značajnu antimalarijsku aktivnost prema parazitu malarije u krvi i u fazi jetre.<sup>55</sup> Vodeće jedinjenje **KAF156** (ganaplasid, slika 6) aktivnost prema krvnim šizontima ispoljava u intervalu  $IC_{50}$  vrednosti od 6 nM do 17 nM prema osetljivim i rezistentnim sojevima *P. falciparum* u *in vitro* uslovima. U modelu

eksperimentalne malarije u miševima inficiranim sporozoitima *P. berghei*, **KAF156** sprečava nastajanje merozoita iz sporozoitima kada se primeni u jednoj dozi 10 mg/kg dva sata pre infekcije. Takođe, ovo jedinjenje inhibira razvoj zrelih gametocita *in vitro* i *in vivo*. Prilikom jednokratne oralne administracije **KAF156** u koncentraciji 100 mg/kg u modelu eksperimentalne malarije u miševima inficiranim sojem *P. berghei* ostvareno je potpuno sprečavanje transmisije.<sup>56</sup> Multifunkcionalni derivat imidazolpiperazina nalazi se u II fazi kliničkog ispitivanja koje farmaceutska kompanija Novartis sprovodi u Tajlandu i u Vijetnamu u kombinaciji sa novom formulacijom ranije poznatog aminoalkohola lumefantrina. Zasad nije poznat mehanizam dejstva **KAF156** na *P. falciparum*, ali se spekulira da je meta delovanja transportni protein membrane endoplazmatičnog retikuluma.<sup>16</sup>

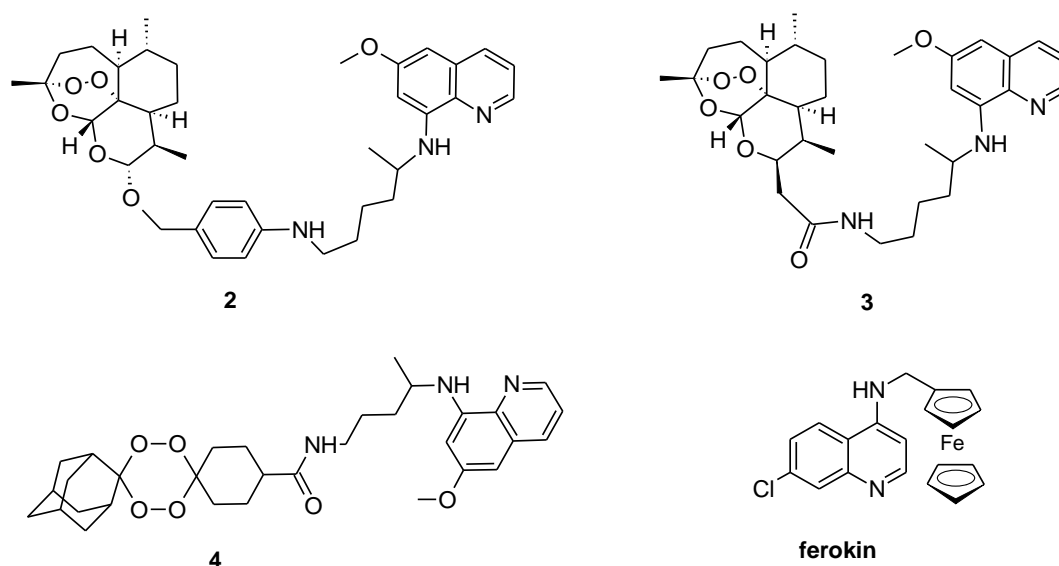


**Slika 6.** Antimalarici koji se trenutno nalaze u fazi kliničkih ispitivanja sa novim mehanizmom delovanja

Ciljana sinteza jedinjenja koja deluju na više različitih meta u parazitu malarije zasniva se na sintezi takozvanih **hibridnih molekula**, koji su dizajnirani tako da njihovu strukturu čine bar dve farmakofore poznatih biološki aktivnih jedinjenja sa različitim mehanizmom dejstva. Ovakav pristup pretpostavlja da novo jedinjenje zadržava dejstvo konstitucionih elemenata i predstavlja unapređenje koncepta kombinovane terapije, s izuzetkom potrebe za usklađivanjem farmakodinamike dve odvojene komponente prilikom utvrđivanja režima primene. Kovalentnim vezivanjem derivata artemizina i primakina sintetisana su jedinjenja **2** i **3** prikazana na slici 7. Jedinjenja iskazuju bolju aktivnost prema sporozoitima *in vitro* u poređenju sa smešom 1:1 **ART-PQ**. Aktivnost konjugovanih derivata prema eritrocitnim formama *P. falciparum* u *in vitro* uslovima odgovara aktivnosti samog ART. Međutim, u miševima inficiranim sporozoitima *P. berghei* jedinjenja primenjena intraperitonealno, pokazuju manji stepen aktivnosti prema formama parazita u fazi jetre u poređenju sa **PQ**. Ipak, jedinjenje **2**, usporava razvoj

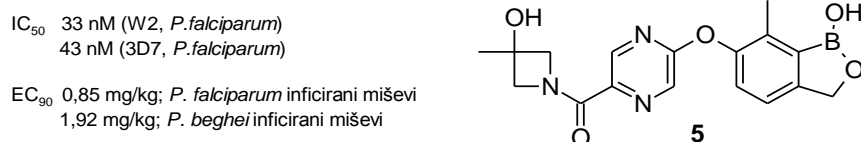
parazitemije u krvi. Jedinjenje **3** u potpunosti leči miševе inficirane eritrocitnim formama *P. berghei*. Različit ishod testiranja jedinjenja **2** i **3** u *in vivo* uslovima, uprkos sličnoj *in vitro* efikasnosti, ukazuje na moguće razlike u metaboličkoj stabilnosti i bioraspoloživosti ovih jedinjenja u eritrocitima i hepatocitima.<sup>57</sup> Jedinjenje **4** na slici 7 je predstavnik endoperoksida konjugovanih sa 8-aminohinolinima i efikasno inhibira razvoj parazita malarije u eritrocitnoj i hepatocitnoj fazi. Takođe, tetraoksan **4** umanjuje transmisiju parazita iz miša u komarca, što je pokazano smanjenjem broja oocista nastalih sporogonijom u komarcima zaraženim krvlju *P. berghei* inficiranih miševa tretiranih jedinjenjem.<sup>58</sup>

Strategija primene organometalnih jedinjenja u antikancer terapiji, poslužila je kao inspiracija za seriju jedinjenja kod kojih je ferocen vezan za farmakoforu antimalarika.<sup>59</sup> Najznačajniji predstavnik organometalnih antimalarika, ferokin (**FQ**, slika 7), dizajniran kombinovanjem ferocena i hlorokina, nalazi se u fazi II kliničkih istraživanja. Novi organometalni antimalarik je izuzetno aktivan prema CQ-rezistentnim sojevima *P. falciparum*. Ferokin je lipofilniji i nešto manje bazan od CQ. Akumulira se u lipidnoj membrani hranljive vakuole parazita i dolazi do interakcije sa hematinom poput hlorokina. Dodatno, ferocenska komponenta u oksidativnoj i kiseloj sredini vakuole dovodi do nastajanja reaktivnih radikalskih vrsta, koje oksiduju lipide membrane.<sup>60</sup>



**Slika 7.** Strukture antimalarika nastalih povezivanjem dve farmakofore sa ciljem poboljšanja aktivnosti

Osim slučajnog otkrivanja novih hemotipova prilikom testiranja aktivnosti velikog broja jedinjenja prema parazitu malarije, strukturni diverzitet antimalarika može se ostvariti i uvođenjem novih heteroatoma u potencijalno biološki aktivne strukture. Još uvek u fazi razvoja vodeće strukture za preklinička ispitivanja antimalarijske aktivnosti nalaze se benzoksaboroli.<sup>61</sup> Benzoksaboroli pokazuju značajnu aktivnost u *in vitro* i *in vivo* uslovima (jedinjenje **5**, slika 8).



**Slika 8.** Derivat benzoksaborola sa antimalarijskom aktivnošću

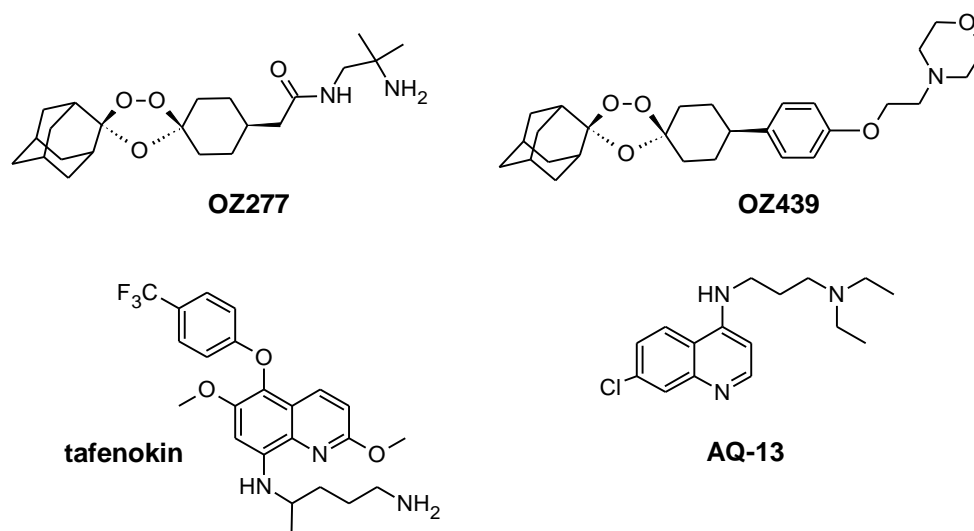
Antimalarijsko dejstvo metilenskog plavog (*methylene blue*, **MB**, slika 4) ustanovljeno je krajem XIX veka, međutim veoma dugo ostaje u senci dostupnih efikasnijih antimalarika. Sa pojavom *Plasmodium* sojeva rezistentnih na aktuelnu terapiju, ponovo se javlja interesovanje za prvi sintetički antimalarik.<sup>62</sup> Ohrabruje činjenica da do sad nije zabeležena rezistencija *Plasmodium* parazita prema metilenskom plavom, niti je izazvana u eksperimentalnim uslovima.<sup>63</sup> Metilensko plavo interferira sa degradacijom hemoglobina i biokristalizacijom hema u hemozoin i selektivni je nekompetitivni inhibitor *P. falciparum* glutation reduktaze.<sup>64</sup> Činjenica da je, tokom kliničkih ispitivanja u kombinaciji sa artesunatom, pokazana izuzetna aktivnost **MB** prema ranim i zrelim gametocitima *P. falciparum*,<sup>65</sup> dodatno doprinosi aktuelnosti ponovnog razmatranja efikasnosti metilenskog plavog u borbi protiv malarije.

Unapređivanje strukture već poznatih lekova prema kojima je *Plasmodium* razvio rezistenciju, a koji imaju dobre farmakokinetičke osobine i minimalnu toksičnost, konstantno je zastupljen pristup u iznalaženju novih antimalarika.

Budući da je totalna sinteza artemizininina i njegovih derivata vrlo složena, prirodni resursi su glavni izvor dobijanja peroksidnih antimalarika. Dostupnost biljne sirovine može da utiče na fluktuacije u ceni terapeutika.<sup>66</sup> Sa ciljem dobijanja jednostavnijih sintetičkih peroksidnih antimalarika, sintetisan je 1,2,4-trioksolan **OZ277** (arterolan, slika 9).<sup>67</sup> Međutim, u kliničkim studijama pokazao je terapijski nedovoljnu zastupljenost u plazmi pacijenata.<sup>68</sup> U kliničkim testovima u kombinaciji sa piperakinom, zabeležena je dovoljna koncentracija **OZ277** u krvi, bolja efikasnost i izostanak rekrudescencije.<sup>69</sup>

Nastavak istraživanja na ovom polju doveo je do sinteze jedinjenja **OZ439** (artefenomel, slika 9), sa superiornijim karakteristikama u pogledu farmakokinetičkih osobina i antimalarijske efikasnosti u poređenju sa **OZ277**. U *in vivo* testovima u modelu eksperimentalne malarije, primenjen oralno u samo jednoj dozi 20 mg/kg, **OZ439** u potpunosti leči inficirane miševe sojem *P. berghei*.<sup>70</sup> Trenutno je u toku faza II kliničkih ispitivanja jedinjenja **OZ439** u kombinaciji sa ferokinom na pacijentima inficiranim parazitom *P. falciparum* u Africi i Vijetnamu.<sup>71</sup>

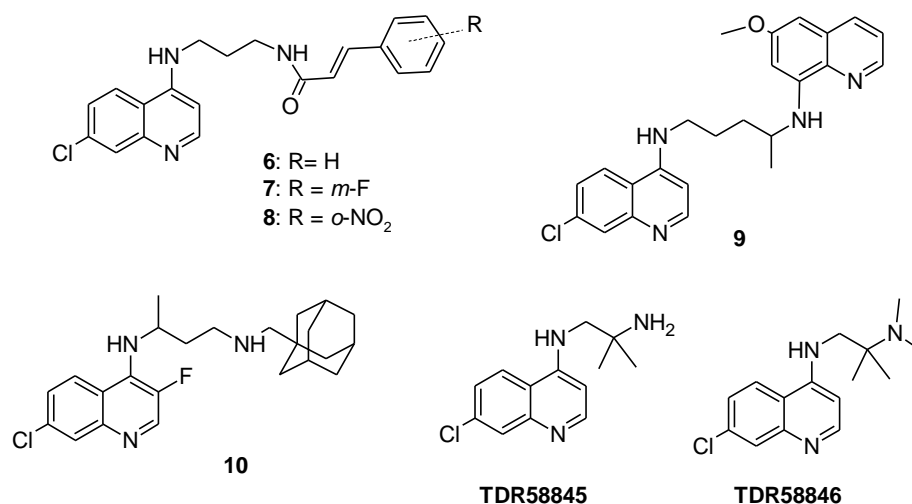
Donedavno, jedini terapeutik koji efikasno deluje na uspavanu formu parazita u jetri, hipnozoite, zaslužne za relaps malarije nakon tretmana, bio je primakin (slika 4). Kako je već navedeno, uspešan tretman primakinom zahteva četrnaestodnevnu terapiju, uz opasnost od javljanja ozbiljnih neželjenih efekata (gastrointestinalnih tegoba i hemolize). Predstavnik druge generacije 8-aminohinolina, analog primakina, tafenokin (slika 9), odobren je od strane Američke agencije za hranu i lekove (FDA, *Food and Drug Administration*) u julu 2018. godine za tretman obolelih od malarije izazvane parazitom *P. vivax*.<sup>72</sup> Tafenokin, poput primakina, izaziva hemolizu kod G6PD deficijentnih pacijenata, ali eliminiše u potpunosti *P. vivax* iz organizma kada se primeni u samo jednoj dozi.<sup>16</sup> Dodatno, bolja aktivnost tafenokina u poređenju sa primakinom ogleda se i u činjenici da tafenokin inhibira biokristalizaciju hema u hemozoin, a aktivan je i prema eritrocitnim formama parazita, uključujući i rezistentne sojeve *P. falciparum*.<sup>73</sup>



**Slika 9.** Klinički kandidati (**OZ277**, **OZ349** i **AQ13**) i odobren lek tafenokin čije se strukture zasnivaju na poznatim antimalaricima

Derivati 4-aminohinolina predmet su opsežnih istraživanja na polju razvoja novih antimalarika, uprkos širokoj rasprostranjenosti rezistentnih sojeva *Plasmodium* parazita prema hlorokinu i njegovim analogima. U pojedinim afričkim krajevima, u kojima se hlorokin više ne koristi, primećena je spora, ali progresivna pojava sojeva *P. falciparum* bez markera CQ-rezistencije, dakle osetljivim na hlorokin.<sup>74,75,76</sup> Saznanja koja proističu iz ispitivanja rezistentnih sojeva parazita malarije i detalji mehanizma dejstva 4-aminohinolinskih antimalarika, umnogome doprinose razvoju novih derivata sa potencijalnom aktivnošću prema CQ-rezistentnim sojevima.<sup>77</sup> Jednostavna terapijska primena, jeftina sinteza 4-aminohinolina i relativna netoksičnost dodatno opravdavaju aktuelnost istraživanja u ovoj oblasti.<sup>39</sup> Devedesetih godina sintetisani su derivati **CQ** sa dužim i kraćim diaminoalkil-nizom koji su pokazivali aktivnost prema CQ-osetljivim i CQ-rezistentnim sojevima *P. falciparum* u *in vitro* uslovima ( $IC_{50} = 5-58$  nM).<sup>78</sup> Najaktivnije jedinjenje **AQ-13** (slika 9), koje se neznatno razlikuje u strukturi u poređenju sa **CQ**, pokazalo je farmakokinetičke i toksikološke osobine slične hlorokinu u modelu životinja.<sup>79</sup> Klinička ispitivanja, koja su zatim usledila, ukazuju na visoku efikasnost tretmana obolelih od malarije u Africi, uporedivu sa ACT.<sup>80</sup> Drugi primer derivata 4-aminohinolina sa kliničkim antimalarijskim potencijalom je već navedeni ferocenski derivat ferokin (slika 7). Rezultati do sad ostvareni u razvoju novih antimalarika derivata 4-aminohinolina, u inicijalnim studijama, obuhvataju strukture koje su aktivne prema CQ-rezistentnim sojevima ili su bolji inhibitori biokristalizacije hema u hemozoin u poređenju sa **CQ**. U literaturi je poznato samo nekoliko derivata 4-aminohinolina aktivnih u više od jedne faze životnog ciklusa parazita (slika 10). Osim u eritrocitnoj fazi, nekoliko struktura dobijenih *N*-cinamoilovanjem 4-aminohinolina<sup>81</sup> (**6-8**) ili konjugacijom 4-aminohinolina sa **PQ** (**9**),<sup>82</sup> aktivno je prema parazitima u fazi jetre *in vitro*. U istraživačkoj grupi profesora Šolaje sintetisan je prvi 4-aminohinolin sa adamantanskim nosačem (jedinjenje **10**, slika 10) koji je aktivan u fazi jetre u *in vitro* i *in vivo* uslovima.<sup>83</sup> Jedinjenja **TDR58845** i **TDR58846** (slika 10), pokazuju 60% inhibicije razvoja zrelih gametocita *P. falciparum* (NF54) u koncentraciji 1  $\mu$ M u *in vitro* uslovima.<sup>84</sup>





**Slika 10.** Derivati 4-aminohinolina koji su aktivni u dve faze životnog ciklusa parazita

## 2.2 Kancer

Nekontrolisan rast i razmnožavanje ćelija dovode do uvećanja tkiva, nastajanja tumora, koji može biti benigni, lokalizovan, ili maligni (karcinom), ukoliko se ćelije tumora šire na okolna i udaljena tkiva i organe u procesu metastaze. Pojam „kancer“ podrazumeva grupu bolesti i stanja koja se javljaju kao posledica izostanka mehanizama kontrole proliferacije ćelija.<sup>85</sup> Prema podacima SZO, kancer je drugi po redu uzročnik smrti u razvijenom svetu, sledeći kardiovaskularne bolesti. U 2018. godini registrovano je preko 18 miliona novih slučajeva obolelih od kancera širom sveta.<sup>86</sup>

### 2.2.1 Onkogeneza i karakteristike malignih ćelija

Nastajanje tumora može biti inicirano agensima iz spoljašnje sredine. Upotreba duvana i nezdrava ishrana su izvori mutagenih supstanci koje iniciraju ili pospešuju transformaciju zdravih ćelija u maligne ćelije. Potvrđeno je da i virusi poput humanog papiloma virusa, HIV i hepatitisa mogu dovesti do pojave kancera. Predispozicije za razvoj kancera neretko su posledica nasleđenih genetskih anomalija.<sup>87</sup>

Onkogeneza (tumorigeneza ili kancerogeneza) predstavlja vrlo složen proces transformacije zdravih ćelija u maligne. Normalne ćelije razvijaju malignitet kroz seriju genetskih promena polazeći od tačkastih mutacija DNK do raznovrsnih alteracija u strukturi hromozoma, koje se odvijaju najrazličitijim redosledom. Promene u genetskom materijalu imaju direktan uticaj na replikaciju i reparaciju DNK, kao i ekspresiju gena

ključnih regulatora rasta ćelije.<sup>88</sup> Nezavisno od uzroka maligniteta ćelija i dinamike kojom se razvija, transformisane ćelije karakteriše visok stepen nekontrolisane proliferacije i nizak stepen diferenciranosti. Gubitak kontrole nad procesima deobe i diferencijacije nastaje usled mutacija različitih proto-onkogenih i tumorsupresorskih gena. Proto-onkogeni su oni koji promovišu proliferaciju, dok su tumorsupresorski geni negativni medijatori proliferacije.<sup>89</sup> Malignitet ćelija ogleda se u stečenim fiziološkim promenama koje čine: neprekidna stimulacija proliferativne signalizacije, izmenjena regulacija ćelijskog ciklusa, izbegavanje programirane ćelijske smrti, neograničena replikacija – besmrtnost, sposobnost angiogeneze, invazivnost i metastazni potencijal.<sup>87,90</sup> Svim malignim ćelijama svojstveno je i prilagođavanje energetskeg metabolizma novonastalim uslovima pojačane proliferacije favorizovanjem glikolize. Dodatno, istrajnosti malignih ćelija u organizmu doprinosi razvijanje mehanizama ograničenog prepoznavanja od strane imunostistema.<sup>91</sup> Nastajanje tumora nije ograničeno samo na promene unutar ćelija. Maligne ćelije konstruišu odgovarajuću mikrosredinu u okviru tkiva kome pripadaju, angažujući vezivne ćelije iz neposredne okoline u svrhu promovisanja tumora.<sup>92</sup>

Unutar tkiva zahvaćenog tumorom postoje funkcionalno različite populacije malignih ćelija. Različite populacije ćelija mogu biti genetski heterogene usled intenzivne proliferacije i razvijanja nestabilnosti genoma. Takođe, fenotipovi genetski homogenih ćelija se mogu razlikovati usled nejednakog stepena diferencijacije.<sup>91</sup> Heterogenost tumora unutar jednog tkiva pospešuje razvoj rezistencije prema primenjenoj terapiji, a razlike u tumoru istog histološkog tipa u različitim pacijentima značajno komplikuju odabir globalno efikasnog terapijskog tretmana.<sup>93</sup>

### **2.2.2 Terapija kancera**

Terapija kancera se zasniva na lokalnim intervencijama kao što su hirurgija i radioterapija kada je moguće, i sistemske hemoterapiji, koja u 50% ukupnog broja slučajeva dovodi do izlečenja.<sup>94</sup> Izbor terapije zavisi od vrste i stadijuma razvoja tumora u trenutku uspostavljanja dijagnoze.<sup>95</sup>

Činjenica da se konvencionalni lekovi u većoj meri akumuliraju u metabolički hiperaktivnim, brzoproliferišućim malignim ćelijama u poređenju sa zdravim, opravdava koncept primene citotoksičnih jedinjenja u terapiji kancera u smislu ostvarivanja

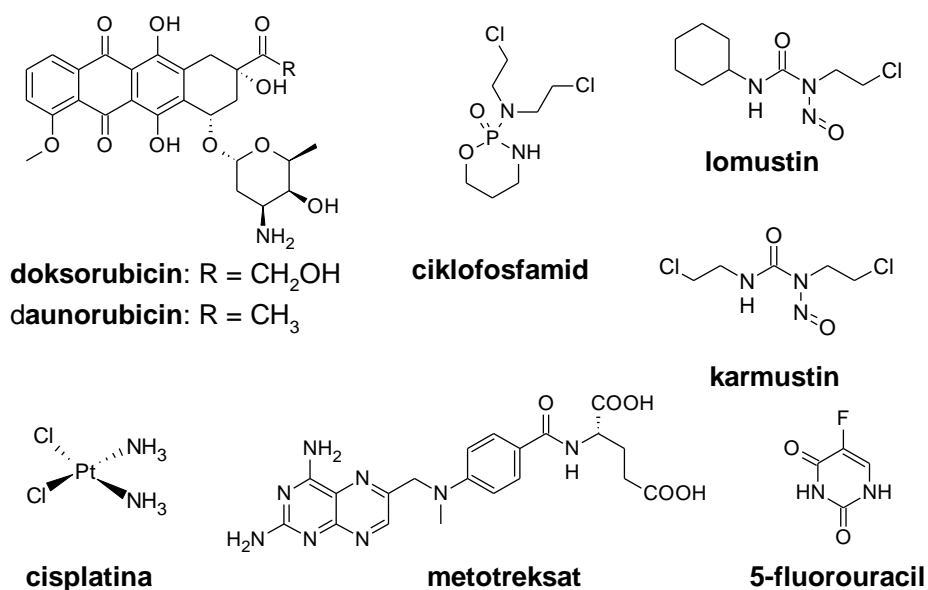
selektivnosti. Međutim, kako u organizmu i pod normalnim uslovima postoje brzorastuće ćelije, poput ćelija koštane srži, citotoksičnost hemoterapije se može odraziti na imunosistem.<sup>87</sup> Zato je neophodno ostvariti viši stepen selektivnosti lekova, koji se ne zasniva isključivo na razlikama u intenzitetu metaboličke aktivnosti ćelija tumora i normalnih ćelija.<sup>87</sup> Razvoj ciljane terapije omogućava postizanje bolje selektivnosti antitumorskih agenasa. Ciljana terapija, koja je predmet intenzivnih istraživanja, zasniva se na delovanju leka na molekulske mete, proteine čija je ekspresija specifično prekomerna u ćelijama tumora u poređenju sa ekspresijom istih proteina u zdravim ćelijama.<sup>96</sup> Potencijalna meta tretmana kancera može biti bilo koji od ćelijskih procesa koji učestvuju u proliferaciji i doprinose rastu i progresiji tumora. Naravno, poželjno je terapijski inhibirati više ćelijskih funkcija istovremeno kako bi se umanjila mogućnost prilagođavanja ćelije novonastalom stanju i razvijanje rezistencije.<sup>91</sup>

#### **2.2.2.1 Pregled antitumorskih lekova**

Prema mehanizmu delovanja, antitumorski terapeutici mogu se svrstati u nekoliko grupa: interkalirajući agensi, alkilujućii agensi, antimetaboliti, inhibitori kinaza, hormoni, imunoterapeutici, agensi koji utiču na dinamiku mikrotubula.

Najveći broj citotoksičnih agenasa utiče na funkciju DNK, direktno, menjajući strukturu DNK, ili inhibicijom enzima koji učestvuju u sintezi DNK (slika 11). U interkalirajuće lekove spadaju antraciklinski antibiotici daunorubicin i doksorubicin izolovani iz bakterija *Streptomyces*. Citotoksični antibiotici se nespecifično umeću između susednih nukleotida, zaustavljajući sintezu nukleinskih kiselina. Dodatno, inhibiraju topoizomerazu II, enzim koji učestvuje u uvijanju lanca DNK. Iako spadaju u najefikasnije lekove koji se koriste u terapiji kancera, primena citotoksičnih antibiotika je ograničena zbog ireverzibilnih kardiotoksičnih efekata.<sup>97</sup> Alkilujućii agensi se kovalentno vezuju za nukleinske baze, najčešće guanin u položaju N(7), sprečavajući replikaciju DNK.<sup>98</sup> Najstariji poznati alkilujućii lekovi su iperiti i nitrozouree. Predstavnik azotnih iperita, ciklofosamid, koristi se u terapiji limfoma i leukemije. Derivati nitrozouree karmustin i lomustin, zahvaljujući rastvorljivosti u lipidima, prolaze krvno-moždanu barijeru i koriste se u terapiji tumora mozga.<sup>99</sup> U alkilujuće agense svrstavaju se i kompleksi prelaznih metala, od kojih je najznačajniji kompleks platine, cisplatina. Cisplatina se vezuje za dve susedne purinske baze na lancu DNK. Posledica ovakvog vezivanja je izmenjena tercijsarna struktura DNK i rasplitanje DNK lanca, što

onemogućava replikaciju. Pored inhibicije replikacije, cisplatina utiče i na membranski transport i funkciju mitohondrija. Međutim, kontinuirana primena cisplatine izaziva nefrotoksične, neurotoksične, kardiotoksične i hepatotoksične efekte.<sup>100</sup> Hemoterapeutski antimetaboliti su analozi supstrata različitih enzima koji učestvuju u sintezi nukleotida. Najznačajniji predstavnici antimetabolita su metotreksat i 5-fluorouracil. Metotreksat, analog folne kiseline, je inhibitor dihidrofolat-reduktaze, enzima koji učestvuje u sintezi nukleotida i aminokiselina, dok je analog pirimidina, 5-fluorouracil, inhibitor timidilat-sintaze.<sup>101</sup>

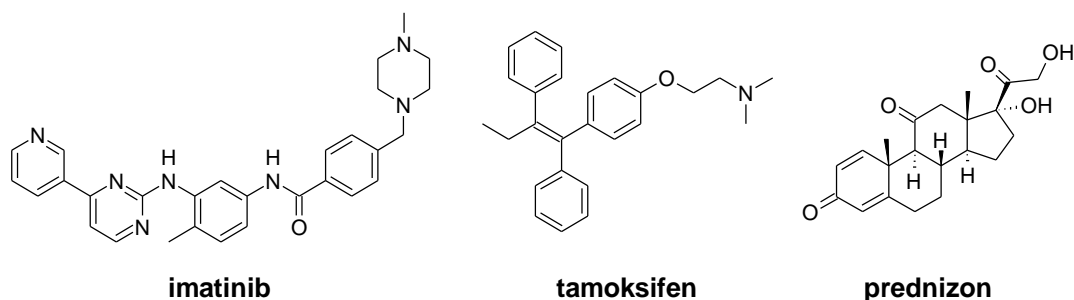


**Slika 11.** Strukture antitumorskih lekova koji utiču na sintezu i funkciju DNK

Istraživanja molekularnih mehanizama ćelijske signalizacije dovela su do saznanja da enzimi kinaze, čija je funkcija transfer  $\gamma$ -fosfatne-grupe ATP na proteine, imaju ključnu ulogu u onkogenezi. Kako je malignitet ćelija često posledica mutacija i visokog stepena ekspresije kinaza, ova klasa enzima predstavlja važnu metu ciljane terapije kancera. Trenutno, trećinu eksperimentalnih lekova u kliničkim ispitivanjima, čija su meta proteini, predstavljaju regulatori funkcije kinaza.<sup>102</sup> Na slici 12 prikazana je struktura imatiniba, inhibitora tirozin-kinaze, koji se primenjuje u terapiji hroničnog mijeloidnog limfoma i gastrointestinalnih kancera.

U terapiji hormonski zavisnih tumora, kao što su adenokarcinom dojke ili prostate, često se koriste hormoni i njihovi antagonisti. Visok stepen ekspresije receptora estrogena i progesterona je zabeležen kod 80% slučajeva karcinoma dojke.<sup>103</sup> Posledica

terapije inhibitorima aromataza, enzima koji učestvuju u sintezi estrogena, ili tamoksifenom (slika 12), selektivnim modulatorom receptora estrogena, je inhibicija proliferacije malignih ćelija. S druge strane, receptori glukokortikoida nemaju ulogu u onkogenezi, ali je nađeno da vezivanje glukokortikoida indukuje zastoj ćelijskog ciklusa i apoptozu u slučaju leukemije.<sup>104</sup> Na slici 12 prikazana je struktura glukokortikoida prednizona.



**Slika 12.** Strukture imatiniba, tamoksifena i prednizona

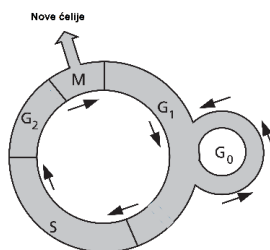
Imunoterapija predstavlja primenu monoklonskih antitela i blokatora inhibitora imunskih kontrolnih tačaka u ćelijama tumora s ciljem uspostavljanja odgovora imunostistema.<sup>105</sup> U poslednje vreme razvija se princip primene imunoterapije u kombinaciji sa hemoterapijom.<sup>106</sup>

Agensi koji utiču na dinamiku polimerizacije mikrotubula<sup>107</sup> biće predstavljeni u odeljku **2.2.3.**

### **2.2.3 Ćelijski ciklus**

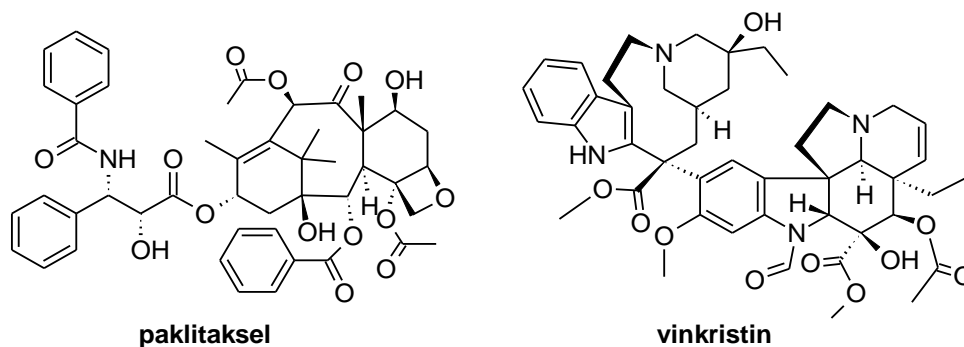
Ciklus događaja koji se odvija u toku rasta ćelije i deobe čini ćelijski ciklus. Ukratko, ćelijski ciklus se odvija u četiri faze: G1 (prva faza rasta), S (faza sinteze), G2 (druga faza rasta) i M (mitoza), tokom kojih se ćelijski materijal udvostručuje, vrši replikacija DNK, segregacija hromozoma i ravnomerna podela genetskog materijala u toku deobe ćelije (slika 13). U fazi G1 ćelija raste, odvija se biosinteza proteina, lipida i ugljenih hidrata i proverava DNK ćelije pre ulaska u S fazu, u kojoj se vrši se replikacija DNK. Na samom kraju S faze, ćelija sadrži dvostruko više genetskog materijala nego na početku. Naredna G2 faza predstavlja kontrolnu tačku u kojoj se odvija reparacija DNK i pripreme za mitozu. U fazi M, koja predstavlja mitozu, membrana jedra ćelije se dezintegriše, oslobođena DNK se pozicionira u polovima ćelije i formiraju se nova jedra.

U procesu citokineze u okviru M faze, od jedne ćelije nastaju dve ćerke ćelije. Novonastale ćelije mogu nastaviti ciklus ili ostati u stanju mirovanja (G<sub>0</sub> faza). Regulatori ovih procesa su proteini ciklini i ciklin-zavisne kinaze.<sup>108</sup> U normalnim ćelijama aktivacija ovih proteina je strogo kontrolisana. Intenzivna proliferacija koja promovira progresiju tumora posledica je brojnih neregularnosti u ćelijskom ciklusu. U malignim ćelijama često su ciklin-zavisne kinaze prekomerno eksprimovane, pa je inhibicija njihove aktivnosti neretko mehanizam dejstva terapeutskih agenasa.<sup>109</sup>



**Slika 13.** Shematski prikaz ćelijskog ciklusa<sup>87</sup>

Pored ovih inhibitora, u terapiji tumora koriste se i antimitotski agensi koji sprečavaju odvijanje deobe ćelije utičući na dinamiku polimerizacije mikrotubula.<sup>110</sup> Mikrotubule su glavna komponenta citoskeleta i imaju ulogu u kretanju ćelije, unutarćelijskom transportu, signalizaciji i ćelijskoj deobi. U deobi ćelije mikrotubule učestvuju u formiranju deobnog vretena, procesa koji se odvija tokom segregacije hromozoma. Osnovna podjedinica mikrotubula je heterodimer sastavljen od nekovalentno vezanih globularnih proteina  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulina. Antimitotski agensi poput taksana, vezivanjem za tubulin stabilizuju mikrotubule i sprečavaju depolimerizaciju, dok agensi kolhicinskog tipa i vinka-alkaloidi, vezivanjem za heterodimer destabilizuju mikrotubule i inhibiraju polimerizaciju.<sup>111</sup> Narušavanje ravnoteže procesa polimerizacije mikrotubula, bilo stabilizacijom polimera, ili inhibicijom polimerizacije, onemogućava formiranje deobnog vretena u metafazi, zaustavlja mitozu i dovodi do ćelijske smrti.<sup>112</sup> Strukture paklitaksela, predstavnika taksana i vinka-alkaloida vinkristina prikazane su na slici 14. Paklitaksel se primenjuje u terapiji kancera dojke, bešike, pluća i melanoma, dok se vinka-alkaloidi, u kombinaciji sa drugim lekovima, koriste u lečenju različitih vrsta leukemije.<sup>111</sup> Iako taksani i vinka-alkaloidi imaju kliničku primenu, njihova upotreba je ograničena usled rezistencije i izrazite neurotoksičnosti.<sup>107</sup>



**Slika 14.** Strukture agenasa koji utiču na dinamiku polimerizacije mikrotubula

#### 2.2.4 Programirana ćelijska smrt – apoptoza

Apoptoza je vid programirane ćelijske smrti koji se odigrava tokom razvoja i starenja ćelija radi održavanja stanja homeostaze u tkivima. Apoptoza se javlja kao odgovor na različite nepravilnosti u funkcionisanju ćelije. Dva glavna mehanizma po kojima se apoptoza odvija predstavljaju takozvani unutrašnji i spoljašnji put. Prema predlogu Komiteta za nomenklaturu ćelijske smrti 2018 (NCCD, *Nomenclature Committee on Cell Death 2018*) unutrašnja apoptoza je inicirana smetnjama u unutarćelijskoj ili vanćelijskoj mikrookolini, a karakteriše je permeabilizacija spoljašnje mitohondrijske membrane.<sup>113</sup> Spoljašnji put apoptoze počinje promenama u vanćelijskom prostoru koje detektuju receptori na površini membrane, što dovodi do niza događaja, koji su često zajednički za oba mehanizma. Unutrašnjim putem apoptoze upravljaju proapoptozni i antiapoptozni proteini Bcl-2 familije, koji kontrolišu oslobađanje citohroma *c* iz mitohondrija promenom permeabilnosti mitohondrijske membrane. Oslobađanje citohroma *c* rezultuje formiranjem proteinskog kompleksa apoptozoma, koji indukuje aktivaciju proteolitičkih enzima kaspaza.<sup>114</sup> Uloga kaspaza je - fragmentacija jedra ćelije i komponenata citoskeleta.<sup>115</sup>

Za razliku od nekroze, ćelije u apoptozi formiraju apoptotska tela uz očuvanje celovitosti ćelijske membrane, tako da sadržaj ćelije ne dospeva u vanćelijsku sredinu, što eliminiše mogućnost inflamacije okolnog tkiva.<sup>114</sup> Makrofage vrše fagocitozu apoptotskih tela prepoznajući ih na osnovu fosfatidil-serina, proteina koji se premešta sa unutrašnje strane membrane citoplazme ka spoljašnjoj.<sup>116</sup>

Najčešći mehanizmi supresije apoptoze, kojim se maligne ćelije služe u procesu razvoja i progresije kancera, obuhvataju pojačanu ekspresiju gena antiapoptoznih

proteina i mutaciju tumorsupresorskog gena koji kodira protein p53. Pod normalnim uslovima, nakon oštećenja DNK ili oksidativnog stresa, u ćeliji se aktivira protein p53, koji zaustavlja ćelijski ciklus ili pokreće apoptozu, aktivirajući proapoptozne proteine Bcl-2 familije. Kod više od 50% poznatih vrsta kancera zabeležen je izostanak funkcije p53 proteina kao posledica mutacije odgovarajućeg gena.<sup>117</sup> Uspostavljanje ove funkcije i indukcija apoptoze jedna je od strategija istraživanja usmerenim na pronalaženje inhibitora proliferacije malignih ćelija.

#### **2.2.4.1 Reaktivne kiseonične vrste i oksidativni stres**

Reaktivne kiseonične vrste (ROS, *Reactive Oxygen Species*) poput H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoksida ili hidroksi-radikala, neprekidno se generišu i eliminišu u ćelijama. Izvor ROS su enzimski procesi koji se odvijaju u mitohondrijama, peroksizomima i endoplazmatičnom retikulumu.<sup>118</sup> U normalnim fiziološkim uslovima, ROS u niskim koncentracijama imaju važnu ulogu u procesima prenosa signala bioloških procesa, aktivaciji enzima, ekspresiji gena, formiranju disulfidne veze proteina i kontroli aktivnosti kaspaza tokom apoptoze. Oksidativni stres je stanje u kojem produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta prevazilazi odbrambene sposobnosti antioksidativnog sistema ćelije. Posledica ovakvog stanja je poremećaj signalizacije fizioloških procesa, oštećenja DNK, lipida i proteina.<sup>119</sup>

Povećana proizvodnja ROS doprinosi inicijaciji, progresiji i metastazi kancera. Do genomske nestabilnosti mogu dovesti oksidativna oštećenja DNK prouzrokovana reaktivnim kiseoničnim vrstama. Takođe, ROS promovišu prekomernu aktivaciju receptora faktora rasta i unutarćelijsku signalizaciju vezanu za proliferaciju ćelije. Kontradiktorno, jedan od pristupa u lečenju kancera oslanja se na izazivanje oksidativnog stresa, prekomerne produkcije upravo visoko reaktivnih kiseoničnih vrsta. Hemoterapija i jonizujuće zračenje su metode koje mogu dovesti do povećane proizvodnje ROS i različitih tipova ćelijske smrti. Na primer, apoptozu indukovanu oksidativnim stresom karakterišu oksidativne modifikacije proteinskih kompleksa koji formiraju permeabilizacione pore na mitohondrijskoj membrani. Neretko, smanjivanje nivoa ROS takođe je jedna od strategija u terapiji kancera.<sup>120</sup> Pristup smanjivanja nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta u antitumorskoj terapiji opravdava se inhibicijom procesa koji učestvuju u proliferaciji ćelija tumora.<sup>121</sup> Dodatno, nekoliko studija na životinjskim modelima



pokazalo je da inhibicija produkcije ROS dovodi do smanjenja metastaznog potencijala malignih ćelija.<sup>122</sup>

### **2.2.5 Invazivnost i metastaza**

Patološki najopasnija karakteristika malignih ćelija je sposobnost metastaze, migracije ćelija iz izvornog tkiva i naseljavanja (kolonizacije) udaljenog tkiva u istom organizmu, pri čemu se formira sekundarni tumor. Smatra se da se 90% smrtnih slučajeva prouzrokovanih kancerom dešava usled posledica metastaznog širenja tumora.<sup>123</sup> Metastazu tumora omogućava sklonost malignih ćelija da indukuju nastajanje krvnih sudova, angiogenezu i sposobnost invazije kroz tkivne membrane.

Tokom rasta tumora, intenzivna proliferacija malignih ćelija zahteva veliku količinu kiseonika i hranljivih materija. Iz tog razloga, maligne ćelije dejstvom metaloproteaza matriksa razaraju bazalne membrane krvnih sudova i oslobađanjem prekomerno eksprimovanog faktora rasta vaskularnog endotelijuma, VEGF (*Vascular Endothelium Growth Factor*) podstiču deobu ćelija endotela krvnih i limfnih sudova. Na ovaj način formira se sistem kapilara koji dodatno snabdeva tumor neophodnim nutrijentima. Vaskularni sudovi nastali intenzivnom angiogenezom su strukturno neorganizovani i propustljivi. Propustljivost vaskularnih sudova u blizini tumora iskorišćena je u ciljanoj terapiji kancera makromolekulima, jer se omogućava selektivna akumulacija terapeutika.<sup>87</sup>

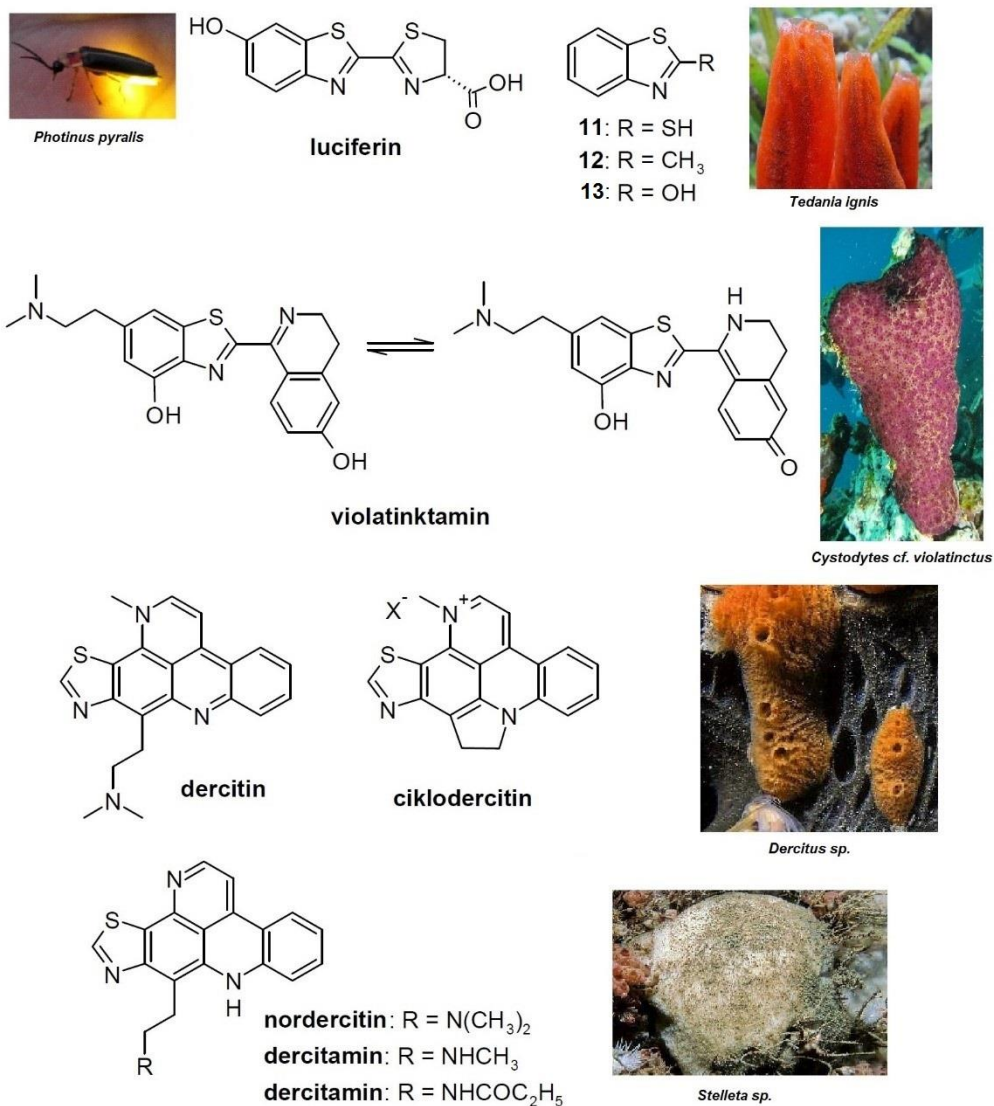
Sposobnost malignih ćelija da napuste primarni tumor i odvoje se od ćelija koje ih okružuju pospešuje neregularna funkcija transmembranskih proteina poput kaderina i integrina koji kontrolišu međusobnu povezanost ćelija, kao i vezivanje ćelija za ekstracelularni matriks. Pod normalnim uslovima, ćelije koje su izgubile sposobnost adhezije podležu apoptozi. Fenomen apoptoze koja prati gubitak sposobnosti adhezije zove se anoikis. Međutim, maligne ćelije su razvile niz mehanizama rezistencije prema anoikisu. Invazivnost predstavlja sposobnost ćelije da prolazi kroz tkivne barijere razarajući ekstracelularni matriks, ili ameboidnom migracijom koja uključuje mehaničku silu. Ćelije postižu razaranje ekstracelularnog matriksa i vaskularne membrane proteolitičkom aktivnošću metaloproteaza.<sup>124</sup> Ukoliko ćelije tumora opstanu u cirkulaciji i dejstvom proteolitičkih enzima napuste vaskularni sud, angiogenezom mogu se vezati

za neko drugo tkivo. Proliferacija malignih ćelija vezanih za novo tkivo rezultuje formiranjem kolonija i nastankom sekundarnog tumora.<sup>123</sup>

Mehanizam dejstva uobičajenih lekova koji se primenjuju u terapiji kancera uglavnom se zasniva na inhibiciji proliferacije malignih ćelija. Sa boljim razumevanjem ćelijskih procesa uključenih u metastazno širenje tumora definisane su potencijalne metode delovanja antimetastaznih agenasa. Inhibicija ćelijske migracije, metaloproteaza matriksa i angiogeneze, aktivacija anoikisa i imunološkog odgovora makrofaga u cirkulaciji, neke su od strategija u razvoju antimetastaznih terapeutika.<sup>124</sup> Predmet intenzivnih istraživanja je i, u maloj meri zastupljena u tumoru, populacija matičnih ćelija za koje se smatra da su rezistentne prema konvencionalnoj terapiji kancera i da mogu biti odgovorne za metastazno širenje tumora.<sup>125</sup>

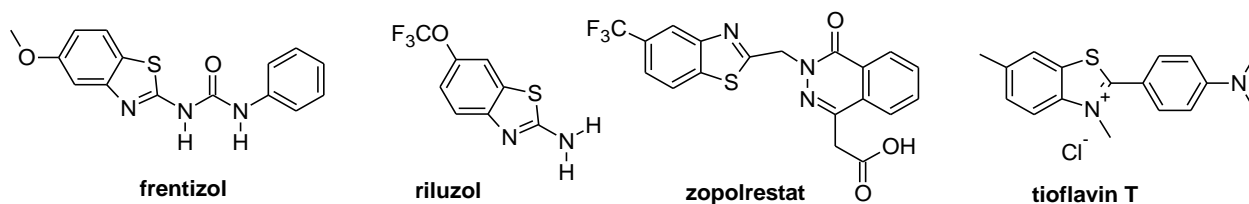
### 2.2.6 Derivati benzotiazola u medicinskoj hemiji

Benzotiazoli predstavljaju grupu jedinjenja čija struktura u osnovi sadrži benzen kondenzovan sa prstenom 1,3-tiazola. Sam benzotiazol je prvi put izolovan 1967. godine iz isparljivih komponenti američkih brusnica *Vaccinium macrocarpon*.<sup>126</sup> Jezgro benzotiazola je strukturni konstituent svega nekoliko prirodnih proizvoda (slika 15). Najpoznatiji je luciferin izolovan iz američkih svitaca *Photinus pyralis*.<sup>127</sup> Poznato je nekoliko derivata benzotiazola proizvoda metabolizma morskih organizama. Sekundarni metaboliti bakterije *Micrococcus sp.* u simbiozi sa sunderom *Tedania ignis* su jednostavni derivati benzotiazola (jedinjenja **11–13**).<sup>128</sup> Ljubičasti pigment violatinktamin izolovan je iz *Cystodytes cf. violatinctus* plaštaša (tip hordata).<sup>129</sup> Alkaloidi dercitin i ciklodercitin, izolovani iz morskih sundera *Dercitus sp.* i njima srodna jedinjenja nordercitin, dercitamin i dercitamid, izolovani iz sundera *Stelletta sp.*, iskazuju antiproliferativno dejstvo prema ćelijskoj liniji mišje leukemije, P388.<sup>130</sup>



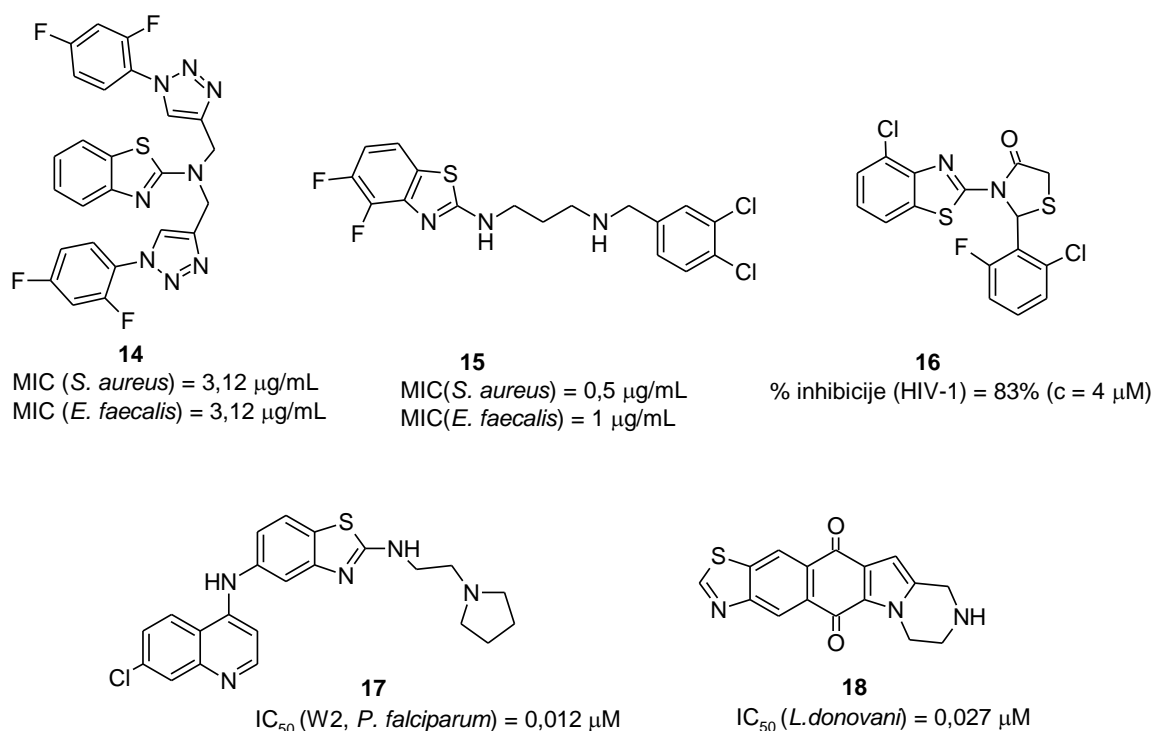
**Slika 15.** Prirodni proizvodi derivati benzotiazola

Na slici 16 prikazani su sintetički derivati benzotiazola koji se primenjuju u klinici. Frentizol je imunosupresivni agens,<sup>131</sup> riluzol se primenjuje u terapiji amiotrofične lateralne skleroze,<sup>132</sup> dok se zopolrestat, inhibitor aldehyd-reduktaze, koristi u tretmanu komplikacija nastalih kao posledica dijabetesa.<sup>133</sup> Više od 50 godina se tioflavin T koristi kao fluorescentna proba za selektivno *in vitro* i *in vivo* bojenje i identifikaciju amiloidnih fibrila kod Alchajmerove bolesti.<sup>134</sup>



**Slika 16.** Derivati benzotiazola sa farmakološkom primenom

Oba konstitutivna jezgra benzotiazola, benzenov prsten i tiazolov, pogodna su za različite hemijske transformacije. Najčešće su biološki aktivni derivati benzotiazola supstituisani u položajima C(2), C(5) i C(6). Sintetički derivati benzotiazola iskazuju vrlo širok spektar bioloških aktivnosti u *in vitro* uslovima.<sup>135</sup> Na slici 17 prikazana su odabrana jedinjenja sa zapaženom biološkom aktivnošću. Pored antimikrobnih (**14** i **15**)<sup>136</sup> i antiviralnih agenasa (**16**),<sup>137</sup> sintetisani su i benzotiazoli sa antiparazitskom aktivnošću (**17** i **18**).<sup>138</sup>

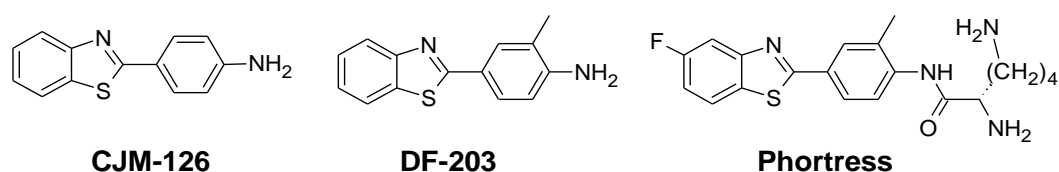


**Slika 17.** Biološki aktivni derivati benzotiazola

Posebna pažnja istraživača posvećena je ispitivanju derivata benzotiazola koji iskazuju antitumorsku aktivnost.<sup>135,139</sup>

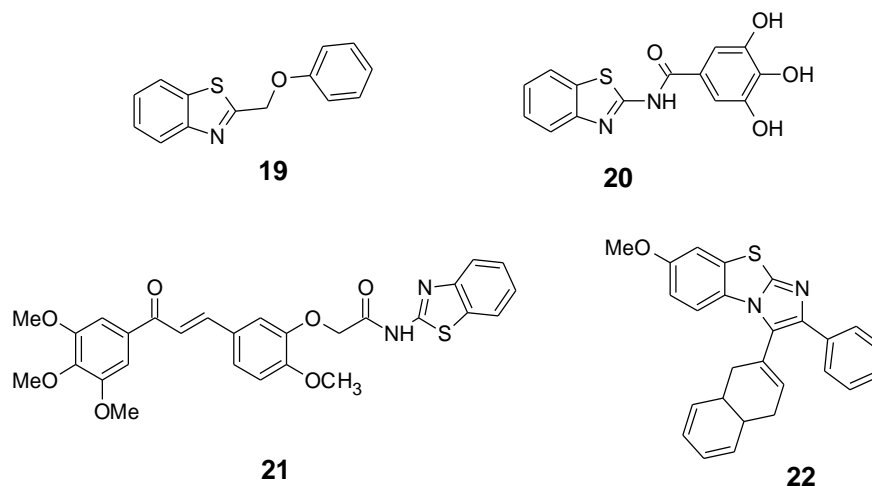
### 2.2.6.1 Antitumorska aktivnost derivata benzotiazola

Rezultati ispitivanja antitumorske aktivnosti derivata benzotiazola prema različitim ćelijskim linijama humanog kancera u *in vitro* i *in vivo* uslovima ukazuje na to da ovaj strukturni motiv pruža važan doprinos farmakološkim osobinama potencijalnih terapijskih agenasa. Među prvim benzotiazolima sa antitumorskom aktivnošću sintetisani su polihidroksilovani derivati 2-fenilbenzotiazola, strukturni analozi biološki aktivnih prirodnih flavonoida kvercetina i genistajna.<sup>140</sup> Iako sintetisani benzotiazoli nisu ostvarili značajnu očekivanu aktivnost, ovo istraživanje vodilo je razvoju strukturno jednostavnijeg vodećeg jedinjenja CJM-126 i serije 2-aril-supstituisanih benzotiazola (slika 18) sa nanomolarnom antiproliferativnom aktivnošću prema nekoliko ćelijskih linija humanog kancera dojke.<sup>141</sup> Dalji razvoj strukture jedinjenja CJM-126 rezultovao je sintezom jedinjenja DF-203 sa višom *in vivo* aktivnošću<sup>142</sup> i kliničkog kandidata Phortress sa unapređenom biodostupnošću i metaboličkom stabilnošću.<sup>143</sup> Mehanizam dejstva 2-fenil-supstituisanih derivata ukazuje na aktivaciju CYP1A1, vezivanje za DNK i indukciju apoptoze.<sup>144</sup>



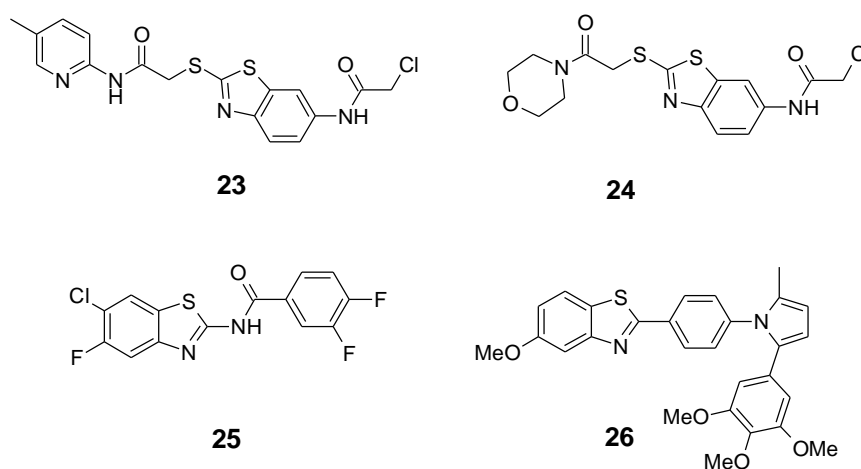
**Slika 18.** Strukture 2-fenil-derivata benzotiazola sa antitumorskom aktivnošću

Derivati benzotiazola (slika 19) iskazuju antitumorsku aktivnost različitim mehanizmima dejstva. Fenoksimetil-supstituisani benzotiazol **19** i amidni derivat **20** efikasni su inhibitori topoizomeraza, enzima koji učestvuju u uvijanju lanca DNK.<sup>145</sup> Inhibitori polimerizacije mikrotubula, halkonski derivat **21**<sup>146</sup> i 2-fenilimidazobenzotiazol **22**,<sup>147</sup> iskazuju antiproliferativno dejstvo zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G2/M fazi.



**Slika 19.** Odabrane strukture derivata benzotiazola sa različitim mehanizmom antitumorskog dejstva

Mehanizam antitumorskog dejstva jedinjenja **23–26** prikazanih na slici 20, čija se struktura zasniva na benzotiazolu, uključuje indukciju apoptoze u HeLa i MCF-7 ćelijskim linijama humanog karcinoma.<sup>148</sup>



**Slika 20.** Derivati benzotiazola koji indukuju apoptozu u ćelijama humanog kancera

### 2.2.7 Antitumorska aktivnost hinolinskih antimalarika

Razvoj jednog terapeutika od sinteze do kliničke primene dugotrajan je i skup proces. Iznalaženje nove namene lekova koji su već u upotrebi, strategija je za efikasniji put do uspešne terapije. Dobro poznavanje mehanizma delovanja pojedinih agenasa pruža osnovu za ispitivanje datog agensa, delotvornog u jednom polju, u terapiji drugih oboljenja i stanja, u vidu monoterapije ili kombinacije sa postojećim lekovima.

Pored višedecenijske primene u tretmanu malarije, **CQ** se zbog svoje dostupnosti, netoksičnosti po ljude i antiinflamatornih osobina, koristi u lečenju reumatoidnog artritisa i sistemskog lupusa.<sup>149</sup> Kada je reč o antitumorskoj aktivnosti, po analogiji sa akumulacijom u kiseloj vakuoli parazita malarije, slabo bazni antimalarik **CQ** i drugi derivati hinolina poput **MFQ** i kinina, zadržavaju se u lizozomima ćelija tumora i dovode do inhibicije autofagije.<sup>150</sup> Autofagija je proces u kome ćelija razgrađuje nepotrebne ćelijske komponente, a proizvode razgradnje reciklira, promovišući na taj način preživljavanje. Ovaj proces je često kod ćelija tumora prenaplašen i doprinosi razvoju rezistencije na terapeutike.<sup>151</sup> Inhibicija autofagije dovodi do stresa endoplazmatskog retikuluma, što indukuje apoptozu ćelija tumora.<sup>150</sup> Pored inhibicije autofagije, **CQ**, kao slabo bazno jedinjenje ( $pK_{a1}=8,1$ ;  $pK_{a2}=10,2$ )<sup>38</sup> smanjuje kiselost u lizozomima i tako onemogućava funkciju intracelularnog P-glikoproteina (P-gp). P-gp je protein čija prekomerna ekspresivnost kod pojedinih ćelijskih linija kancera dovodi do pojačanog efluksa citostatika iz ćelije ili nemogućnosti citostatika da napusti lizozom i dospe do mete delovanja.<sup>152</sup> Odatle i drugi naziv za ovaj protein, MDR1, protein višestruke rezistencije (*Multidrug Resistance Protein 1*). Nađeno je da inhibicija autofagije i interferencija sa funkcijom P-gp hinolinskih derivata pojačavaju efikasnost hemoterapije uobičajenim antitumorskim lekovima, poput terapije doksorubicinom,<sup>153</sup> i paklitakselom,<sup>154</sup> pa se poslednjih godina kombinovana terapija intenzivno ispituje u kliničkim studijama.<sup>155</sup> Takođe, predmet opsežnih istraživanja predstavlja i sinteza novih hinolinskih derivata koji bi ispoljili antitumorsko dejstvo, ili sinergizam sa ustanovljenim terapeutcima.<sup>149</sup>

### 3. NAŠI RADOVI

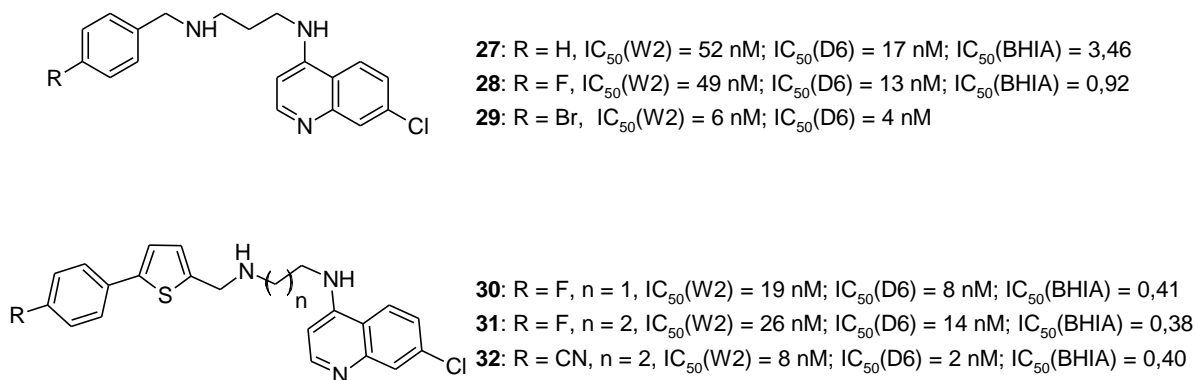
Malarija je jedna od najrasprostranjenijih parazitskih bolesti na svetu, dok su maligna oboljenja drugi po redu uzročnik smrti u razvijenim zemljama. Pronalaženje efikasnog terapijskog agensa jedan je od imperativa istraživanja na ovim poljima.

#### 3.1 Naša dosadašnja istraživanja u oblasti sinteze i bioloških ispitivanja potencijalnih antimalarika

Uprkos široko rasprostranjenoj rezistenciji parazita malarije prema najviše upotrebljavanom antimalariku **CQ**, zbog dostupnosti i netoksičnosti<sup>156</sup> hinolinsko jezgro i dalje predstavlja osnovu za strukturne modifikacije, s ciljem poboljšanja antimalarijske aktivnosti i prevazilaženja rezistencije.

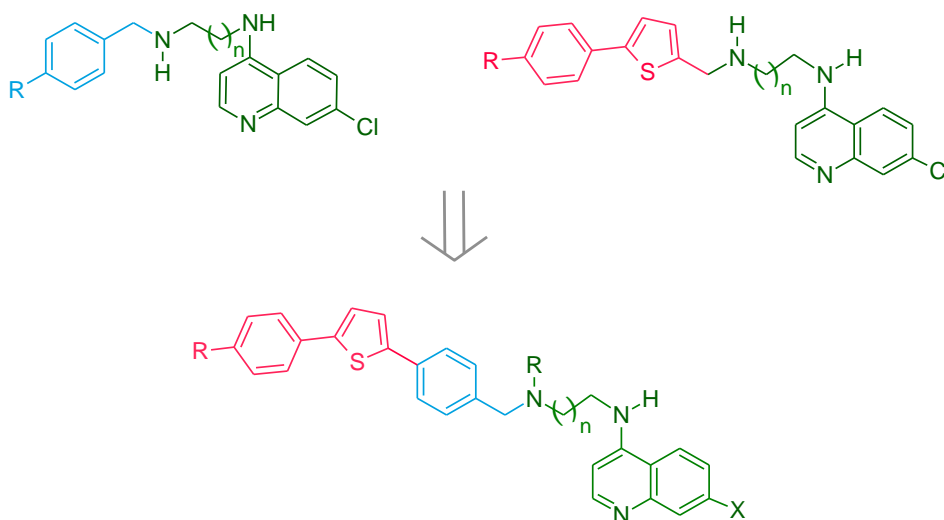
Dosadašnja istraživanja istraživačke grupe profesora Šolaje u oblasti sinteze i biološke aktivnosti antimalarika pokazala su da derivati holne kiseline kao nosači aminohinolina povoljno utiču na inhibiciju razvoja parazita *P. falciparum* u *in vitro* uslovima.<sup>157,158</sup> Sa ciljem identifikacije efikasnog inhibitora proliferacije parazita, jednostavnije strukture i sa manjom molekulskom masom, dizajnirana je i sintetisana serija aminohinolina koji su alkil-nizom povezani sa različitim aromatičnim grupama kao nosačima aminohinolinske farmakofore (slika 21). Benzilamini (**27–29**), povezani kratkim alkil-nizom sa aminohinolinskom grupom, pokazali su značajnu antimalarijsku aktivnost u *in vitro* uslovima prema CQ-osetljivim i CQ-rezistentnim sojevima *P. falciparum*.<sup>159</sup> Uvođenje tiofena između fenil-grupe i aminohinolina (**30–32**), dovelo je do poboljšanja sposobnosti inhibicije nastajanja  $\beta$ -hematina u *in vitro* uslovima, što je pokazano korišćenjem BHIA eseja ( $\beta$ -hematin inhibitory activity assay), najverovatnije usled ostvarivanja snažnijih  $\pi$ - $\pi$  slažućih interakcija. Uprkos značajnoj antiplazmodijalnoj *in vitro* aktivnosti, jedinjenja **27** i **30–32** nisu se pokazala uspešnim u *in vivo* uslovima eksperimentalne malarije u modelu miša.<sup>160</sup>





**Slika 21.** Benzenov prsten i supstituisani tiofen kao nosači aminohinolinske farmakofore sa antimalarijskom aktivnošću<sup>159,160</sup>

Nastavak istraživanja u oblasti ispitivanja uticaja strukture jedinjenja na antimalarijsku aktivnost oslanja se na prethodno navedene rezultate. S ciljem poboljšanja antimalarijske aktivnosti, osmišljena su nova jedinjenja na način prikazan na slici 22.



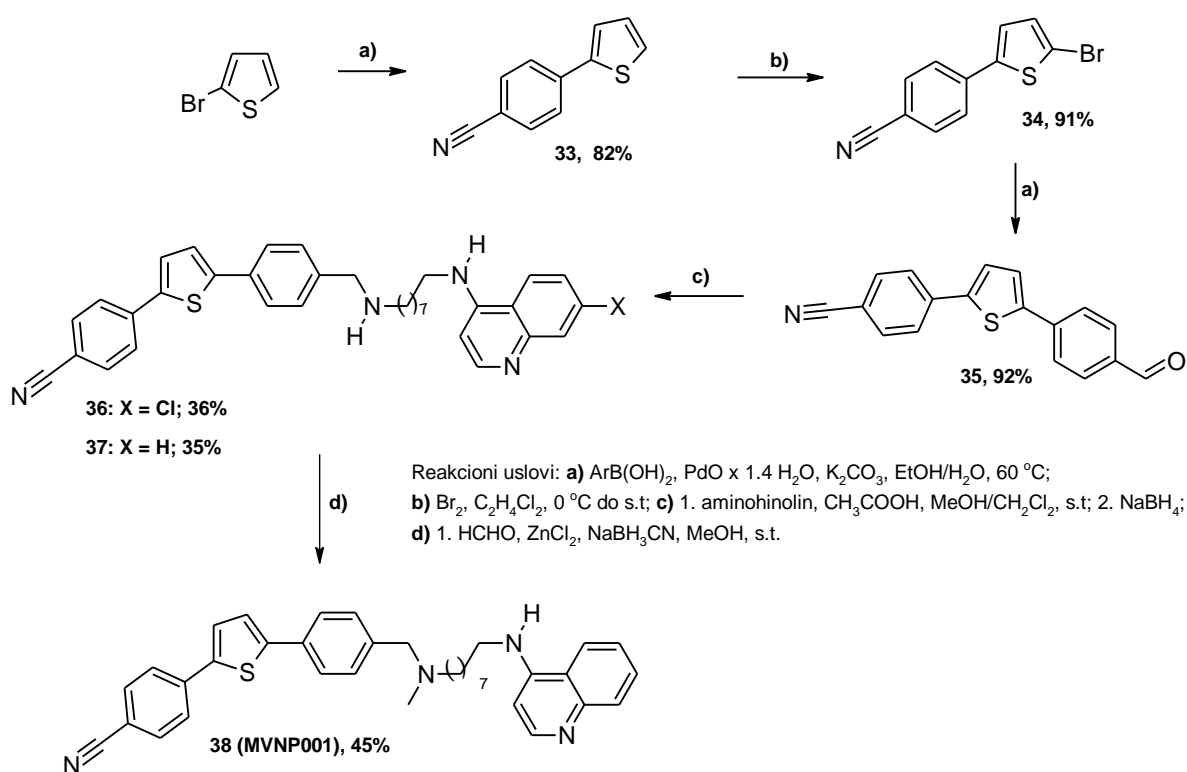
**Slika 22.** Dizajn novih derivata 4-aminohinolina

Pored uvođenja dodatnog  $\pi$ -sistema, ispitano je i kako dužina alkil-mosta utiče na biološku aktivnost (n = 1–5). Nova serija derivata tiofena aktivnija je prema CQ-rezistentnim sojevima *P. falciparum* u poređenju sa samim CQ u *in vitro* uslovima. Za razliku od jedinjenja **27–32**, koji su aktivniji prema CQ-osetljivom soju parazita, nova jedinjenja pokazala su veći stepen inhibicije proliferacije CQ-rezistentnog soja parazita W2 u poređenju sa stepenom inhibitorne aktivnosti iskazane prema CQ-osetljivom soju

D6.<sup>161</sup> Činjenica da je derivat sa šest metilenskih grupa najaktivniji prema rezistentnom soju parazita W2, usmerila je naše dalje istraživanje ka derivatima sa dužim alkil-nizom.

### 3.2 Sinteza novih potencijalnih inhibitora proliferacije parazita *P. falciparum*

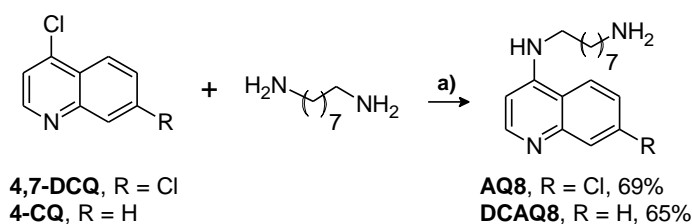
Tokom izrade ove disertacije sintetisani su novi derivati sa mostom sastavljenim od osam metilenskih grupa, koji povezuje aromatični nosač sa aminohinolinskom farmakoforom. Sinteza tri cijano-derivata **36–38** (MVNP001) prikazana je na shemi 1.



Shema 1. Sinteza derivata **36–38** (MVNP001)

Suzukijevim kuplovanjem komercijalno dostupnog 2-bromtiofena sa 4-cijanofenilboronskom kiselinom u prisustvu katalizatora  $\text{PdO} \times 1,4 \text{ H}_2\text{O}$ ,<sup>162</sup> u rastvaračima etanolu i vodi, sa bazom  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , sintetisano je jedinjenje **33**. Bromovanje tiofenskog jezgra postignuto je ukapavanjem rastvora broma u 1,2-dihloretanu u rastvor **33** u istom rastvaraču na  $0^\circ\text{C}$ .<sup>163</sup> Ključni intermedijer **35** sintetisan je u prinosu 92% već navedenim Suzukijevim kuplovanjem bromida **34** sa 4-formilfenilboronskom kiselinom primenom katalizatora  $\text{PdO} \times 1,4 \text{ H}_2\text{O}$ . Aldehid **35** podvrgnut je reakcijama reduktivnog aminovanja sa odgovarajućim derivatima aminohinolina **AQ8** i **DCAQ8** u smeši rastvarača  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  u prisustvu glacijalne sirćetne kiseline na sobnoj temperaturi.

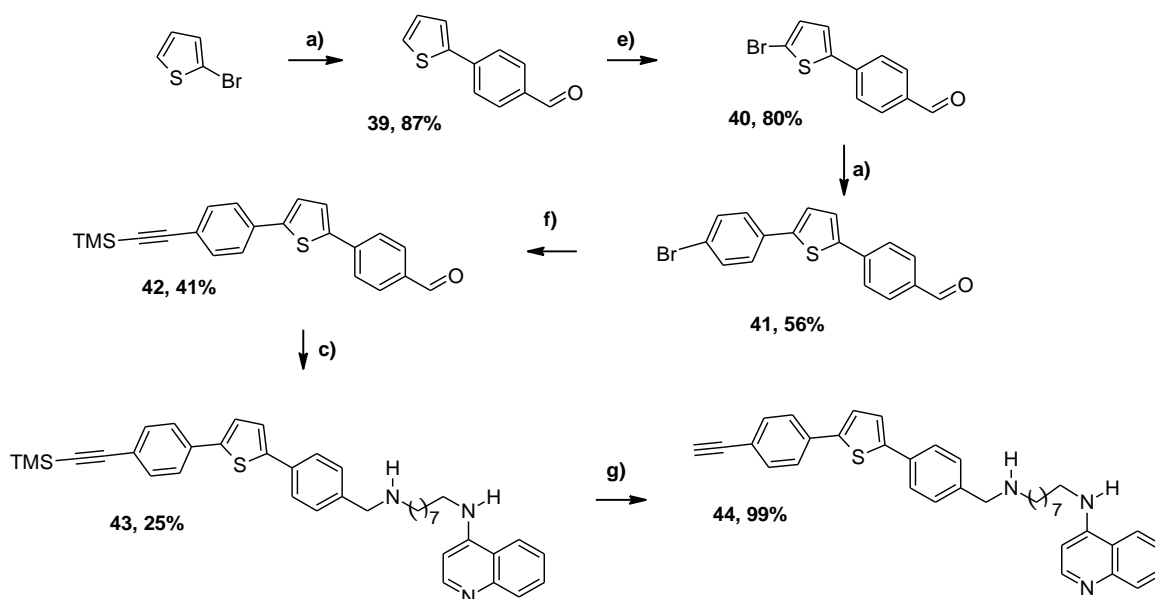
Kao redukciono sredstvo upotrebljen je NaBH<sub>4</sub>. Posle višestrukog hromatografskog prečišćavanja, dobijeni su derivati **36** i **37** u prinosima 36% i 35%, redom. Aminohinolin **AQ8** i njegov analog bez hlora na hinolinskom jezgru **DCAQ8**, sintetisani su iz odgovarajućih hinolina i 1,8-diaminoalkana reakcijom nukleofilne aromatične supstitucije, zagrevanjem u mikrotalasnom reaktoru (shema 2). Metilovanje benzilne amino-grupe jedinjenja **37** ostvareno je 37% vodenim rastvorom formaldehida pomoću NaCNBH<sub>3</sub> u prisustvu ZnCl<sub>2</sub> na sobnoj temperaturi. Derivat **38** (**MVNP001**) sintetisan je u prinosu 45%.



a) MW 1. 80 °C, 15 min; 2. 95 °C, 30 min; 3. 140 °C, 2 h

### Shema 2. Sinteza aminohinolina **AQ8** i **DCAQ8**

Radi ispitivanja značaja cijano-grupe vezane za aromatični nosač aminohinolinske farmakofore za antimalarijsku aktivnost sintetisan je derivat **44** sa etinil-supstituentom. Jedinjenje **44** sintetisano je u šest reakcionih koraka polazeći od 2-bromtiofena (shema 3).



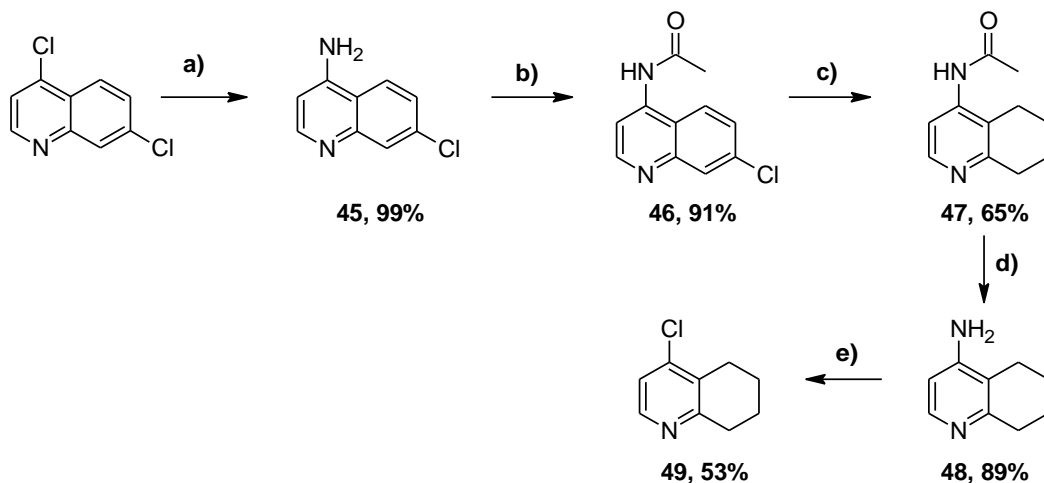
**a)** ArB(OH)<sub>2</sub>, PdO x 1,4 H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH/H<sub>2</sub>O, 60 °C; **c)** 1. DCAQ8, CH<sub>3</sub>COOH, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, s.t.; 2. NaBH<sub>4</sub>;  
**e)** NBS, THF, s.t.; **f)** Etiniltrimetilsilan, PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub>, CuI, Et<sub>2</sub>NH, DMF, 120 °C, MW; **g)** K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, s.t.

### Shema 3. Sinteza etinil-derivata 44

Suzukijevim kuplovanjem 2-bromtiofena i 4-formilfenilboronske kiseline, postupkom u kome katalizator nastaje *in situ* iz Pd(OAc)<sub>2</sub> i PPh<sub>3</sub>, u smeši rastvarača toluena i metanola na 110 °C, u prisustvu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, sintetisano je jedinjenje **39**. Bromovanje **39** izvedeno je *N*-bromsukcinimidom u THF u mraku u prinosu 80%. U sledećem koraku, jedinjenje **40** je kuplovano sa 4-bromfenilboronskom kiselinom pod istim reakcionim uslovima kao u prvoj fazi. U reakciji tako dobijenog jedinjenja **41** sa etiniltrimetilsilanom, u uslovima Sonogaširinovog kuplovanja, dobijeno je jedinjenje **42**. Sonogaširino kuplovanje izvedeno je sa PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> i PPh<sub>3</sub>, u prisustvu Et<sub>2</sub>NH i katalitičkih količina CuI u DMF, zagrevanjem na 120 °C u mikrotalasnom reaktoru. Reduktivnim aminovanjem aldehida **42** u prisustvu amina **DCAQ8** po već opisanom postupku sa NaBH<sub>4</sub>, dobijeno je jedinjenje **43** u niskom prinosu 25%. Baznom hidrolizom trimetilsilil-grupe jedinjenja **43** u metanolu na sobnoj temperaturi, dobijen je derivat **44** u kvantitativnom prinosu.

U literaturi je zabeleženo da jedinjenja, koja u svojoj strukturi sadrže redukovani piridinski prsten hinolinskog jezgra (1,2,3,4-tetrahidrohinolini), pokazuju aktivnost prema 3D7 i K1 sojevima *P. falciparum*, ujedno inhibirajući aktivnost proteina farneziltransferaze.<sup>164,165</sup> S druge strane, pored zapaženog anti-HIV<sup>166</sup> i antitumorskog dejstva,<sup>167</sup> do sada, nije poznato antimalarijsko dejstvo derivata 5,6,7,8-

tetrahidrohinolina. U okviru ovog istraživanja, s ciljem ispitivanja uticaja gubitka planarnosti aminohinolinske farmakofore na antimalarijsku aktivnost, sintetisani su derivati sa 5,6,7,8-tetrahidrohinolinskim jezgrom. Sintetisani su analozi **CQ** i **AQ13**, koji nemaju hlor u položaju C(7) hinolinskog jezgra, **50** i **51**, redom, kao i jedinjenja **53** i **54**, koja predstavljaju analoge jedinjenja **37** i **38** (**MVNP001**). Sinteza redukovano hinolinskog jezgra i ključnog intermedijera **49** prikazana je na shemi 4.

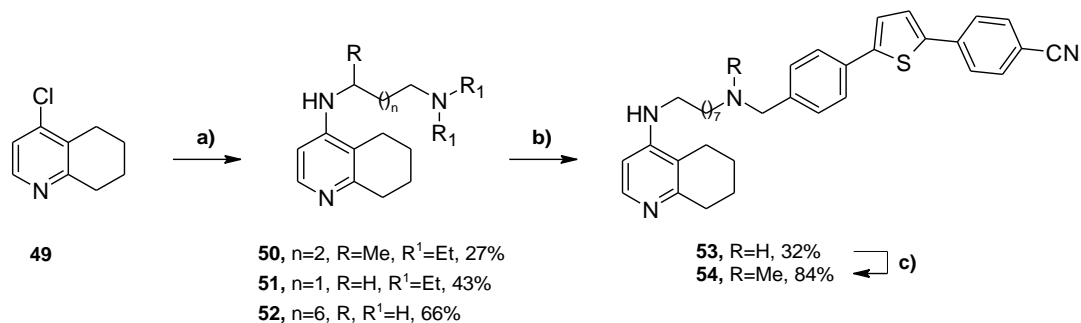


**a)** fenol,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 110 do 165 °C; **b)** 1)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 150 °C, 2h, 2)  $\text{NaCl}$ ; **c)**  $\text{PtO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{AcOH}$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  
**d)** 2M  $\text{HCl}$ , 70 °C; **e)** 1)  $\text{AcOHglac}$ , 28%  $\text{HCl}$ ,  $\text{NaNO}_2$  ( $\text{H}_2\text{O}$ ), 0 °C, 2)  $\text{CuCl}$ , 28%  $\text{HCl}$ , 0 °C do s.t.

#### Shema 4. Redukcija derivata hinolina i sinteza jedinjenja **49**

Da bi se efikasno ostvarila selektivna hidrogenizacija benzenovog prstena hinolina,<sup>168</sup> bilo je neophodno uvođenje acetamidne funkcije u položaj C(4) hinolinskog jezgra polazeći od 4,7-dihlorhinolina po postupku opisanom u literaturi.<sup>169</sup> Jedinjenje **45** sintetisano je dodavanjem čvrstog  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  u rastvor 4,7-dihlorhinolina u fenolu na 110 °C i mešanjem na 165 °C. Posle neutralizacije ovako nastale  $\text{HCl}$  soli mešanjem sa 10%  $\text{NaOH}$ , dobijen je amin **45** u kvantitativnom prinosu. Zagrevanjem **45** u anhidridu sirćetne kiseline uz reflux sintetisan je acetamid **46** u visokom prinosu (91%). Benzenov prsten hinolinskog jezgra jedinjenja **46** redukovano je katalitičkom hidrogenizacijom pomoću  $\text{PtO}_2$  u sirćetnoj kiselini u prisustvu katalitičke količine  $\text{HClO}_4$ . Istovremeno sa hidrogenizacijom benzenovog prstena odvija se i hidrogenoliza hlora u položaju C(7). Tetrahidrohinolinski derivat **47** dobijen je u umerenom prinosu 65%. Jedinjenje **48**, dobijeno kiselom hidrolizom acetamidne grupe<sup>170</sup> jedinjenja **47**, transformisano je u hlorid **49** u prinosu 53% pod uslovima Sandmeyer-ove reakcije ( $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{AcOH}$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{CuCl}$ ).

Buchwald-Hartwig-ovom reakcijom aminovanja halogenida u prisustvu Pd(OAc)<sub>2</sub> i SPhos, u reakciji sa odgovarajućim aminima, sintetisana su jedinjenja **50–52**, polazeći od hlorida **49** (shema 5).



a) amin, MW: 15 min 80 °C, 30 min 95 °C, 2h 140 °C; b) **35**, AcOHglac, MeOH/DCM, NaBH<sub>4</sub>; c) 37% HCHO, ZnCl<sub>2</sub>, NaBH<sub>3</sub>CN, MeOH

### Shema 5. Sinteza jedinjenja **50–54**

Amin **52** sa najdužim alkil-nizom preveden je reduktivnim aminovanjem sa aldehidom **35** u derivat **53** u prinosu 32%, a sukcesivnim metilovanjem benzilnog amina 37% vodenim rastvorom formaldehida pomoću NaBH<sub>3</sub>CN u prisustvu ZnCl<sub>2</sub> dobijen je krajnji derivat **54** u prinosu 84%.

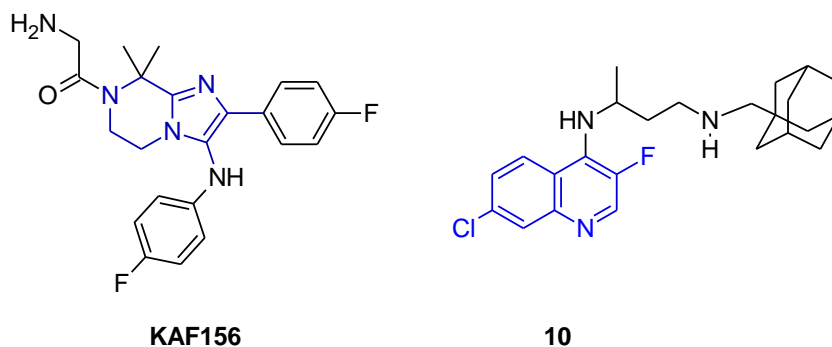
#### 3.2.1 Primena koncepta multifunkcionalnih molekula

S obzirom na činjenicu da bolesti i stanja za čije je sprečavanje ili lečenje neophodno razviti lek nisu posledica pojedinačnog defekta u nekom biološkom procesu, već gotovo uvek postoji više meta na koje se može delovati, koncept multifunkcionalnih molekula (molekulskih hibrida) atraktivna je strategija u efikasnom osmišljavanju struktura novih terapeutika. Pristup, u farmakološkom kontekstu obuhvaćen terminom polifarmakologija, sastoji se u kombinovanju dva molekula sa različitim biološkim metama delovanja, obično povezanim jednostavnim alkil-mostom.<sup>171</sup> Cilj je da novi eksperimentalni terapeutik ispoljava osobine i biološku aktivnost obe konstitucione farmakofore, efikasnije, sa manje sporednih toksičnih efekata.

Deo ove disertacije obuhvata realizaciju ideje kombinovanja strukturnih segmenata nove klase jedinjenja sa još uvek ne sasvim razjašnjenim mehanizmom dejstva i struktura jedinjenja sintetisanih u našoj istraživačkoj grupi, koja su pokazala dobru aktivnost u različitim fazama životnog ciklusa parazita *P. falciparum*. Na slici 23

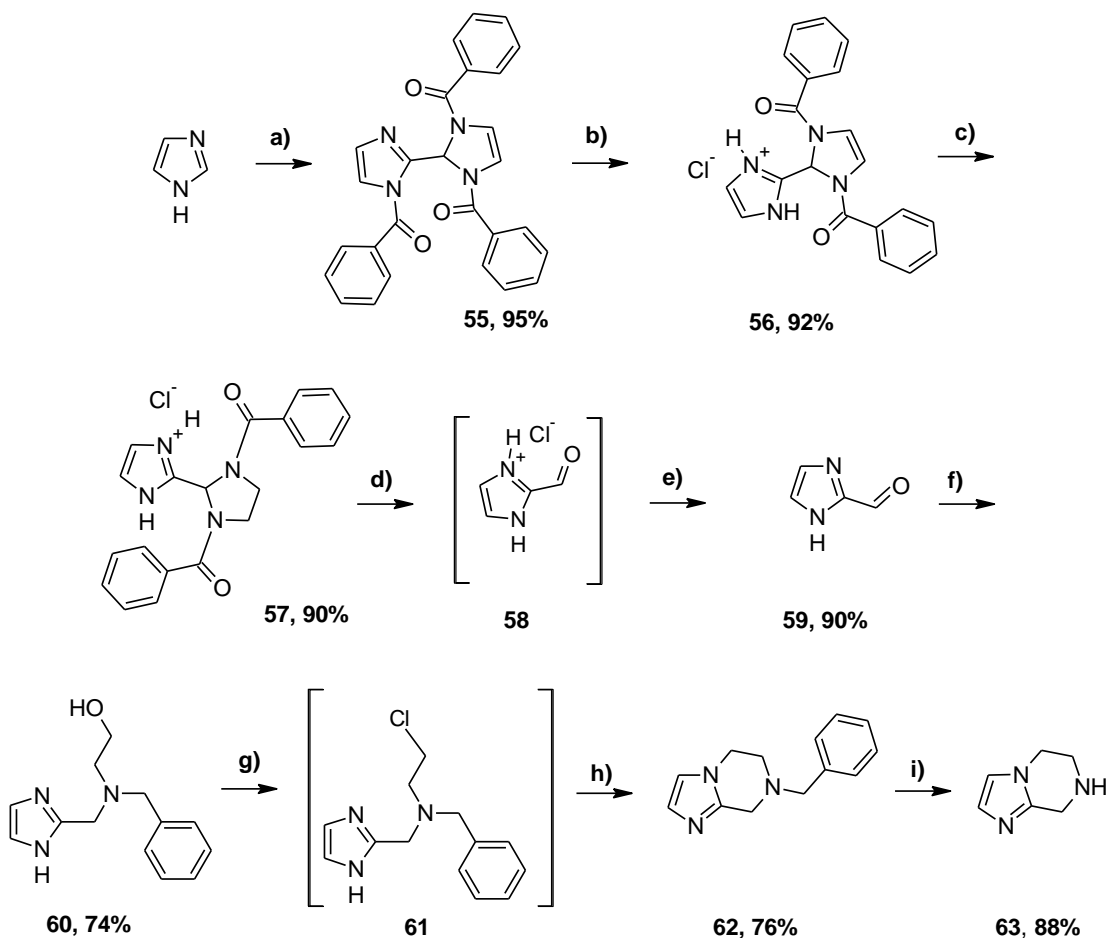
prikazane su strukture jedinjenja čiji su konstitucionni segmenti (plavo) iskorišćeni za osmišljavanje strukture ciljnih molekula.

Kao što je već spomenuto, derivat imidazolpiperazina **KAF156**, vodeće jedinjenje u ispitivanju aktivnosti prema parazitu malarije i klinički kandidat, rezultat je opsežnog istraživanja farmaceutske kompanije Novartis iz 2011. godine. Rane studije ukazivale su na novi mehanizam dejstva, koji nije bio ustanovljen kod do tada poznatih antimalarika. **KAF156** deluje na eritrocitnu fazu, fazu parazita u jetri i zaustavlja transmisiju u komarca. U modelu miša, **KAF156** iskazuje terapeutsko i profilaktičko dejstvo.<sup>56</sup> U okviru istraživanja naše istraživačke grupe, sintetisani su derivati aminohinolina koji pokazuju antiplazmodijalnu aktivnost u eritrocitnoj i egzoeritrocitnoj fazi.<sup>83</sup> Nađeno je da uvođenje fluora u položaj C(3) hinolinskog jezgra značajno doprinosi povećanju aktivnosti jedinjenja prema parazitu u fazi jetre. Eksperiment u *in vivo* uslovima pokazao je da jedinjenje **10**, kada se primeni u dozi 80 mg/kg, inhibira razvoj 92% sporozoitna *P. berghei* kod miševa u poređenju sa netretiranom kontrolom.



**Slika 23.** Strukture jedinjenja čiji su strukturni segmenti (plavo) poslužili za dizajn novih potencijalnih antimalarika

S ciljem iznalaženja jedinjenja koje bi bilo aktivno u više faza životnog ciklusa parazita, a u isto vreme aktivno prema sojevima parazita rezistentnim prema poznatim antimalaricima, sintetisana su četiri nova derivata **75–78**. Strukturni segment 4-amino-7-hlorhinolin je povezan sa imidazolpiperazinskim jezgrom kratkim alkil-nizom, normalnim ili račvastim. Derivati **77** i **78** sadrže u svojoj strukturi hinolin supstituisan fluorom u položaju C(3). Sinteza imidazolpiperazinskog jezgra prikazana je na shemi 6.



**a)** 1. PhCOCl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>CN, 15 - 25 °C; 2.1 h, s.t. **b)** konc. HCl, CH<sub>3</sub>OH, s.t. **c)** H<sub>2</sub> (50 Psi), Pd/C, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH  
**d)** konc. HCl, 120 °C **e)** NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O **f)** 1. **64**, AcOH glac, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH, s.t. 2. NaBH<sub>4</sub>  
**g)** SOCl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40 °C **h)** NaH, DMF, 100 °C **i)** H<sub>2</sub> (30 Psi), Pd/C, CH<sub>3</sub>OH

### Shema 6. Sinteza imidazolpiperazina **63**

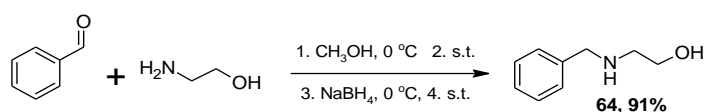
Formilovanje imidazola izvedeno je u četiri koraka po postupcima opisanim u literaturi.<sup>172,173</sup> Tribenzoil-derivat sintetisan je ukapavanjem benzoil-hlorida u rastvor imidazola u acetonitrilu, u prisustvu trietilamina, na sobnoj temperaturi. Zatim sledi hidroliza **55** hlorovodoničnom kiselinom u metanolu na sobnoj temperaturi. Ovako dobijena HCl so dibenzoil-derivata, hidrogenizacijom u prisustvu 10% Pd/C, u etanolu, prevodi se u jedinjenje **57** u prinosu od 90%. Zagrevanjem redukovanoeg proizvoda u konc. HCl uz refluks, dobija se, pored benzojeve kiseline i etilendiamina-dihlorida, imidazol-2-karbaldehid u obliku HCl soli **58**. Posle neutralizacije pomoću NaHCO<sub>3</sub>, izdvaja se aldehid kao oker talog u prinosu 90%. U reakciji reduktivnog aminovanja



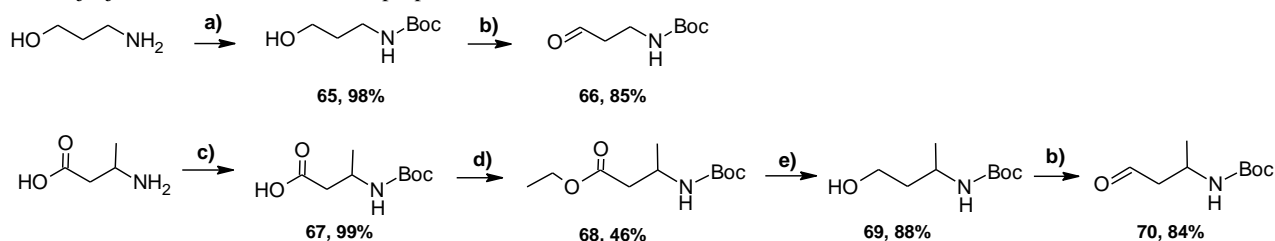
aldehida sa 2-(benzilamino)etanolom<sup>ii</sup> u smeši rastvarača CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, primenom NaBH<sub>4</sub> kao redukcionog sredstva sintetisano je jedinjenje **60**. Hidroksilna grupa jedinjenja **60** supstituisana je hlorom zagrevanjem sa tionil-hloridom u dihlormetanu na 40 °C. Nakon uklanjanja rastvarača, sirovi proizvod **61** podvrgnut je reakciji intramolekulske supstitucije zagrevanjem sa natrijum-hidridom u DMF na 100 °C. Jedinjenje **62** sa formiranim imidazolpiperazinskim prstenom dobijeno je u prinosu 76%. Piperazinska amino-grupa oslobođena je hidrogenolizom benzil-grupe u prisustvu 10% paladijuma na ugljeniku u metanolu. Na ovaj način dobijeno je jedinjenje **63** u prinosu 88%.

Sinteza derivata aminohinolina polazeći od **63** prikazana je na shemi 7. Reduktivnim aminovanjem 3-aminopropanala i 3-aminobutanala sa zaštićenim amino-grupama,<sup>iii</sup> po postupku sa NaBH<sub>4</sub>, jedinjenje **63** prevedeno je u derivate **71** i **72**, redom. Uklanjanjem zaštitne Boc-grupe trifluorsirćetnom kiselinom u dihlormetanu, iz derivata **71** i **72** dobijeni su amin **73** u prinosu 70% i njegov račvasti analog **74** u prinosu 65%, redom. Jedinjenje **73** je u reakciji sa 4,7-dihlorhinolinom (4,7-DCQ) u mikrotalasnom reaktoru prevedeno u derivat **75** u prinosu 50%. Pod istim reakcionim uslovima, iz **74** i 4,7-DCQ dobijeno je jedinjenje **76** u nešto nižem prinosu (40%).

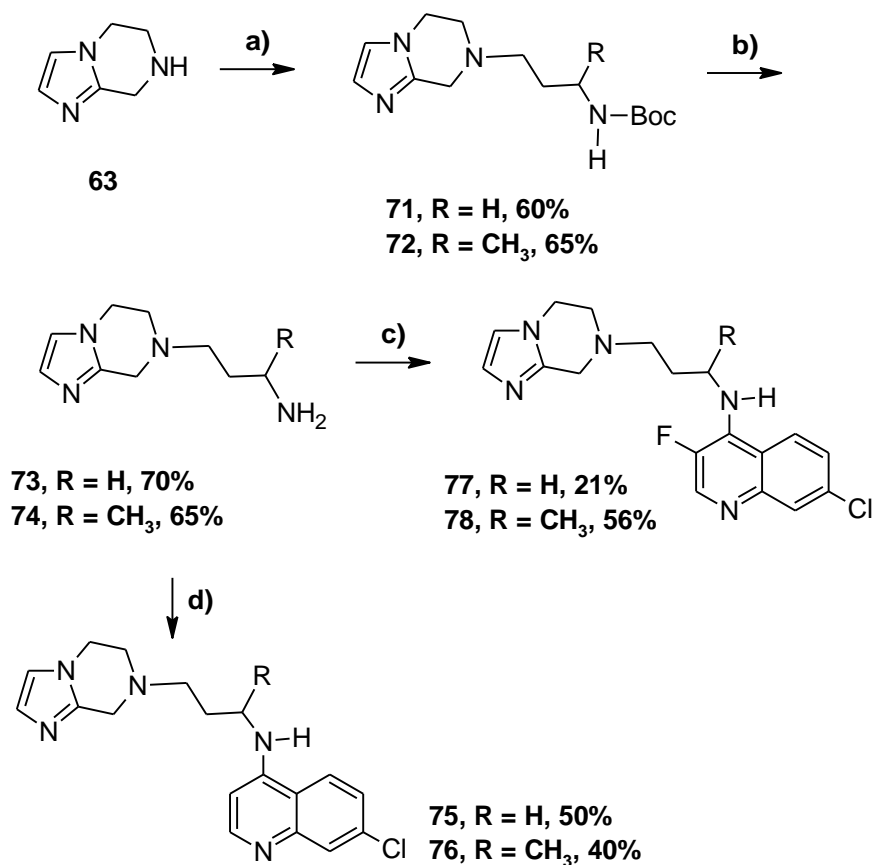
<sup>ii</sup> Sinteza 2-(benzilamino)etanola **64**



<sup>iii</sup> Dobijanje N-Boc zaštićenih 3-aminopropanala **66** i 3-aminobutanala **70**



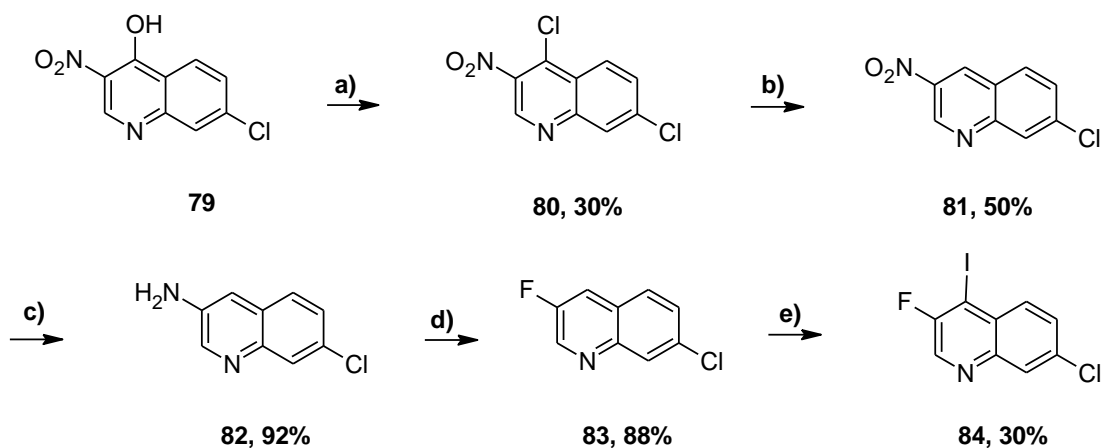
**a)** Boc<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C do s.t. **b)** PCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, s.t. **c)** 1. Boc<sub>2</sub>O, NaOH(1M), NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, dioksan, 0 °C, 10 min; s.t. 2. KHSO<sub>4</sub>, 0 °C **d)** ClCO<sub>2</sub>Et, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, s.t. **e)** LiAlH<sub>4</sub>, THF, 0 °C do s.t.



- a)** 1. **66** (R = H) ili **70** (R = CH<sub>3</sub>), AcOH glac, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH, s.t.; 2. NaBH<sub>4</sub>  
**b)** TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, s.t. **c)** **84**, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, SPhos, NaO<sup>t</sup>Bu, toluen, 100 °C  
**d)** 4,7-DCQ, MW 1. 85 °C, 15 min; 2. 95 °C, 30 min; 3. 140 °C, 2 h

### Shema 7. Sinteza jedinjenja 75–78

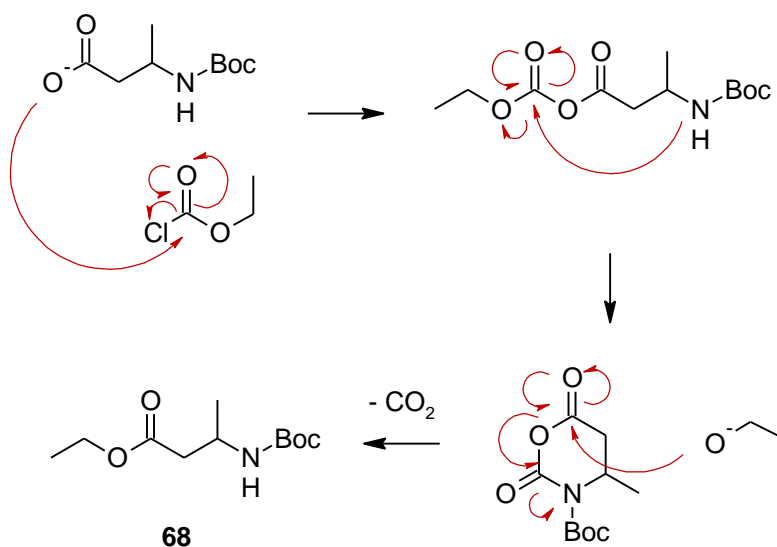
Poslednji korak u sintezi aminohinolinskih derivata supstituisanih fluorom iz amina **73** i **74** predstavlja Buchwald-Hartwig-ovo kuplovanje sa 7-hlor-3-fluor-4-jodhinolinom **84**, koji je sintetisan u pet koraka iz 7-hlor-3-nitrohinolin-4-ola **79** po postupku opisanom u literaturi (shema 8).<sup>83</sup> Kao katalizator u Buchwald-Hartwig-ovoj reakciji korišćen je Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> i Sphos, u prisustvu NaO<sup>t</sup>Bu, u toluenu na 100 °C. Jedinjenje **78** sa račvastim mostom dobijeno je u prinosu 56%, dok je derivat **77** sintetisan u niskom prinosu 21%.



**a)** 1.  $\text{POCl}_3$ ,  $90^\circ\text{C}$ , 2h; 2.  $120^\circ\text{C}$ , 24h; **b)** 1. p-toluensulfonil hidrazid,  $\text{CHCl}_3$ ; s.t; 2. 0,5M NaOH,  $80^\circ\text{C}$ ;  
**c)**  $\text{SnCl}_2$ , MeOH,  $80^\circ\text{C}$ ; **d)** 48%  $\text{HBF}_4$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ; **e)** n-BuLi, diizopropilamin, THF,  $\text{I}_2$ ,  $-85^\circ\text{C}$

### Shema 8. Sinteza 7-hlor-3-fluor-4-jodhinolina **84**<sup>83</sup>

Zanimljivo je da iz 3-aminobutanske kiseline,<sup>iii</sup> čija je amino-grupa zaštićena Boc-zaštitnom grupom **67**, u reakcionim uslovima za dobijanje mešovitog anhidrida, nastaje etil-estar **68**. Predloženi mehanizam ove transformacije prikazan je na shemi 9. Pretpostavlja se da u baznim uslovima amino-grupa zaštićena Boc-om napada karboksilni kiseonik mešovitog anhidrida uz intramolekulsko formiranje šestočlanog prstena i oslobađanje etoksidnog jona. Nestabilni šestočlani prsten otvara se napadom etoksidnog anjona uz oslobađanje ugljen-dioksida.



### Shema 9. Pretpostavljeni mehanizam nastajanja estra **68**

### **3.3 Antimalarijska aktivnost sintetisanih derivata**

Antimalarijska aktivnost sintetisanih jedinjenja ispitivana je u *in vitro* uslovima u različitim razvojnim fazama parazita *P. falciparum*. Posle kliničkog praćenja zdravih miševa tretiranih odabranim jedinjenjima, ispitana je i aktivnost odabranih netoksičnih derivata u *in vivo* sistemu, modelu miševa inficiranih parazitom malarije soja *P. berghei*. Dodatno, toksičnost najaktivnijeg derivata ispitana je i prema embrionima zebra-ribica, o čemu će biti reči u odeljku **3.5.3.2.1**.

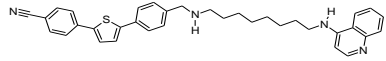
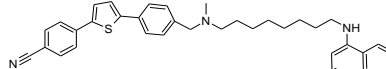
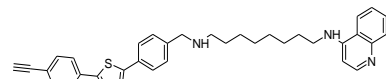
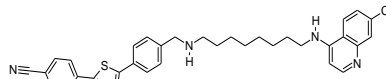
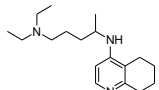
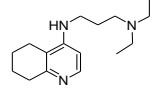
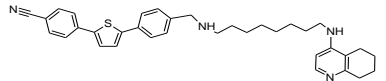
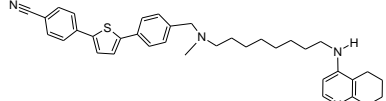
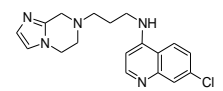
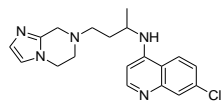
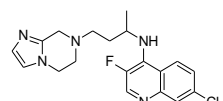
#### **3.3.1 Ispitivanje inhibicije proliferacije parazita malarije u *in vitro* uslovima**

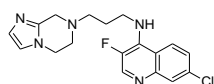
*In vitro* inhibicija proliferacije *P. falciparum* u aseksualnoj eritrocitnoj fazi ispitana je prema različitim sojevima parazita: W2 (Indokina, CQ-rezistentan i MFQ-osetljiv soj) i CQ-osetljivim sojevima D6 (Afrika) i D10. Tri derivata testirana su i prema višestruko rezistentnom soju TM91C235 (Tajland). Sintetisani derivati aminohinolina ispitani su kao inhibitori razvoja parazita u seksualnoj fazi, u formi gametocita, a odabrani derivati testirani su u egzoeritrocitnoj, hepatocitnoj fazi (fazi jetre).

##### **3.3.1.1 Aktivnost derivata aminohinolina u eritrocitnoj fazi u *in vitro* uslovima**

Aktivnost jedinjenja **36**, **38** (MVNP001) i **44** ispitana je prema W2, D6 i TM91C235 sojevima *P. falciparum* u Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, USA, korišćenjem *Malaria SYBR Green Fluorescence* eseja, koji se zasniva na merenju intenziteta boje interkalirane u DNK parazita. Intenzitet interkalirane zelene boje srazmeran je stepenu proliferacije parazita. Pozitivni kontrolni uzorci tretirani su hlorokinom (CQ) i meflokinom (MFQ). Ostala jedinjenja testirana su *in vitro* prema W2 i D10 soju *P. falciparum* na Univerzitetu u Milanu, kolorimetrijskim merenjem aktivnosti laktat-dehidrogenaze parazita (LDH esej). Rezultati ispitivanja inhibicije proliferacije parazita malarije u eritrocitoj fazi u *in vitro* uslovima prikazani su u tabeli 1.

**Tabela 1.** *In vitro* antiplazmodijalna aktivnost novih derivata aminohinolina

Jedinjenje	<i>In vitro</i> inhibicija proliferacije <i>P. falciparum</i> (IC <sub>50</sub> , nM) <sup>b</sup>				RI <sup>g</sup> W2/ D6(D10)
	D6 <sup>a,c</sup>	D10 <sup>d</sup>	TM91C235 <sup>a,e</sup>	W2 <sup>f</sup>	
<b>37</b> 		86		75	0,9
<b>38 (MVNP001)</b> 	7		13	5	0,7
<b>44</b> 	177		274	259	1,5
<b>36</b> 	55		30	12	0,2
<b>50</b> 		17400		>17300	
<b>51</b> 		12000		>19100	
<b>53</b> 		64		62	1,0
<b>54</b> 		91		129	1,4
<b>75</b> 		198		1947	9,8
<b>76</b> 		138		1203	8,7
<b>78</b> 		8134		7964	1,0



1860

2765

1,5

<b>CQ<sup>h</sup></b>	15 (6)	26	206 (5)	595 (5)	39,7
<b>MFQ<sup>h</sup></b>	23 (6)		55 (5)	7 (5)	0,3
<b>Metilensko plavo<sup>h</sup></b>		27		417	15,4

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> vrednosti inhibicije proliferacije parazita malarije (Malaria SYBR Green Fluorescence Assay) izolata i klonova *P. falciparum*; <sup>b</sup>Svi eksperimenti su rađeni kao tehnički kvadruplicati, date su srednje vrednosti; <sup>c</sup> CQ-osetljiv *P. falciparum* afrički D6 klon; <sup>e</sup>CQ-rezistentni *P. falciparum* W2 klon (Indokina); <sup>f</sup>Višestruko rezistentni *P. falciparum* TM91C235 soj (Tajland); <sup>g</sup> Indeks rezistencije; <sup>h</sup>Kontrolni agensi: **CQ** u obliku difosfata, **MFQ** u obliku HCl soli. Vrednost IC<sub>50</sub> kontrolnih jedinjenja predstavlja srednju vrednost broja ponavljanja eksperimenta datog u zagradi.

U poređenju sa prethodnim rezultatima testiranja jedinjenja ove klase,<sup>161</sup> sa produženjem alkil-niza, zadržava se nizak indeks rezistencije. Indeks rezistencije (RI) je odnos iskazane aktivnosti jedinjenja (IC<sub>50</sub>) prema CQ-rezistentnom soju (W2) i CQ-osetljivom soju (D6, odnosno D10). Tako su tiofenski derivati aminohinolina sa osam metilenskih grupa, izuzev derivata **44** sa trostrukom vezom umesto cijano-grupe, aktivniji prema CQ-rezistentnom soju W2 u poređenju sa CQ-osetljivim sojem D6. Zamena cijano-grupe etinil-grupom dovodi do značajnog slabljenja inhibitorne aktivnosti jedinjenja **44** prema svim sojevima parazita, što jasno ukazuje na važnost cijano-grupe za antiplazmodijalnu aktivnost. Jedinjenje **38** (MVNP001) sa tercijarnom amino-grupom, najaktivnije je testirano jedinjenje. Poređenjem aktivnosti derivata **36** i **37** prema W2 soju, pokazano je da hlor doprinosi aktivnosti, što je u skladu sa dosadašnjim rezultatima koje su pokazali analozi ovih jedinjenja kraćeg niza u našim ranijim istraživanjima.<sup>161</sup>

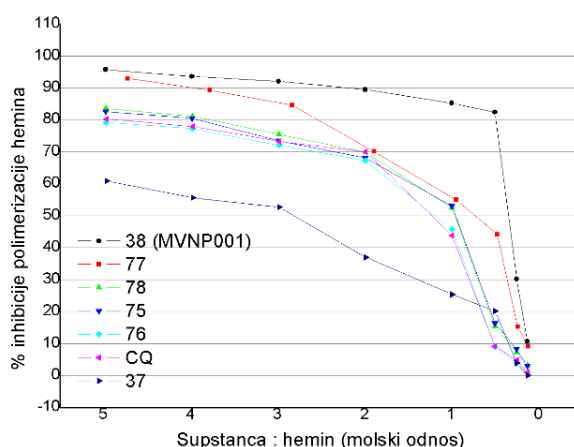
Delimična redukcija hinolinskog jezgra ne doprinosi poboljšanju aktivnosti jedinjenja. Analog **CQ**, derivat **50** i jedinjenja **AQ13**, derivat **51**, ne pokazuju antimalarijsku aktivnost, dok su jedinjenja **53** i **54** umereno do slabo aktivna prema sojevima *P. falciparum*, D10 i W2. Ovaj rezultat ukazuje da tiofenski strukturni motiv doprinosi ukupnoj aktivnosti. Poređenjem inhibitorne aktivnosti derivata **53** i **54**, pokazano je da tercijarna amino-grupa jedinjenja **54** nepovoljno utiče na aktivnost, nasuprot trendu primećenom poređenjem derivata aminohinolina **37** i **38** (MVNP001).

Jedinjenja sa imidazolpiperazinskim nosačem nisu aktivna prema W2 i D10 soju parazita *P. falciparum* u eritrocitnoj fazi. Derivati **75** i **76** sa 7-hlorhinolinskim jezgrom pokazuju izuzetno slabu aktivnost prema CQ-osetljivom soju D10.

### 3.3.1.2 Inhibicija formiranja $\beta$ -hematina

Jedan od mehanizama po kom antimalarici sa hinolinskom farmakoforom ispoljavaju svoju aktivnost jeste inhibicija nastajanja hemozoina. Naime, parazit u eritrocitnoj fazi, unutar svoje hranljive vakuole, razgrađuje globin iz hemoglobina do aminokiselina kojima se hrani. Slobodni hem formira  $\alpha$ -hematin koji je toksičan za parazite. Procesom detoksikacije parazita nastaje nerastvorni hemozoin koji se taloži u hranljivoj vakuoli. Hinolinski antimalarici inhibiraju proces detoksikacije parazita građenjem kompleksa sa nekim od intermedijera tokom nastajanja hemozoina.<sup>39</sup> Za ispitivanje potencijalne sposobnosti jedinjenja da interferiraju sa građenjem hemozoina primenjuje se BHIA esej (*Beta-Hematin Inhibitory Activity*). U ovom testu određuje se stepen nastajanja  $\beta$ -hematina iz goveđeg hemina u kiseloj sredini u prisustvu eksperimentalnih jedinjenja.  $\beta$ -hematin je hemijski i strukturno identičan hemozinu i koristi se kao sintetički model hemozoina.<sup>174</sup>

Sposobnost novოსintetisanih derivata 4-aminohinolina da inhibiraju nastajanje  $\beta$ -hematina u *in vitro* uslovima ispitana je primenom BHIA eseja (slika 24). Inhibitorna aktivnost jedinjenja upoređena je sa inhibicijom koju ostvaruje CQ u uslovima eksperimenta. Rezultati izraženi u IC<sub>50</sub> vrednostima nalaze se u tabeli 2. Vrednosti IC<sub>50</sub> iz tabele predstavljaju molski odnos ispitivanog jedinjenja i hemina koji dovodi do 50% inhibicije formiranja  $\beta$ -hematina u poređenju sa kontrolom bez eksperimentalnog jedinjenja.



**Slika 24.** Grafik zavisnosti procenta inhibicije  $\beta$ -hematina od molskog odnosa ispitivana supstanca/hemin

**Tabela 2.** Inhibicija nastajanja  $\beta$ -hematina

Jedinjenje	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>
<b>37</b>	2,81
<b>38 (MVNP001)</b>	0,34
<b>75</b>	0,95
<b>76</b>	1,19
<b>77</b>	0,72
<b>78</b>	0,96
<b>CQ</b>	1,23

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> predstavlja molski odnos supstanca/hemin pri kom se inhibira nastajanje 50%  $\beta$ -hematina u poređenju sa kontrolom

Jedinjenje **38 (MVNP001)**, najaktivniji testirani derivat prema svim sojevima parazita u eritrocitnoj fazi, iskazuje i najveću inhibitornu aktivnost prema nastajanju  $\beta$ -hematina u poređenju sa ostalim testiranim jedinjenjima i **CQ**. Ovaj rezultat nedvosmisleno ukazuje na to da je najverovatniji mehanizam delovanja **38 (MVNP001)** inhibicija nastajanja hemozoina. Najaktivniji derivat je osam puta bolji inhibitor formiranja  $\beta$ -hematina u poređenju sa svojim strukturnim analogom **37** koji ne sadrži tercijarnu amino-grupu na alkil-mostu. Imidazolpiperazinski derivati **75–78**, iako neaktivni u eritrocitnoj fazi u *in vitro* uslovima, ostvaruju veći stepen inhibicije nastajanja  $\beta$ -hematina u poređenju sa **CQ**. Ovaj podatak može ukazivati na nemogućnost akumulacije imidazolpiperazinskih derivata u hranljivoj vakuoli parazita.

### **3.3.1.3 Aktivnost derivata aminohinolina u seksualnoj fazi parazita malarije**

U seksualnoj fazi životnog ciklusa parazita malarije parazit se nalazi u formi gametocita. Dejstvo antimalarika u ovoj fazi značajno je, jer se gametocitocidnom aktivnošću sprečava transmisija parazita do komarca i tako onemogućava dalji prenos infekcije do novog domaćina. Većina primenjivanih antimalarika derivata 4-aminohinolina, koji su aktivni u eritrocitnoj fazi i ublažavaju simptome malarije, nisu aktivni prema gametocitima, ili jesu, ali samo u ranim stupnjevima razvoja gametocita.<sup>175</sup> Pošto su za transmisiju parazita do komarca odgovorni zreli gametociti, od esencijalne je važnosti aktivnost terapeutika u fazi V razvoja gametocita. Takođe, postoje indicije da se



lečenjem obolelih pojedinaca antimalaricima koji ispoljavaju dejstvo samo u eritrocitnoj fazi, omogućava širenje vrsta rezistentnih na primenjeni antimalarik.<sup>176</sup>

Ispitano je dejstvo sintetisanih derivata aminohinolina prema zrelim gametocitima 3D7 soja *P. falciparum* u fazi V. Određen je procenat inhibicije proliferacije gametocita tretiranih ispitivanim jedinjenjima u dozi 10  $\mu\text{M}$ , a zatim i  $\text{IC}_{50}$  vrednosti. Metilensko plavo je upotrebljeno kao pozitivna kontrola. Rezultati su prikazani u tabeli 3.

**Tabela 3.** *In vitro* aktivnost jedinjenja prema gametocitima 3D7 soja *P. falciparum*

Jedinjenje	Inhibicija na c = 10 $\mu\text{M}$ (%)	$\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{M}^{\text{a,b}}$
<b>37</b>	99	0,27
<b>38 (MVNP001)</b>	-	1,09
<b>50</b>	51	7,55
<b>51</b>	70	8,18
<b>53</b>	99	0,58
<b>54</b>	99	0,97
<b>75</b>	-	122,7
<b>76</b>	-	97,2
<b>77</b>	-	63,6
<b>78</b>	-	83,3
<b>Metilensko plavo<sup>c</sup></b>	-	0,04

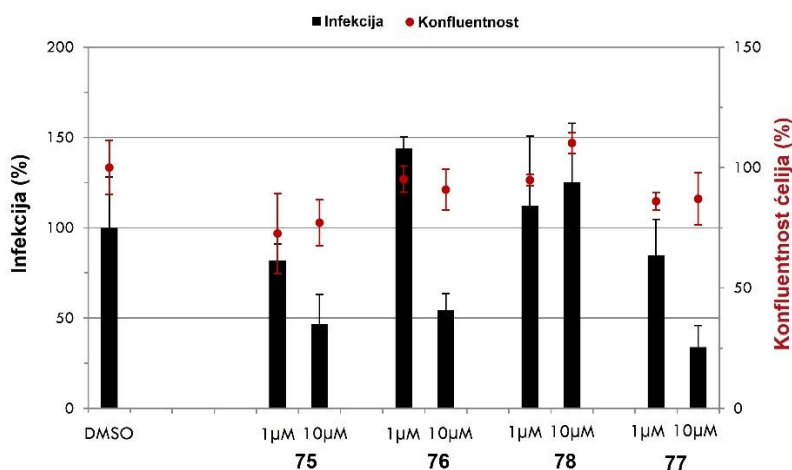
<sup>a</sup> $\text{IC}_{50}$  vrednosti inhibicije proliferacije gametocita 3D7 soja *P. falciparum*; <sup>b</sup>Svi eksperimenti su rađeni u duplikatu, prikazane su srednje vrednosti. <sup>c</sup>Pozitivna kontrola

Najveći stepen inhibitorne aktivnosti prema razvoju gametocita pokazuju derivati aminohinolina sa dugačkim alkil-nizom i njihovi analozi sa redukovanim hinolinskim jezgrom. Jedinjenje **37** je najaktivnije u ovoj fazi parazita u poređenju sa ostalim testiranim jedinjenjima. Derivati aminohinolina sa imidazolpiperazinskim nosačem pokazuju zanemarljivu aktivnost prema gametocitima.

### 3.3.1.4 Aktivnost sintetisanih aminohinolina prema sporozoitima u *in vitro* uslovima

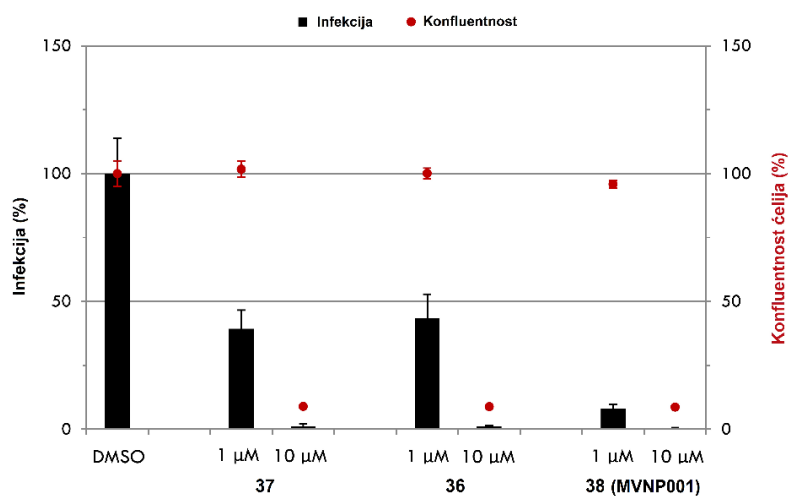
Tokom dela životnog ciklusa parazita koji se odvija u jetri, ne javljaju se simptomi oboljenja, pa je ova faza presimptomatska. Terapijskom primenom antimalarika koji iskazuje dejstvo na sporozoite, hepatocitnu formu parazita, ostvaruje se profilaktičko dejstvo i ujedno sprečava relaps bolesti, koji se može javiti aktivacijom uspavanih sporozoita u hepatocitima. Takođe, aktivnost antimalarika na sporozoite je poželjna, jer se delovanjem na manji broj parazita u jetri, u poređenju sa brojem u krvnim fazama, umanjuje verovatnoća razvoja rezistencije.<sup>177</sup>

Ispitano je dejstvo odabranih derivata **36–38 (MVNP001)** i **75–78** na sporozoite luciferaeksprimujućeg ANKA soja *P. berghei*, kojima su inficirane Huh7 ćelije humanog hepatoma. Huh7 ćelije humanog hepatoma predstavljaju dobar *in vitro* model humanih hepatocita.<sup>178</sup> Nivo bioluminescencije liziranih Huh7 ćelija nakon 48 sati tretmana jedinjenjima obrnuto je proporcionalan aktivnostima ispitivanih jedinjenja. Toksičnost jedinjenja prema Huh7 ćelijama je ispitana paralelnim praćenjem konfluentnosti ćelija tretiranih jedinjenjima. Najpre je ispitana inhibicija razvoja sporozoita u Huh7 ćelijama koje su tretirane jedinjenjima pri koncentracijama  $c_1 = 1 \mu\text{M}$  i  $c_2 = 10 \mu\text{M}$ , a zatim je određena  $\text{IC}_{50}$  vrednost inhibitorne aktivnosti najaktivnijeg derivata. Rezultati oglada su prikazani na slikama 25–27.



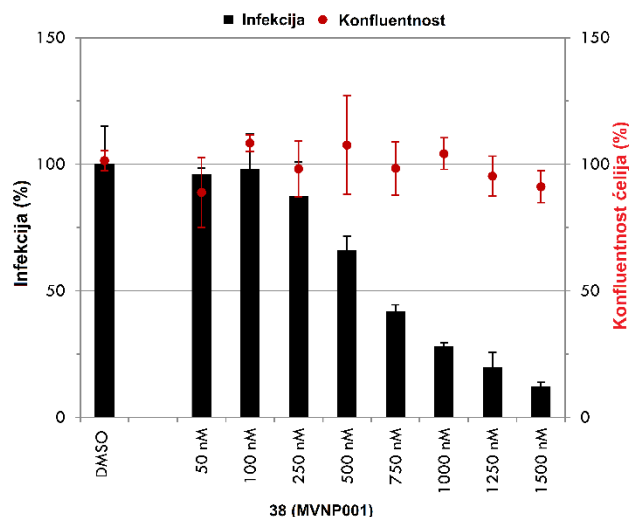
**Slika 25.** Aktivnost imidazolpiperazinskih derivata **75–78** prema parazitu malarije u fazi jetre *in vitro*

Rezultati ispitivanja aktivnosti imidazolpiperazinskih derivata **75–78** na sporozoite prikazani na slici 25, pokazuju slabu inhibitornu sposobnost derivata **75** i **77** sa normalnim alkil-nizom. Prisustvo fluora u položaju C(3) hinolinskog jezgra jedinjenja **77** ne utiče na aktivnost u fazi jetre. Derivat sa račvastim alkil-nizom **76** pokazuje zavisnost inhibitorne aktivnosti od primenjene koncentracije jedinjenja, ali se može proceniti da ostvaruje 50% inhibicije tek pri  $c > 10 \mu\text{M}$ . Jedinjenje **78** je potpuno neaktivno i u ovoj fazi životnog ciklusa parazita malarije.



**Slika 26.** Aktivnost jedinjenja **36–38 (MVNP001)** prema parazitu malarije u fazi jetre *in vitro*

Za razliku od imidazolpiperazinskih derivata, derivati 4-aminohinolina sa aromatičnim nosačem **36–38 (MVNP001)** su dobri inhibitori rasta sporozoita u Huh7 ćelijama. Sva jedinjenja ostvaruju inhibitorne  $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$ , bez uticaja na konfluentnost Huh7 ćelija. Jedinjenja **36–38 (MVNP001)** sa dugim alkil-nizom eliminišu sporozoite ispod 1% u poređenju sa kontrolom, kada se primene u koncentraciji  $10 \mu\text{M}$ .



**Slika 27.** Određivanje dozne zavisnosti inhibitorne aktivnosti na razvoj sporozoitima u slučaju jedinjenja **38 (MVNP001)**

Ispitana je i dozna zavisnost aktivnosti u opsegu koncentracija  $c = 50\text{--}1500$  nM najaktivnijeg jedinjenja **38 (MVNP001)**. Određena je koncentracija jedinjenja neopodna za inhibiciju 50% sporozoitima ( $IC_{50} = 625 \pm 38$  nM) kao srednja vrednost dva nezavisna eksperimenta. Konfluentnost Huh7 ćelija pri svim primenjenim koncentracijama **38 (MVNP001)** približno je jednaka konfluentnosti kontrolnih netretiranih ćelija, što govori o relativnoj netoksičnosti eksperimentalnog jedinjenja u efektivnim koncentracijama (slika 27). U poređenju sa literaturnim podacima o aktivnosti primakina (**PQ**) prema sporozoitima ANKA soja *P. berghei* u *in vitro* uslovima ( $IC_{50} = 13 \mu\text{M}$ ),<sup>179</sup> jedinjenje **38 (MVNP001)** je 20 puta efikasniji inhibitor.

### 3.3.2 Akutna toksičnost i antimalarijska aktivnost jedinjenja u *in vivo* uslovima

U okviru ispitivanja toksičnosti sintetisanih derivata u *in vivo* uslovima, zdravi miševi su tretirani odabranim jedinjenjima i klinički praćeni 30 dana. Suspenzija rastvora jedinjenja u DMSO i smeše 0,5% hidroksietilceluloza / 0,1% Tween 80 u vodi je administrirana *per os* tokom tri dana, po jednom dnevno, u dozi 160 mg/kg/dan. Pored preživljavanja miševa tokom tretmana, praćeni su i drugi pokazatelji akutne toksičnosti. Ispitana je toksičnost jedinjenja sa najboljom antiplazmodijalnom *in vitro* aktivnošću u eritrocitnoj fazi: **38 (MVNP001)** i **36**, jedinjenja **37**, koje pokazuje najveću gametocitocidnu aktivnost i jedinjenja **75**, predstavnika imidazolpiperazinskih derivata, kao potencijalnih kandidata za ispitivanje antimalarijske aktivnosti u *in vivo* uslovima.

Svi ogledni miševi (pet miševa za svako jedinjenje) preživeli su 30 opservacionih dana bez znakova toksičnosti.

Pošto je pokazano da jedinjenja nisu toksična, ispitana je antimalarijska aktivnost derivata **38 (MVNP001)** i **36** u *in vivo* uslovima, u modelu eksperimentalne malarije miša. Jedinjenja su testirana na miševima inficiranim ANKA sojem *P. berghei* parazita malarije po modifikovanom *Thompson*-ovom modelu. Jedinjenje **36** primenjivano je u dozi 160 mg/kg počevši od trećeg dana nakon infekcije miševa, tri dana, po jednom. Terapija inficiranih miševa jedinjenjem **38 (MVNP001)** trajala je četiri dana, primenom jedinjenja u nižim dozama, 80 mg/kg i 40 mg/kg, počevši od trećeg dana nakon infekcije miševa. Pozitivnu kontrolu predstavljali su miševi tretirani **CQ** u dozi 160 mg/kg, a negativnu kontrolu, inficirani miševi bez terapije. Inficirani miševi iz negativne kontrolne grupe umrli su sedmog i osmog dana. Eksperiment traje 30 dana. U toku eksperimenta proverava se stepen parazitemije posmatranjem razmaza krvi uzorkovane iz repa oglednih miševa pod svetlosnim mikroskopom. Miš se smatra izlečenim ako 31. dana esperimenta u krvnom razmazu nisu prisutni pod mikroskopom vidljivi paraziti i ako je izostanak parazitemije dodatno potvrđen qPCR metodom u uzorcima krvi i jetre. Rezultati ispitivanja antimalarijske aktivnosti jedinjenja u *in vivo* uslovima prikazani su u tabeli 4.

**Tabela 4.** *In vivo* antimalarijska aktivnost jedinjenja **36** i **38** (MVNP001)<sup>a</sup>

Jedinjenje	mg/kg/dan	Parazitemija	Broj uginulih miševa/dan smrti	Broj živih miševa 31. dana	Srednje vreme preživljavanja (MST, dan)
<b>36</b>	160 <sup>b</sup>	D7: 5 miševa pozitivno 0,2-10,4%; D10: 4 miša pozitivna 9,2-15%; D14: 3 miša pozitivna 12,8 – 47,1%; D17: 3 miša pozitivna 49,5-60%; D21: 2 miša pozitivna 64,2-69,7%; D24: 1 miš pozitivan 75,2%	1/9 1/13 1/20 1/23 1/28	0/5	18,6
		D7: 1 miš negativan, 4 miša pozitivna 0,2-0,4%; D10: 4 miša pozitivna 1,6-4,9%; D14: 2 miša pozitivna 8,1 – 12%; D18: 2 miša pozitivna 16-20%; D21: 2 miša pozitivna 22-40,9%; D25: 1 miš pozitivan 43%	1/10 2/11 1/22 1/25	0/5	15,8
<b>38</b> (MVNP001)	80 <sup>c</sup>	D7: 2 miša negativna, 2 miša pozitivna 0,1-0,2%; D10: 4 miša pozitivna 0,2-6,6%; D14: 1 miš pozitivan 4,7%; D18: 1 miš pozitivan 11,5%; D21: 1 miš pozitivan 34,7%; D25: 1 miš pozitivan 40,5%	1/7 1/12 1/13 1/14 1/26	0/5	14,4
<b>CQ</b>	160 <sup>b</sup>	D3: 5 miševa pozitivno, 0,3%-0,8%; D6-D31: 5 miševa negativno		5/5	>31
<b>Inficirana kontrola</b>	0	Svi miševi su uginuli D7-D8			

<sup>a</sup>Jedinjenja su prethodno testirana na toksičnost u posebnim ogledima. Jedinjenja nisu iskazala toksične efekte kada se primene u dozi 160 mg/kg/dan × 3 dana. <sup>b</sup>Grupe od pet inficiranih miševa parazitima *P. berghei* (ANKA) soja tretirane su per os (p.o.) aminohinolinima suspendovanim u smeši 0,5% hidroksietilceluloza/0,1% Tween 80 u vodi po jednom dnevno od 3. do 5. dana posle infekcije. Miševi živi 31. dana bez detektovanih parazita u krvnom razmazu smatraju se izlečenim.

<sup>c</sup>Terapija je trajala 4 dana, od 3. do 6. dana posle infekcije.

Iako terapija ispitivanim jedinjenjima nije dovela do izlečenja inficiranih miševa u primenjenim dozama, zabeležen je značajno veći stepen preživljavanja miševa tretiranih eksperimentalnim jedinjenjima u poređenju sa netretiranim inficiranim kontrolnim životinjama (netretirani miševi su uginuli od D7-D8). Primena jedinjenja **36** u dozi 160 mg/kg tokom tri dana dovela je do srednjeg vremena preživljavanja miševa 18,6 dana. Kod miševa uginulih 21. i 24. dana eksperimenta primećen je visok stepen parazitemije (> 64%), što pokazuje da primenjeni tretman jedinjenjem **36** omogućava preživljavanje miševa sa visokim procentom parazita u perifernoj krvi. U slučaju jedinjenja **38** (MVNP001) nije detektovana parazitemija sedmog dana kod 2/5 miševa kada se primeni u dozi 80 mg/kg, odnosno 1/5 miševa, kada se primeni u dozi 40 mg/kg. Terapija jedinjenjem **38** (MVNP001) dovodi do produžavanja života dva puta u odnosu na kontrolu pri obema ispitivanim koncentracijama. Pošto se jedinjenje **38** (MVNP001),

primenjeno u dozi 160 mg/kg u testu ispitivanja toksičnosti prema zdravim miševima, pokazalo kao netoksično, ovaj derivat se može smatrati potencijalnim kandidatom za ispitivanja uticaja na parazitemiju u živim modelima i pri višim koncentracijama.

### 3.4 Antilajšmanijska aktivnost odabranih derivata 4-aminohinolina u *in vitro* uslovima

Pored ispitivanja antimalarijske aktivnosti sintetisanih jedinjenja, ispitana je i *in vitro* antilajšmanijska aktivnost odabranih sintetisanih derivata 4-aminohinolina. Određene su koncentracije jedinjenja pri kojima je ostvareno 50% inhibicije proliferacije promastigota sojeva *Leishmania infantum* i *L. tropica* (IC<sub>50</sub>). U nastavku, ispitana je inhibitorna aktivnost jedinjenja prema amastigotima u makrofagama. Paralelno sa ovim eksperimentima, određena je citotoksičnost testiranih jedinjenja prema THP-1 ćelijskoj liniji humanih monocita, dobijenoj iz pacijenta sa akutnom leukemijom. THP-1 ćelije su upotrebljene za dobijanje makrofaga koje su tretirane promastigotima *L. infantum* i u kojima su se iz promastigota razvili amastigoti, čija je proliferacija inhibirana tretmanom jedinjenjima. Kao referentno jedinjenje u ovim ogledima korišćen je amfotericin B. Rezultati ispitivanja antilajšmanijske aktivnosti jedinjenja prikazani su u tabeli 5.

**Tabela 5.** Antilajšmanijska aktivnost odabranih jedinjenja u *in vitro* uslovima

Jedinjenje	<i>L. infantum</i> IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a,b</sup>	<i>L. tropica</i> IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a,b</sup>	THP-1 IC <sub>50</sub> (μM) <sup>c</sup>	SI (THP/ <i>L.i.</i> ) <sup>d</sup>	SI (THP/ <i>L.t.</i> ) <sup>d</sup>	IPT amastigoti (% inhibicije na c = 0,5 μM) <sup>e</sup>
<b>37</b>	0,35	0,30	1,38	4,0	4,6	13,5
<b>38(MVNP001)</b>	0,80	1,06	3,85	4,8	3,6	21,6
<b>50</b>	>76,5	>76,5	>76,5	>1	>1	1,1
<b>51</b>	>69,1	>69,1	>69,1	>1	>1	11,8
<b>53</b>	0,72	0,75	2,31	3,2	3,1	29,6
<b>54</b>	0,83	0,80	3,68	4,4	4,6	20,5
<b>Amfotericin B<sup>f</sup></b>	0,13	0,14	>10,8	>83,1	>77,1	99,2

<sup>a</sup>Antilajšmanijska aktivnost jedinjenja *in vitro* na promastigote sojeva *L. infantum* i *L. tropica* izražena u IC<sub>50</sub> vrednostima (μM) ispitana korišćenjem MTT eseja. <sup>b</sup>Rezultati su srednje vrednosti eksperimenata izvedenih u duplikatu. <sup>c</sup>Citotoksičnost jedinjenja prema THP-1 ćelijskoj liniji humanih monocita dobijene iz pacijenta sa akutnom monocitnom leukemijom. <sup>d</sup>Indeks selektivnosti. <sup>e</sup>*In vitro* procenat inhibicije amastigota *L. infantum* u makrofagama pri koncentraciji ispitivanog jedinjenja c = 0,5 μM. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti dva ili tri nezavisna eksperimenta. <sup>f</sup> Pozitivna kontrola

Rezultati ispitivanja antilajšmanijske aktivnosti pokazuju slabu do umerenu inhibitornu sposobnost testiranih derivata 4-aminohinolina prema različitim formama parazita lajšmanije. Najaktivnije jedinjenje prema promastigotima oba ispitivana soja parazita je derivat **37**. Metilovanjem benzilne sekundarne amino-grupe, inhibitorna aktivnost se smanjuje dva i tri puta u slučaju *L. infantum* i *L. tropica*, redom. Delimična redukcija hinolinskog jezgra takođe nepovoljno utiče na sposobnost inhibicije proliferacije promastigota, dok kod strukturno jednostavnijih jedinjenja **50** i **51** potpuno izostaje. U slučaju inhibicije intraćelijskih amastigota, najaktivnije je jedinjenje **53**, redukovani analog derivata **37**. Sva ispitana jedinjenja su neznatno selektivnija prema parazitima u poređenju sa THP-1 ćelijskom linijom.

### **3.5 Sinteza i ispitivanje antitumorske aktivnosti derivata benzotiazola**

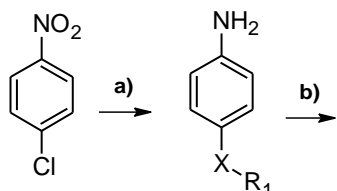
Tokom izrade ove disertacije sintetisani su derivati 2-aminobenzotiazola i ispitano je njihovo antiproliferativno dejstvo prema ćelijskim linijama humanog kancera u *in vitro* uslovima. Dodatno, ispitana je antitumorska aktivnost hinolinskog derivata **38** (MVNP001) prema ćelijama humanog kancera dojke u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

#### **3.5.1 Sinteza derivata benzotiazola**

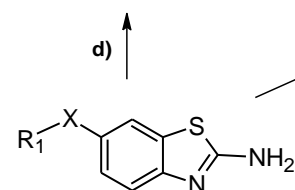
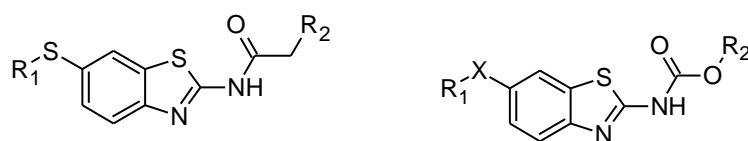
Sinteza serije novih derivata 2-aminobenzotiazola prikazana je na shemi 10. Komercijalno dostupan 1-hlor-4-nitrobenzen, preveden je u različite 4-(alkiltio)aniline (**86–89**) u jednom koraku, sa KOH i odgovarajućim alkil-tiolima u PEG-600 kao rastvaraču, zagrevanjem na 100 °C.<sup>180</sup> Formiranje 2-aminobenzotiazolskog jezgra izvedeno je u reakciji 4-supstutuisanih anilina sa NH<sub>4</sub>SCN, pomoću broma u glacijalnoj sirćetnoj kiselini, po modifikovanoj proceduri poznatoj u literaturi.<sup>181</sup> U reakciji 2-aminobenzotiazola sa odgovarajućim alkil-hlorformijatima, zagrevanjem u benzenu na 80 °C u prisustvu trietilamina, dobijeni su karbamati **97–109**. Pored karbamata, sintetisano je i šest amidnih derivata 2-aminobenzotiazola **110–115**. Aminobenzotiazol **92** preveden je u amide **110**, **113** i **115** u reakciji sa odgovarajućim alkanoil-hloridima u smeši benzena i dihlormetana na 0 °C. Amidi **111**, **112** i **114** sintetisani su pod istim reakcionim uslovima iz jedinjenja **93**.



- 110, R<sub>1</sub>= *n*-Pr, R<sub>2</sub>= *n*-Pr, 21%  
 111, R<sub>1</sub>= *n*-Bu, R<sub>2</sub>= *n*-Pr, 28%  
 112, R<sub>1</sub>= *n*-Bu, R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>, 45%  
 113, R<sub>1</sub>= *n*-Pr, R<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 30%  
 114, R<sub>1</sub>= *n*-Bu, R<sub>2</sub>= CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 32%  
 115, R<sub>1</sub>= *n*-Pr, R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>, 23%



- 85, X = S, R<sub>1</sub>= Et, HCl so  
 86, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Pr, 63%  
 87, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Bu, 49%  
 88, X = S, R<sub>1</sub>= *i*-Bu, 19%  
 89, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Pentyl, 31%  
 90, X = O, R<sub>1</sub>= Et



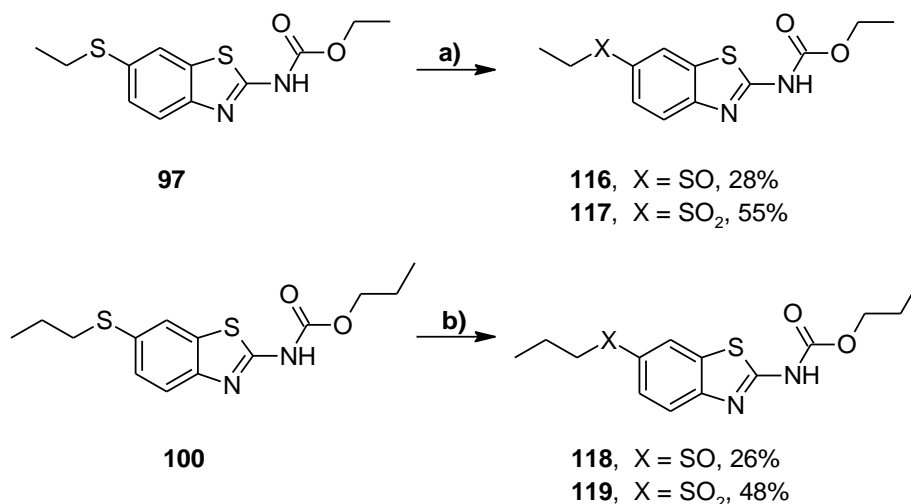
- 97, X = S, R<sub>1</sub>= Et, R<sub>2</sub>= Et, 40% iz 85  
 98, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Pr, R<sub>2</sub>= Et, 21% iz 86 x HCl  
 99, X = O, R<sub>1</sub>= Et, R<sub>2</sub>= *n*-Pr, 25% iz 90  
 100, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Pr, R<sub>2</sub>= *n*-Pr, 47%  
 101, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Bu, R<sub>2</sub>= Et, 19% iz 87  
 102, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Bu, R<sub>2</sub>= *n*-Pr, 29%  
 103, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Pr, R<sub>2</sub>= *n*-Bu, 28% iz 86 x HCl  
 104, X = S, R<sub>1</sub>= Et, R<sub>2</sub>= *n*-Pr, 27% iz 86 x HCl  
 105, X = S, R<sub>1</sub>= Pentyl, R<sub>2</sub>= Et, 21%  
 106, X = S, R<sub>1</sub>= Pentyl, R<sub>2</sub>= *n*-Pr, 40%  
 107, X = S, R<sub>1</sub>= *i*-Bu, R<sub>2</sub>= Et, 23%  
 108, X = S, R<sub>1</sub>= *i*-Bu, R<sub>2</sub>= *n*-Pr, 62%  
 109, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Bu, R<sub>2</sub>= *n*-Bu, 32%

- 91, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Et  
 92, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Pr, 82%  
 93, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Bu, 93%  
 94, X = S, R<sub>1</sub>= *i*-Bu, 54%  
 95, X = S, R<sub>1</sub>= *n*-Pentyl, 56%  
 96, X = O, R<sub>1</sub>= Et

a) KOH, R<sub>1</sub>SH, PEG-600, 100 °C b) NH<sub>4</sub>SCN, Br<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>2</sub>O, s.t. do 75 °C c) ClCO<sub>2</sub>R<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, benzen, 80 °C  
 d) alkanoil-hlorid, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/benzen, 0°C

### Shema 10. Sinteza karbamata i amida 2-aminobenzotiazola

U nastavku, sintetisani su sulfoksi- i sulfonil-derivati karbamata **97** i **100**, da bi se ispitalo kako ove promene antioksidativnog potencijala utiču na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i proliferaciju malignih ćelijskih linija. Oksidacija jedinjenja **97** i **100** prikazana je na shemi 11.

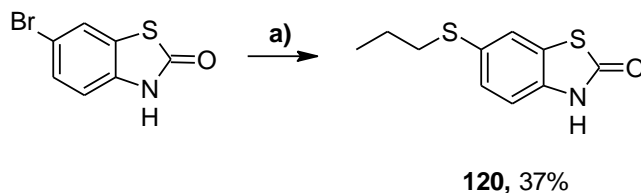


a) MCPBA (1 ekv ili 4 ekv), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, s. t. b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,2 ekv ili 4 ekv), CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>3</sub>OH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0 °C do s.t.

### Shema 11. Oksidacija jedinjenja 97 i 100

Jedinjenje **97** oksidovano je do sulfoksida **116** u reakciji sa jednim ekvivalentom mCPBA, u dihlormetanu na sobnoj temperaturi. Primenom četiri ekvivalenta mCPBA, dobijen je sulfonil-derivat **117**.<sup>182</sup> Oksidacijom **100** pomoću mCPBA dobijena je komplikovana smeša proizvoda. Jedinjenja **118** i **119** sintetisana su u reakciji karbamata **100** sa 30% vodenim rastvorom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, u metanolu, u prisustvu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.<sup>183</sup> Kao i u slučaju mCPBA, viši stepen oksidacije ostvaren je primenom viška oksidacionog sredstva.

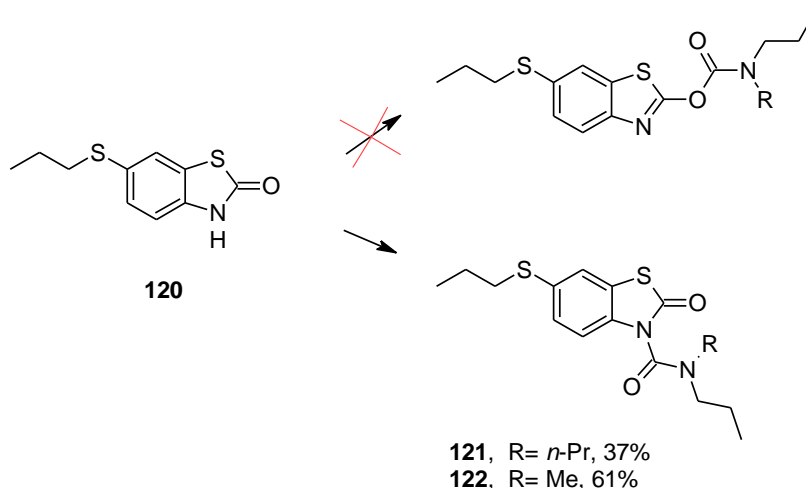
Radi ispitivanja uticaja promene položaja kiseonika i azota na C2 atomu benzotiazola, ideja je bila sintetisati karbamat benzotiazola kod koga je karbamatna grupa vezana preko kiseonika za C2 atom benzotiazolovog jezgra. Najpre je sintetisan 6-propiltiobenzotiazolon **120** (shema 12). Supstitucija broma propiltio-grupom izvedena je propantiolom u prisustvu diizopropiletilamina (DIPEA) zagrevanjem u mikrotalasnom reaktoru, gde je kao katalizator primenjen Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> i Xphos u dioksanu.



a) propantiol, Xphos, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, DIPEA, dioksan, 130 °C MW

### Shema 12. Sinteza 6-propiltiobenzotiazolona **120**

S ciljem dobijanja karbamata, jedinjenje **120** podvrgnuto je deprotonovanju n-butillitijumom na -78 °C. Nakon dodatka trifozgena na istoj temperaturi i reakcije sa odgovarajućim aminima, dobijeni su karbamidni derivati **121** i **122** u prinosima 37% i 61%, redom (shema 13). Pod ovim uslovima nije dobijen željeni karbamat.



**Reakcioni uslovi:** 1. *n*-BuLi, THF, -78 °C do s.t. 2. trifozgen -78 °C 3. amin, -78 °C do s.t.

### Shema 13. Sinteza jedinjenja **121** i **122**

#### 3.5.2 Ispitivanje antitumorske aktivnosti derivata benzotiazola

Preliminarna ispitivanja antiproliferativne aktivnosti sintetisanih derivata benzotiazola prema ćelijskim linijama humanog kancera izvedena su u Nacionalnom institutu za rak u Sjedinjenim Američkim Državama (*National Cancer Institute*, NCI, USA). Nakon toga, sa detaljnijim istraživanjem potencijalnog načina delovanja ovih jedinjenja, nastavljeno je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, kao i Institutu za molekularnu genetiku i genetički inženjering (IMGGI) u Beogradu.

##### 3.5.2.1 Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti derivata benzotiazola na 60 ćelijskih linija humanog kancera *in vitro*

U NCI istraživanje, u okviru Programa za razvoj lekova (*Developmental Therapeutics Program*, DTP) uključeno je 19 sintetisanih derivata benzotiazola: karbamati **97–109**, amidi **110** i **113**, sulfoksid **116**, sulfon **117** i benzotiazoloni **121** i **122**. Program obuhvata ispitivanje aktivnosti eksperimentalnih terapeutika na 60 različitih ćelijskih linija humanog kancera, među kojima su karcinom dojke, jajnika, pluća, centralnog nervnog sistema, bubrega, prostate, debelog creva, različite vrste leukemije i melanoma. Na osnovu rezultata inicijalnog *in vitro* testiranja jedinjenja u jednoj dozi (10 μM), vrši se selekcija ispitivanih jedinjenja za dodatne eksperimente. Rezultati prve faze testiranja prikazuju se kao procenat rasta ćelija nakon tretmana u odnosu na kontrolne ćelije u vremenu  $t = 0$ . Sledeći korak predstavlja određivanje dozne zavisnosti

antiproliferativne aktivnosti odabranih jedinjenja na pet koncentracija. Parametri kojim se iskazuju rezultati ove faze testiranja su  $GI_{50}$ , TGI i  $LC_{50}$  vrednosti, odnosno koncentracija jedinjenja koja dovodi do 50% inhibicije rasta ćelija u odnosu na kontrolu, koncentracija koja dovodi do potpune inhibicije rasta i koncentracija jedinjenja koja dovodi do smrti 50% ćelija u odnosu na kontrolni uzorak, redom. Merenje inhibitorne aktivnosti vrši se nakon 48 sati tretmana ćelija jedinjenjima primenom SRB eseja po utvrđenom protokolu.<sup>184</sup> U ovoj fazi testirano je sedam sintetisanih karbamata benzotiazola (**97–102** i **105**). Vrednosti  $GI_{50}$  prikazane su u tabeli 6 (vrednosti svih određenih parametara tokom ispitivanja jedinjenja na pet koncentracija i krive dozne zavisnosti dati si u Prilogu, slike P1a – P7b).

**Tabela 6.** *In vitro* antiproliferativna aktivnost (GI<sub>50</sub>, μM) na panelu 60 ćelijskih linija humanog kancera (NCI)

Ćelijska linija	97	98	99	100	101	102	105
<b>Leukemija</b>							
CCRF-CEM	26,8	3,33	>100	2,98	0,66	0,39	0,63
HL-60 (TB)	22,4	1,17	>100	0,26	0,27	0,31	0,35
K-562	2,48	0,39	>100	0,40	0,29	0,28	0,39
MOLT-4	3,07	3,26	>100	0,94	0,60	0,47	0,85
RPMI-8226	32,4	2,91	>100	1,56	1,29	0,50	1,04
SR	10,9	0,54	>100	0,43	0,27	0,19	0,27
<b>Nemikrocelularni karcinom pluća</b>							
A549/ATCC	17,1	0,83	>100	0,98	0,67	0,64	2,37
EKVX	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	1,27	0,56
HOP-62	20,8	3,80	>100	35,5	4,72	0,82	0,49
HOP-92	N.T.	N.T.	N.T.	0,39	1,04	0,41	1,44
NCI-H226	32,2	15,2	>100	>100	1,53	1,03	1,95
NCI-H23	53,7	6,92	>100	>100	4,48	0,90	1,15
NCI-H322M	24,1	6,37	>100	1,97	2,06	0,95	5,10
NCI-H460	18,7	2,44	>100	0,46	0,42	0,40	0,52
NCI-H522	14,0	0,31	>100	1,00	0,93	0,32	0,24
<b>Karcinom debelog creva</b>							
COLO 205	38,5	1,75	>100	0,80	0,38	0,26	0,53
HCC-2998	35,8	8,33	>100	>100	37,8	6,80	4,88
HCT-116	22,0	0,79	>100	0,47	0,43	0,37	0,47
HCT-15	20,1	0,67	>100	0,50	0,41	0,44	0,38
HT29	11,5	0,38	>100	0,40	0,38	0,34	0,35
KM12	16,3	0,76	>100	0,41	0,38	0,37	0,41
SW-620	11,7	0,55	>100	0,41	0,37	0,37	0,45
<b>Kancer CNS-a</b>							
SF-268	29,4	4,60	>100	18,5	1,45	15,8	0,87
SF-295	17,8	1,53	>100	0,64	0,34	0,39	0,39
SF-539	31,2	1,99	>100	0,56	0,27	0,33	0,40
SNB-19	24,9	5,12	>100	1,57	0,62	0,61	0,78
SNB-75	18,6	2,07	34,8	1,65	0,12	0,23	0,41
U251	19,6	1,62	>100	0,68	0,49	0,46	0,41
<b>Melanom</b>							
LOXIMVI	N.T.	N.T.	N.T.	1,13	0,63	0,56	0,46
MALME-3M	24,6	2,70	>100	0,52	N.T.	6,06	0,51
M14	28,6	0,62	>100	0,56	0,32	0,34	0,45
MDA-MB-435	1,48	0,20	17,5	0,17	0,12	0,07	0,19
SK-MEL-2	N.T.	N.T.	N.T.	0,63	0,44	0,31	0,43
SK-MEL-28	27,4	5,46	>100	2,72	0,96	2,81	66,2
SK-MEL-5	30,9	1,81	>100	1,25	0,39	0,37	0,66
UACC-257	39,0	2,70	>100	>100	0,87		>100
UACC-62	20,0	1,32	>100	0,42	0,55	0,44	0,32
<b>Karcinom ovarijuma</b>							
IGROV1	23,8	3,19	>100	0,62	1,46	1,30	0,94
OVCAR-3	20,4	1,87	>100	0,44	0,35	0,37	0,35
OVCAR-4	30,6	6,94	>100	>100	2,45	0,87	
OVCAR-5	43,7	6,75	>100	18,4	6,84	1,81	2,73
OVCAR-8	28,2	4,16	>100	>100	1,76	1,78	4,85

NCI/ADR-RES	23,1	0,95	>100	0,61	0,45	0,40	0,36
SK-OV-3	22,7	5,32	>100	2,47	0,64	0,40	0,54
<b>Karcinom bubrega</b>							
786-0	29,1	4,56	>100	2,32	0,53	0,39	0,54
A498	13,7	0,67	>100	0,27	0,13	0,12	1,22
ACHN	42,3	7,19	>100	36,0	0,91	0,82	0,91
CAKI-1	40,2	3,54	>100	N.T.	0,59	0,59	0,63
RXF 393	0,21	N.T.	23,0	>100	0,90	0,88	1,03
SN12C	23,7	3,10	>100	0,91	0,65	0,73	0,96
TK-10	22,8	4,48	>100	>100	8,44	2,91	2,25
UO-31	27,3	4,28	>100	2,22	1,05	0,60	1,39
<b>Karcinom prostate</b>							
PC-3	26,9	4,64	>100	0,96	0,73	0,55	0,80
DU-145	28,4	5,75	>100	>100	2,37	1,27	1,72
<b>Karcinom dojke</b>							
MCF-7	15,7	0,88	27,6	0,47	0,35	0,31	0,30
MDA-MB-231/ATCC	14,8	2,37	>100	0,94	1,28	0,58	0,95
HS 578T	19,4	2,17	>100	1,38	0,45	0,52	0,94
BT-549	29,9	2,23	>100	0,72	0,76	0,42	0,49
T-47D	33,3	3,55	>100	17,6	1,68	0,24	0,58
MDA-MB-468	16,4	1,26	0,20	0,55	0,30	0,49	0,56
<b>Srednja GI<sub>50</sub> vrednost</b>	19,9	2,13	81,2	2,14	0,74	0,58	0,83

<sup>a</sup>GI<sub>50</sub> vrednosti inhibicije proliferacije dobijene testiranjem aktivnosti jedinjenja u pet doza prema panelu od 60 ćelijskih linija kancera korišćenjem SRB eseja - N.T. – nije testirano

Rezultati prikazani u tabeli 6 ukazuju na značajnu antiproliferativnu aktivnost testiranih derivata benzotiazola. Jedinjenje sa najvećom inhibitornom aktivnošću, karbamat **102**, ostvarilo je GI<sub>50</sub> < 1 μM prema većini ćelijskih linija upotrebljenih u ovom testiranju. Za njim slede karbamati **101** i **105** sa submikromolarnim srednjim GI<sub>50</sub> vrednostima. Međusobnim poređenjem srednjih GI<sub>50</sub> vrednosti etil-karbamata (**97**, **98**, **101** i **105**) može se izvesti zaključak da alkil-grupa vezana za S-C(6) benzotiazolovog jezgra sa većim brojem C atoma doprinosi aktivnosti ispitivanog jedinjenja. Butil- i pentil-derivat **101** i **105**, aktivniji su u poređenju sa svojim etil- i propil-analogima **97** i **98**. Izostanak antitumorske aktivnosti O-C(6) derivata **99** (prosečna GI<sub>50</sub> vrednost > 81,2 μM), nedvosmisleno ukazuje na značaj S-C(6) supstituenta za inhibitorni potencijal derivata benzotiazola.

### 3.5.2.2 Određivanje maksimalne tolerisane doze u *in vivo* eksperimentu – akutna toksičnost (NCI)<sup>185</sup>

Sledeći korak u okviru NCI istraživanja predstavlja određivanje maksimalne tolerisane doze (MTD) eksperimentalnih jedinjenja, koja se može primeniti na zdravim miševima bez toksičnih efekata. U ovu svrhu koriste se ženke golih miševa bez timusa, dakle sa inhibiranim imunostimulacijom. Jedinjenja se primenjuju jednom, intraperitonealno (IP), rastvorena u fiziološkom rastvoru sa 10% DMSO i 0,05% Tween 80. Opservacioni period traje 14 dana. Jedinjenja odabrana za ispitivanje akutne toksičnosti **100** i **102** pokazala su se netoksičnim u koncentracijama 200 mg/kg i 400 mg/kg, redom.

### 3.5.2.3 Ispitivanje sposobnosti vezivanja jedinjenja za kolhicinsko vezivno mesto na tubulinu

Kolhicin je prvo poznato jedinjenje koje se vezuje za tubulin. Mesto vezivanja kolhicina nalazi se na površini heterodimera tubulina. Ugradnja heterodimera sa vezanim kolhicinom u rastući niz mikrotubule, destabilizuje nastajuće mikrotubulu i usporava polimerizaciju. Ometanje dinamičkih procesa mikrotubula ima antimitotički efekat i može dovesti do smrti ćelije.<sup>111</sup>

Primenom kolhicin/tubulinskog esejja po protokolu opisanom u literaturi ispitano je da li je antiproliferativna aktivnost novih derivata benzotiazola indukovana interakcijom jedinjenja sa tubulinom.<sup>186,187</sup> Deset odabranih jedinjenja (**97**, **99–102**, **105–108** i **110**) testirano je sa ciljem ispitivanja afiniteta ka kolhicinskom vezivnom mestu na tubulinu i inhibicije vezivanja kolhicina za tubulin. Eksperimentalna smeša sadrži 1  $\mu\text{M}$  tubulina, 5  $\mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H]kolhicina i ispitivano jedinjenje. Pod uslovima inkubacije smeše, veže se približno 60% [<sup>3</sup>H]kolhicina za tubulin. Vezivanje kolhicina određuje se tehnikom DEAE celuloznog filtera.<sup>188</sup> Merenja se izvode u triplikatu za svako jedinjenje. Izmeren je procenat inhibicije vezivanja kolhicina za tubulin u prisustvu odabranih jedinjenja na koncentracijama  $c = 5 \mu\text{M}$  i  $c = 50 \mu\text{M}$  (tabela 7). Kompetitivni inhibitor vezivanja kolhicina za tubulin, kombretastatin A-4 korišćen je kao pozitivna kontrola.

**Tabela 7.** Inhibicija vezivanja kolhicina za tubulin u prisustvu ispitivanih jedinjenja

Jedinjenje	% inhibicije $\pm$ SD	
	5 $\mu$ M	50 $\mu$ M
<b>97</b>	8,1 $\pm$ 5	8,4 $\pm$ 5
<b>99</b>	6,0 $\pm$ 4	7,7 $\pm$ 3
<b>100</b>	11 $\pm$ 4	10 $\pm$ 3
<b>101</b>	16 $\pm$ 1	19 $\pm$ 5
<b>102</b>	21 $\pm$ 0,7	25 $\pm$ 5
<b>105</b>	15 $\pm$ 3	14 $\pm$ 5
<b>106</b>	18 $\pm$ 3	19 $\pm$ 4
<b>107</b>	<b>8,1 <math>\pm</math> 5</b>	<b>14 <math>\pm</math> 0,6</b>
<b>108</b>	7,3 $\pm$ 5	7,2 $\pm$ 5
<b>110</b>	<b>11 <math>\pm</math> 1</b>	<b>40 <math>\pm</math> 5</b>
<b>Kombretastatin A-4</b>	98 $\pm$ 0,8	

Rezultati prikazani u tabeli 7 pokazuju da karbamati benzotiazola nisu kompetitivni inhibitori vezivanja kolhicina za tubulin, sa izuzetkom izobutiltio-derivata **107**, koji sa povećanjem koncentracije 10 puta, u manjoj meri iskazuje inhibitorski potencijal. Nasuprot karbamatima, amid **110** iskazuje dozno-zavisnu aktivnost i skoro četiri puta povećava stepen inhibicije sa povećanjem koncentracije od 5  $\mu$ M do 50  $\mu$ M. Povećanje inhibitorne sposobnosti sa povećanjem koncentracije jasno ukazuje da je amid **110** kompetitivni inhibitor vezivanja kolhicina za tubulin.

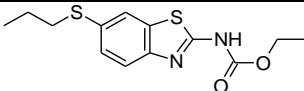
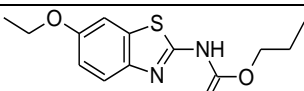
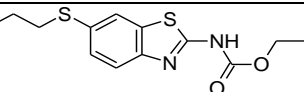
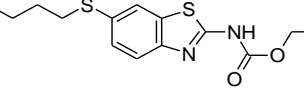
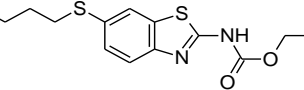
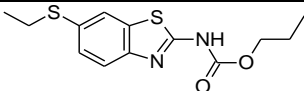
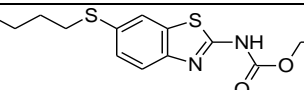
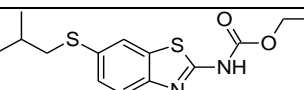
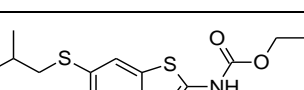
#### **3.5.2.4 Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti na ćelijske linije humanog kancera korišćenjem MTT esaja u *in vitro* uslovima**

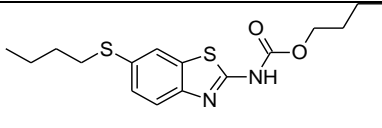
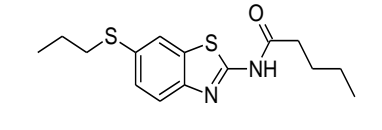
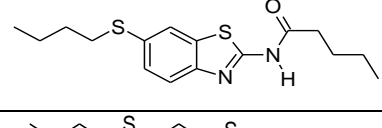
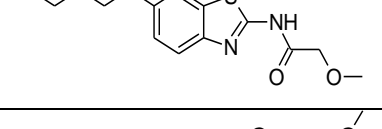
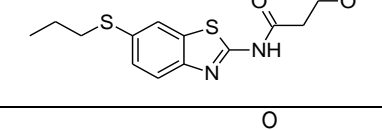
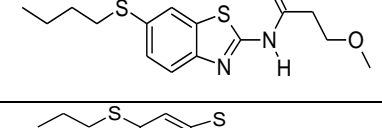
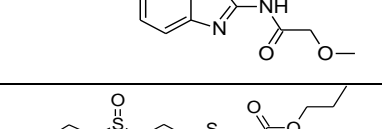
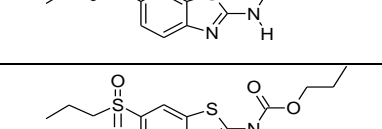
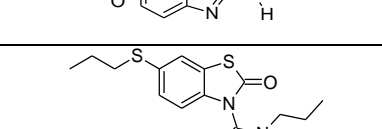
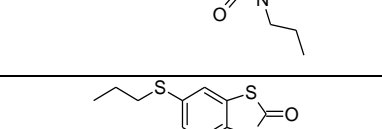
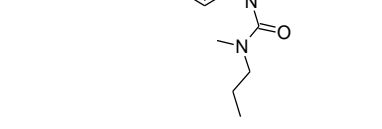
Inhibicija proliferacije malignih ćelija 20 sintetisanih derivata benzotiazola u *in vitro* uslovima, ispitana je korišćenjem MTT esaja<sup>189,190</sup> nakon 48 sati tretmana. MTT esej zasniva se na principu merenja aktivnosti NAD(P)H zavisnih oksidoreduktaza u ćelijama posle tretmana eksperimentalnim jedinjenjima. Za detekciju ove aktivnosti, koristi se boja (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT). Enzimi živih ćelija redukuju MTT do kristalnog formazana ljubičaste boje. Merenjem apsorpcije rastvora nastalog rastvaranjem formazana određuje se procenat biološke aktivnosti u poređenju sa



kontrolom. Za razliku od SRB esejja, kojim se određuje ukupna količina proteina,<sup>191</sup> MTT esej detektuje funkcionalnu enzimsku aktivnost ćelija. Primenom MTT esejja ispitana je aktivnost jedinjenja na četiri ćelijske linije humanog kancera i to MCF-7, kanceru dojke, A375, humanom melanomu, K562, mijeloidnoj leukemiji i Ntera2/D1, ćelijskoj liniji poreklom od embrionalnog humanom teratokarcinoma. Selektivnost odabranih jedinjenja prema ćelijama raka pokazana je poređenjem aktivnosti jedinjenja prema ćelijama humanog kancera i iskazane antiproliferativne aktivnosti na MRC-5, fetalnim fibroblastima pluća. Rezultati inhibicije proliferacije malignih ćelija derivatima benzotiazola u *in vitro* uslovima prikazani su u tabeli 8.

**Tabela 8.** *In vitro* antiproliferativna aktivnost derivata benzotiazola (MTT esej)

Jedinjenje	Struktura	IC <sub>50</sub> (µM)			
		MCF-7	A375	K562	NT2/D1
98		61,4±4,2	85,0±5,6	>100	>1
99		>100	>100	>100	-
100		<b>24,2±3,1</b>	>100	>100	<b>0,2±0,03</b>
101		>100	91,6±6,0	>100	>1
102		>100	45,2±3,4	>100	<b>0,1±0,01</b>
104		>100	-	-	>1
106		>100	-	-	>1
107		>100	-	-	>1
108		>100	>100	7,7±2,0	>1

109		>100	-	-	>1
110		30,5±2,5	77,5±4,5	53,2±4,0	>1
111		>100	>100	>100	>1
112		>100	>100	>100	>1
113		95,5±5,5	>100	66,3±4,2	>1
114		92,5±5,0	>100	44,2±3,3	>1
115		>100	>100	>100	>1
118		>100	-	-	-
119		>100	-	-	-
121		>100	-	-	-
122		>100	-	-	-
<b>Doksorubicin</b>		0,4	-	2	-
<b>Cisplatina</b>		-	-	-	1,1±0,17

Prikazani rezultati ukazuju na najveću osetljivost ćelija testikularnog karcinoma NT2/D1 na karbamate **100** i **102** sa IC<sub>50</sub> vrednostima 0,2 i 0,1 μM, redom. Ova jedinjenja aktivnija su u poređenju sa komercijalnim antitumorskim reagensom cisplatinom, koja je

upotrebljena kao referentno jedinjenje za NT2/D1 ćelijsku liniju. Za jedinjenja koja nisu pokazala 50% inhibicije proliferacije NT2/D1 ćelija u koncentraciji do 1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{IC}_{50}$  vrednosti nisu izračunate. Ostale ćelijske linije, posle 48 sati tretmana derivatima benzotiazola, sudeći po rezultatima MTT eseja, uglavnom zadržavaju metaboličku aktivnost. Najbolji inhibitori MCF-7 ćelija su 6-propilsulfanil-derivati, karbamat **100** ( $\text{IC}_{50} = 24,2 \mu\text{M}$ ) i amid **110** ( $\text{IC}_{50} = 30,2 \mu\text{M}$ ). Jedinjenje **110** pokazuje slabu aktivnost i prema ćelijskoj liniji melanoma A375 i leukemije K562. Poređenjem struktura i aktivnosti jedinjenja **110** i **111**, može se zaključiti da razlika u dužini alkilnog niza u samo jednoj metilenskoj grupi dovodi do potpunog izostanka aktivnosti jedinjenja **111**. Najbolju aktivnost prema ćelijskoj liniji K562 pokazalo je jedinjenje **108** sa  $\text{IC}_{50} = 7,7 \mu\text{M}$ . Jedinjenje **108** jedini je karbamat koji u značajnoj meri inhibira razvoj ćelijske linije leukemije. Slabu aktivnost na leukemiju pokazuju amidi **113**, **114** i već navedeno jedinjenje **110**. Metoksipropanamidi **113** i **114** pokazali su slabu aktivnost prema MCF-7 i K562 ćelijama, dok su njihovi metoksiacetamidni analozi **112** i **115** potpuno neaktivni.

Značajno je istaći da su najpotentniji derivati **100**, **102**, **108** i **110** vrlo selektivni prema ćelijama kancera i mogu se smatrati netoksičnim prema zdravim ćelijama, imajući u vidu da ne inhibiraju proliferaciju MRC-5, humanih fibroblasta pluća, ni pri koncentraciji 300  $\mu\text{M}$  *in vitro* ( $\text{IC}_{50} > 300 \mu\text{M}$ ).

Za detaljnija ispitivanja mehanizma dejstva derivata benzotiazola, odabrane su umereno osetljiva ćelijska linija kancera dojke, MCF-7 i vrlo osetljiva ćelijska linija NT2/D1, embrionalnog teratokarcinoma.

### **3.5.2.5 Ispitivanje uticaja derivata 2-aminobenzotiazola 100 i 110 na ćelijske procese MCF-7 ćelija**

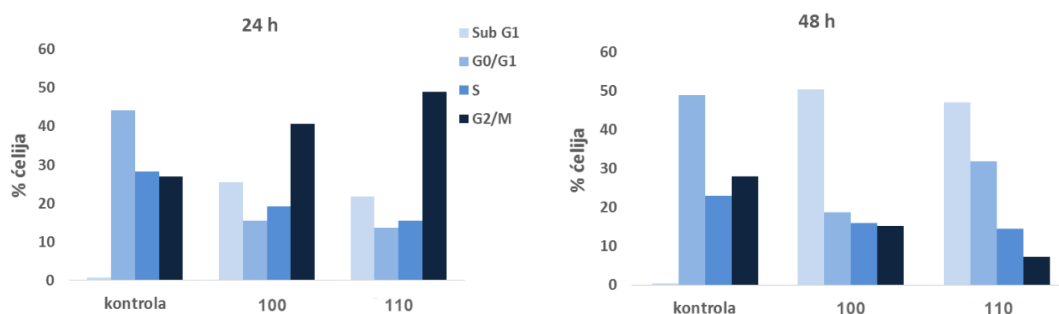
Potencijalni mehanizam dejstva i uticaj derivata benzotiazola na ćelijske procese i signalne puteve ćelijske linije MCF-7 ispitani su na primeru najaktivnijih jedinjenja prema ovoj ćelijskoj liniji, karbamata **100** i amida **110**. NCI analize antiproliferativne aktivnosti ovih jedinjenja prema MCF-7 ćelijama *in vitro* pokazale su da **100**, primenjen u koncentraciji 10  $\mu\text{M}$ , inhibira čak 84% rasta ovih ćelija u poređenju sa netretiranim ćelijama kontrolnog uzorka. Nađeno je da je taj procenat kod amida **110** nešto manji, 65%. Izračunata  $\text{GI}_{50}$  vrednosti jedinjenja **100** na MCF-7 ćelijskoj liniji je 0,47  $\mu\text{M}$ . Uprkos tome, rezultati dobijeni MTT esejem iskazuju tek umerenu aktivnost ovih jedinjenja posle 48 sati. Zbog navedenih razlika u detekciji i merenju aktivnosti ova dva

eseja, pretpostavljeno je da jedinjenja inhibiraju proliferaciju MCF-7 ćelija, ali da ćelije do trenutka detekcije zadržavaju metaboličku aktivnost.

Antiproliferativni efekti jedinjenja **100** i **110** ispitani su kontinuiranim tretmanima ćelija ekvipotentnim koncentracijama ova dva jedinjenja koje odgovaraju  $IC_{50}$  vrednostima, radi jednostavnijeg poređenja njihove aktivnosti ( $c(100) = 25 \mu M$ ,  $c(110) = 30 \mu M$ ).

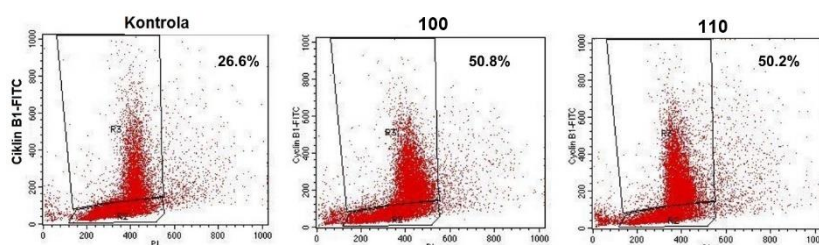
### **3.5.2.5.1 Uticaj derivata benzotiazola na distribuciju faza ćelijskog ciklusa i ćelijsku smrt MCF-7 ćelija**

Ćelijski ciklus predstavlja seriju događaja koji prethode deobi i dešavaju se tokom deobe ćelije. Kako je već navedeno, ćelijski ciklus čine četiri faze: G1, S, G2 i M. Na osnovu veličine ćelija i sadržaja DNK materijala moguće je, pomoću protočnog citometra, utvrditi u kojoj fazi se posmatrane ćelije nalaze. Promene u distribuciji po fazama, ćelija tretiranih eksperimentalnim jedinjenjima, u odnosu na kontrolne netretirane ćelije, upućuju na različita ćelijska oštećenja izazvana ispitivanim jedinjenjima. MCF-7 ćelije tretirane su 24 sata i 48 sati jedinjenjima **100** i **110**. Nakon tretmana, ćelije su fiksirane i obojene propidijum-jodidom (PI), koji se vezuje za DNK. Raspodela MCF-7 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 sata i 48 sati tretmana jedinjenjima **100** i **110** prikazana je na slici 28. Posle 24 sata, ispitivana jedinjenja dovode do akumulacije ćelija u G2/M fazi ciklusa, što znači da se zastoj u ćelijskom ciklusu javlja neposredno pre ili tokom mitoze. Paralelno sa porastom broja ćelija koje se nalaze u ovoj fazi, raste i broj ćelija u sub G1 populaciji, dok broj ćelija u G0/G1 i S fazi opada u poređenju sa kontrolnim netretiranim ćelijama. Sub G1 ćelije sadrže fragmentisanu DNK, i njihovo prisustvo može ukazivati na programiranu ćelijsku smrt, apoptozu. Posle 48 sati, približno 50% ćelija nalazi se u sub G1 fazi, odnosno sadrži degradiranu DNK.



**Slika 28.** Uticaj jedinjenja **100** i **110** u IC<sub>50</sub> koncentraciji na raspodelu MCF-7 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Paralelno sa analizom uticaja jedinjenja **100** i **110** na ćelijski ciklus MCF-7 ćelijske linije, ispitano je kako se pod dejstvom ovih jedinjenja menja nivo ekspresije ciklina B1 u poređenju sa netretiranim ćelijama posle 24 sata i 48 sati. Ciklin B1 je jedan od regulatornih proteina ćelijskog ciklusa. Pod normalnim uslovima, koncentracija ciklina B1 u jedru ćelije se povećava neposredno pred prelazak ćelije iz G2 faze u mitozu (M fazu).<sup>192</sup> Na slici 29 prikazani su histogrami dobijeni u eksperimentu izvedenom korišćenjem protočnog citometra. Posle 24 sata detektovan je porast nivoa ciklina B1 u poređenju sa kontrolom, što je u skladu sa iskazanim zastojem ćelijskog ciklusa i nagomilavanjem ćelija u G2/M fazi.

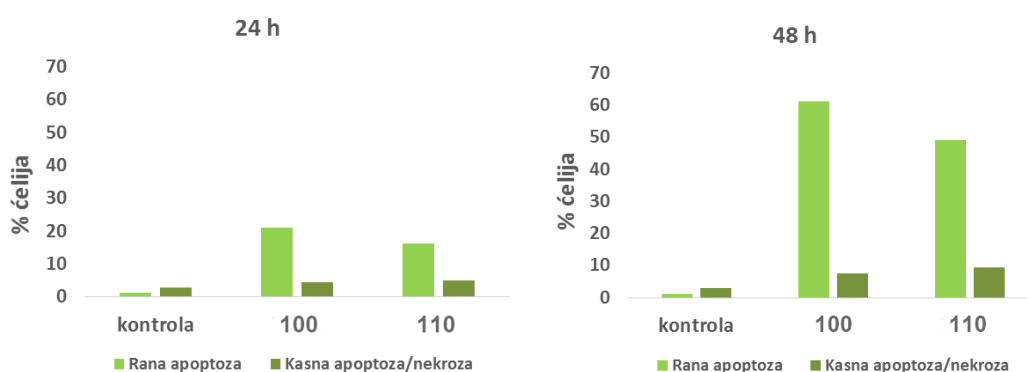


**Slika 29.** Uticaj jedinjenja **100** i **110** na nivo ciklina B1 MCF-7 ćelija posle 24 sata tretmana

Indicija proapoptoznog efekta jedinjenja **100** i **110** ispitana je u eksperimentu dvostrukog bojenja ćelija Annexin-om V i propidijum-jodidom (PI), koji direktno pokazuje da li se ćelije nalaze u ranoj ili kasnoj apoptozi i nekrozi. Jedan od ranih događaja apoptoze je premeštanje proteina fosfatidil-serina sa unutrašnje strane membrane citoplazme ka spoljašnjoj, na osnovu čega makrofage prepoznaju apoptotska tela.<sup>116</sup> Izuzetan afinitet proteina Annexina V ka vezivanju za fosfatidil-serin,<sup>193</sup> iskorišćen je za detekciju rane apoptoze u eksperimentu sa ćelijama. Da bi ovo vezivanje

moglo da se detektuje, Annexin V se u testu koristi vezan za boju FITC. Propidijum-jodid se vezuje za DNK, a to je moguće samo kada je narušen integritet ćelijske membrane. Bojenje DNK propidijum-jodidom dešava se kod nekrotičnih ćelija i kod ćelija u kasnim fazama apoptoze. Ćelije u ranoj fazi apoptoze boje se samo AnnexinV-FITC bojom. Raspodela obojenih ćelija praćena je korišćenjem protočnog citometra.

MCF-7 ćelije tretirane su jedinjenjima **100** i **110** u IC<sub>50</sub> koncentracijama 24 sata i 48 sati. Rezultati određivanja stepena apoptoze i nekroze posle tretmana prikazani su na slici 30. Posle 24 sata karbamat **100** indukuje apoptozu kod 21% ukupnog broja tretiranih ćelija. Po završetku tretmana (48 sati) 61% ćelija nalazi se u ranoj fazi apoptoze. Važno je istaći da se u kasnoj apoptozi/nekrozi nalazi tek 7,5% ćelija. Sličan efekat na MCF-7 ćelije, u nešto manjoj meri, ostvaruje i amid **110**. Zaključujemo da ispitivani derivati benzotiazola indukuju ranu apoptozu MCF-7 ćelija.

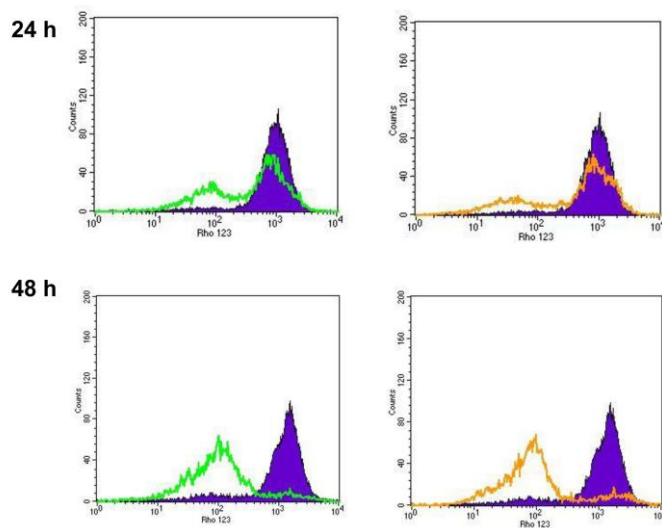


**Slika 30.** Uticaj jedinjenja **100** i **110** na indukciju apoptoze kod MCF-7 ćelija posle 24 sata i 48 sati tretmana

### 3.5.2.5.2 Efekat derivata benzotiazola na mitohondrijski membranski potencijal i regulatore apoptoze kod MCF-7 ćelija

Permeabilizacija spoljašnje mitohondrijske membrane indukuje depolarizaciju transmembranskog potencijala, što uzrokuje oslobađanje različitih apoptogenih proteina u citoplazmu ćelije.<sup>194</sup> Aktivnost mitohondrija u apoptozi ima centralnu ulogu u unutrašnjoj apoptozi, ali se može odvijati i tokom apoptoze inicirane receptorima smrti. Analizom uticaja jedinjenja na mitohondrije ne možemo nedvosmisleno zaključiti po kom se od ovih mehanizama odvija apoptoza izazvana ispitivanim derivatima benzotiazola, ali možemo pokazati da li mitohondrije učestvuju u iskazanoj apoptozi MCF-7 ćelija. Ispitali smo uticaj ovih jedinjenja na mitohondrijski membranski potencijal ( $\Delta\Psi_m$ ) tretiranih

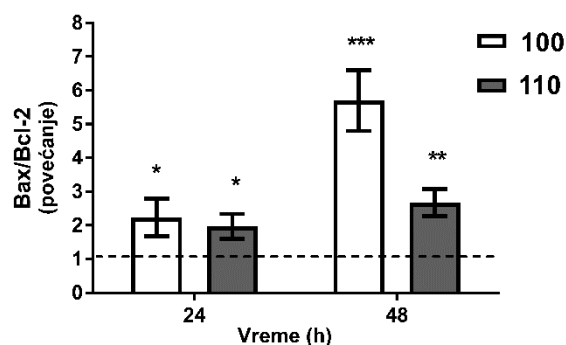
ćelija u različitim vremenskim intervalima. MCF-7 ćelije inkubirane su u prisustvu jedinjenja **100** i **110** u  $IC_{50}$  koncentracijama 24 sata i 48 sati. Ćelije su obojene Rhodaminom 123.<sup>195</sup> Stepen akumulacije katjonske boje u mitohondrijama proporcionalan je mitohondrijskom membranskom potencijalu.<sup>194</sup> Obojenost ćelija praćena je korišćenjem protoćnog citometra. Rezultati eksperimenta prikazani su na slici 31.



**Slika 31.** Uticaj jedinjenja **100** (zeleno) i **110** (narandžasto) na  $\Delta\Psi_m$  MCF-7 ćelija nakon tretmana 24 sata i 48 sati u poređenju sa kontrolnim ćelijama (ljubićasto) – reprezentativni histogrami

Posle 24 sata inkubacije ćelija sa karbamatom **100** i amidom **110**, mitohondrijski membranski potencijal se neznatno smanjuje. Posle 48 sati dolazi do drastićnog smanjenja akumulacije Rhodamina 123 u mitohondrijama više od 80% ćelija u poređenju sa kontrolom, što ukazuje na depolarizaciju membrane mitohondrija.

Permeabilnost mitohondrijske membrane kontrolišu proapoptozni i antiapoptozni ćlanovi Bcl-2 familije proteina. Imajući u vidu promene  $\Delta\Psi_m$ , ispitali smo uticaj jedinjenja na odnos proapoptoznog proteina Bax i antiapoptoznog Bcl-2 (Bax/Bcl-2) u MCF-7 ćelijama. Ćelije su tretirane jedinjenjima **100** i **110** u  $IC_{50}$  koncentracijama u kontinuitetu 24 sata i 48 sati. Međusobni odnos regulatornih proteina apoptoze posle tretmana, u poređenju sa kontrolom, prikazan je na slici 32.

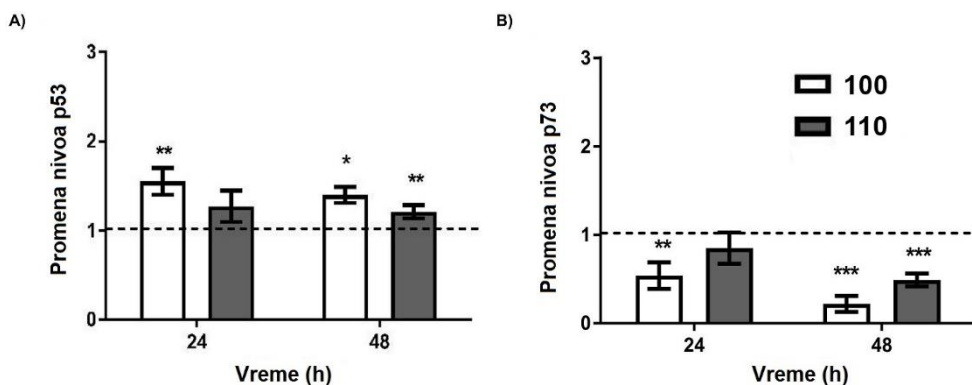


**Slika 32.** Odnos Bax/Bcl-2 posle 24 sata i 48 sati tretmana MCF-7 ćelija jedinjenjima **100** i **110** u poređenju sa kontrolom. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001

Posle 24 sata, nivo proapoptoznog proteina Bax se povećao, dok inkubacija ćelija sa jedinjenjima nije uticala na ekspresiju antiapoptoznog proteina Bcl-2. Tokom 48 sati, nivo Bax nastavlja da raste, dok nivo antiapoptoznog Bcl-2 opada, posebno u ćelijama tretiranim karbamatom **100**, kod kojih je više od pet puta veći odnos Bax/Bcl-2 u poređenju sa međusobnim odnosom ekspresije proteina u kontroli. Ove promene ukazuju na to da jedinjenja indukuju vremenski zavisnu apoptozu koja se dešava preko mitohondrija.

Poznato je da protein p53, kao transkripcioni faktor, utiče na ekspresiju i aktivaciju proapoptoznih gena nakon ćelijskog stresa. Pored transkripcione funkcije u jedru, p53 u citoplazmi, vezivanjem za antiapoptozne Bcl-2 proteine, direktno utiče na aktivaciju Bax proteina i apoptoze.<sup>196</sup> Ispitano je dejstvo derivata benzotiazola **100** i **110** na ekspresiju p53 i njemu srodnog p73 proteina. MCF-7 ćelije tretirane su ispitivanim jedinjenjima 24 sata i 48 sati u ekvipotentnim koncentracijama (IC<sub>50</sub>). Slika 33 pokazuje koliko puta se promenio nivo ispitivanih proteina u ćelijama nakon tretmana jedinjenjima u poređenju sa kontrolom.



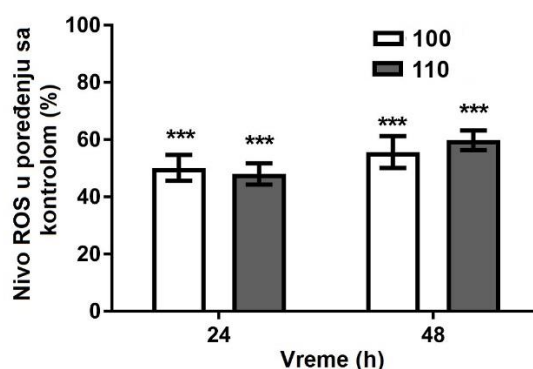


**Slika 33.** Efekat derivata **100** i **110** na p53 (A) i p73 (B) MCF-7 ćelija nakon 24 sata i 48 sati tretmana u poređenju sa kontrolom. Stubići pokazuju koliko se puta promenila ekspresija ispitivanih proteina u poređenju sa kontrolom (isprekidana linija). \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001

Tretman MCF-7 ćelija ispitivanim jedinjenjima dovodi do povećanja ekspresije p53 proteina, praćenog redukcijom nivoa p73 u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Rezultati ukazuju na to da se apoptoza odvija po p53-zavisnom mehanizmu. Može se pretpostaviti da je neočekivano smanjenje ekspresije p73, posledica razgradnje ovog proteina enzimskim delovanjem neke od egzekucionih kaspaza tokom apoptoze.<sup>197</sup>

### 3.5.2.5.3 Uticaj derivata benzotiazola na nivo unutarćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u MCF-7 ćelijama

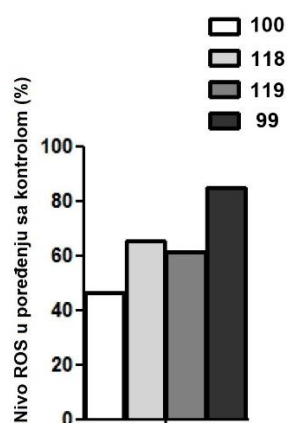
U nastavku ispitivanja antiproliferativnih efekata derivata benzotiazola na MCF-7 ćelijskoj liniji, analizirane su promene nivoa nastalih reaktivnih kiseoničnih vrsta izazvane inkubacijom ćelija sa jedinjenjima **100** i **110**. Ukupna količina ROS u trenutku merenja određena je pomoću protočnog citometra detekcijom boje DCF (dihlorfluorescein) koja nastaje reakcijom ROS sa DCFH-DA (2',7'-dihlordihidrofluorescein-diacetat). Ćelije su tretirane jedinjenjima 24 i 48 sati. Rezultati ispitivanja količine ukupnih ROS u odnosu na kontrolne netretirane ćelije prikazani su na slici 34.



**Slika 34.** Smanjenje nivoa ukupnih reaktivnih kiseoničnih vrsta u MCF-7 ćelijama nakon inkubacije sa IC<sub>50</sub> koncentracijama jedinjenja **100** i **110**. \*\*\*P <0,001

Rezultati eksperimenta pokazuju da ispitivani derivati posle tretmana tokom 24 sata dovode do smanjenja nivoa ukupnih ROS i do 50% u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Tendencija smanjivanja nivoa ROS nastavlja se i posle 48 sati. Bilo je potrebno utvrditi da li je ovakav rezultat posledica mogućih antioksidativnih osobina ispitivanih derivata i da li *hvatanje* reaktivnih kiseoničnih vrsta doprinosi antiproliferativnom efektu derivata benzotiazola.

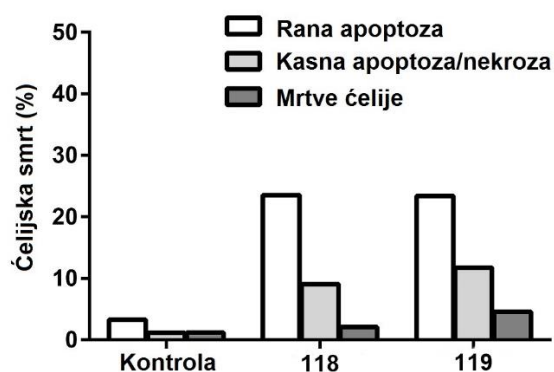
U sledećem eksperimentu ispitano je kako na produkciju ROS utiču derivati **100**, kod kojih je sumpor alkiltio-grupe, vezane za benzotiazol, oksidovan do sulfoksida (jedinjenje **118**), odnosno sulfonata (jedinjenje **119**). Takođe, izmeren je i nivo ROS u ćelijama tretiranim R<sub>1</sub>O-C(6) derivatom **99**. Rezultati prikazani na slici 35 pokazuju da inkubacija MCF-7 ćelija sa jedinjenjima u koncentraciji 25 μM 24 sata dovodi do redukcije nastajanja ROS. Očekivano, sulfoksid i sulfonat u manjoj meri smanjuju količinu ROS posle tretmana ćelija u poređenju sa **100**, kada se primene u istoj koncentraciji.



**Slika 35.** Nivo unutarćelijskih ROS MCF-7 ćelija posle inkubacije 24 sata sa jedinjenjima **100**, **118**, **119** i **99** ( $c = 25 \mu\text{M}$ ) u poređenju sa kontrolnim ćelijama (100 %).

Činjenica da i jedinjenje **99** delimično iskazuje ovakav efekat (15% redukcije ROS), govori o mogućim antioksidativnim osobinama sumpora tiazolovog prstena. Može se pretpostaviti i da, zahvaljujući nekoj drugoj osobini ili interakciji koju ostvaruju u MCF-7 ćelijama, ova jedinjenja indirektno utiču na produkciju ROS. Svakako, R<sub>1</sub>S-C(6) supstituent značajno doprinosi antioksidativnom dejstvu ispitivanih jedinjenja.

Kako bi se ispitalo da li je redukcija ROS u vezi sa proapoptoznim efektom derivata benzotiazola, određen je stepen apoptoze jedinjenja **118** i **119** pri koncentraciji  $25 \mu\text{M}$  nakon 24 sata tretmana MCF-7 ćelija korišćenjem eseja dvostrukog bojenja Aneksinom V i propidijum-jodidom. Rezultati su prikazani na slici 36. Uprkos izostanku aktivnosti sulfoksida i sulfonata *in vitro* u MTT eseju (tabela 7), jedinjenja su pokazala da uvode 25% ukupnog broja tretiranih ćelija u apoptozu. Ovaj rezultat blizak je ostvarenom apoptoznom efektu jedinjenja **100** posle 24 sata (21% ćelija u ranoj apoptozi), što ukazuje na to da oksidaciono stanje sumpora iz R<sub>1</sub>S-C(6) supstituenta benzotiazola ne utiče bitno na sposobnost indukovanja apoptoze.

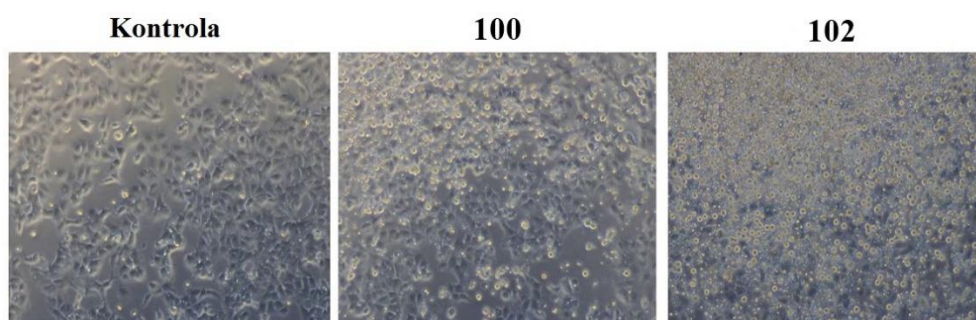


**Slika 36.** Apoptotski efekat jedinjenja **118** i **119** ( $c = 25 \mu\text{M}$ ) posle inkubacije 24 sata sa MCF-7 ćelijama

### 3.5.2.6 Ispitivanje uticaja karbamata **100** (IO115) i **102** (IO118) na ćelijske procese NT2/D1 ćelijske linije

Karbamati **100** i **102** efikasno inhibiraju proliferaciju NT2/D1 ćelija u submikromolarnim koncentracijama posle 48 sati tretmana ( $\text{IC}_{50}$  (**100**) =  $0,2 \mu\text{M}$ ;  $\text{IC}_{50}$  (**102**) =  $0,1 \mu\text{M}$ ). U narednom koraku ispitivanja mogućeg mehanizma dejstva ovih jedinjenja analizirano je na koji način utiču na apoptozu i ćelijske procese NT2/D1 ćelija.

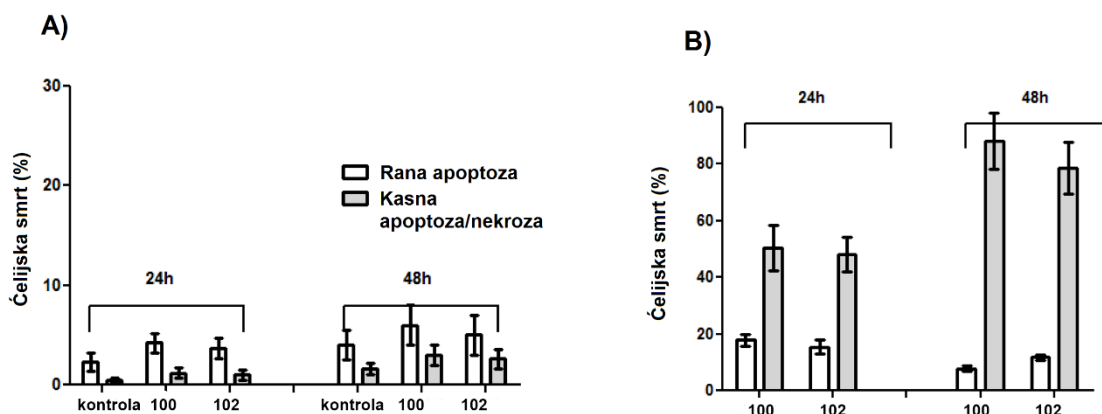
U eksperimentu dvostrukog bojenja Annexin V/PI, primena oba jedinjenja u  $\text{IC}_{50}$  koncentracijama, posle 24 sata, nije dovela do apoptoznog odgovora NT2/D1 ćelija. Kada su ćelije tretirane većom koncentracijom jedinjenja ( $1 \mu\text{M}$ ), primećeno je masovno odlepljivanje ćelija sa podloge (slika 37).



**Slika 37.** Gubitak sposobnosti adhezije NT2/D1 ćelija nakon 24 sata tretmana jedinjenjima **100** i **102** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ).

Gubitak sposobnosti adhezije koji nije praćen apoptozom predstavlja rizik za metastazno širenje tumora.<sup>198</sup> Iz tog razloga, ćelije su tretirane koncentracijom koja izaziva odlepljivanje ćelija ( $1 \mu\text{M}$ ) u toku 24 sata i 48 sati i određen je stepen apoptoze i

nekroze u odlepljenoj i adherentnoj populaciji zasebno. Rezultati ovog eksperimenta prikazani su na slici 38.



**Slika 38.** Čelijska smrt u adherentnim (A) i plivajućim (B) NT2/D1 ćelijama nakon 24 sata i 48 sati inkubacije sa karbamatima **100** i **102** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ).

Apoptozni odgovor ćelija na tretman jedinjenjima tokom vremena sličan je kod oba jedinjenja. Manje od 10% adherentnih ćelija nalazilo se u ranoj fazi apoptoze posle 48 sati eksperimenta. Kad je reč o plivajućim ćelijama, posle 48 sati, detektovano je više od 80% ćelija u kasnoj apoptozi.

Odlepljivanje ćelija sa podloge praćeno apoptozom upućuje na anoikis kao mogući model delovanja derivata benzotiazola u NT2/D1 ćelijama. Anoikis je poseban tip apoptoze, koja se javlja kao posledica gubitka sposobnosti vezivanja ćelije za ekstracelularni matriks.

Za više detalja koji prate ovu pojavu, ispitana je vijabilnost ćelija bojenjem Tripan plavom bojom (Trypan blue exclusion assay).<sup>199</sup> NT2/D1 ćelije su tretirane jedinjenjima **100** i **102** u koncentraciji  $1 \mu\text{M}$ . Posle 24 sata i 48 sati, po dodatku Tripan plavog određen je broj plivajućih i adherentnih ćelija, kao i procenat živih plivajućih ćelija. Žive ćelije se ne boje Tripan plavom bojom. Tabela 9 prikazuje rezultate testa.

**Tabela 9.** Vijabilnost i adhezija ćelija NT2/D1 posle tretmana jedinjenjima **100** i **102** ( $c = 1 \mu M$ )

Vreme (h)	Kontrola žive adherentne <sup>a</sup>	<b>100</b>				<b>102</b>			
		Adherentne <sup>a</sup>	Plivajuće <sup>a</sup>	Plivajuće <sup>b</sup> %	Žive plivajuće <sup>c</sup> %	Adherentne <sup>a</sup>	Plivajuće <sup>a</sup>	Plivajuće <sup>b</sup> %	Žive plivajuće <sup>c</sup> %
24	52±9	32±10	23±2	42	29	11±3	42±7	79	61
48	113±13	24±6	54±4	69	15	4±2	41±5	91	32

<sup>a</sup> broj ćelija  $\times 10^4$ ;

<sup>b</sup> % plivajućih u odnosu na ukupan broj ćelija;

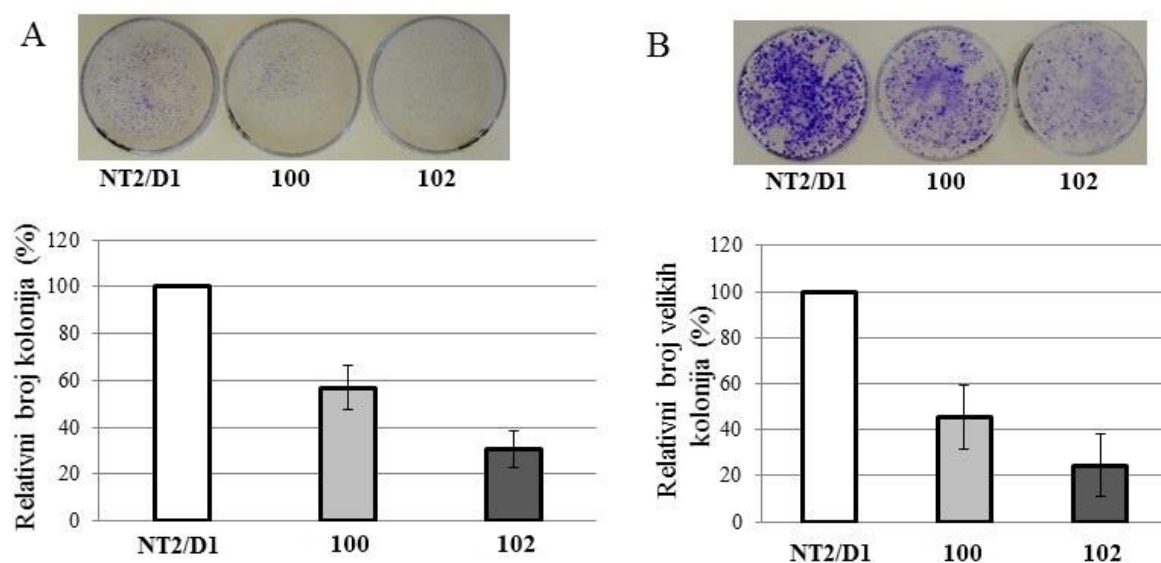
<sup>c</sup> % živih ćelija u odnosu na broj plivajućih ćelija. Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD tri nezavisna eksperimenta

Posle samo 24 sata inkubacije NT2/D1 ćelija sa jedinjenjima **100** i **102**, zapažen je visok procenat odlepljenih ćelija (42% i 79%, redom). Među plivajućim ćelijama bilo je 29% živih kod ćelija tretiranih jedinjenjem **100**, dok je u slučaju **102**, udeo živih ćelija među odlepljenim iznosio 61%. Broj odlepljenih ćelija posle 48 sati porastao je na 69% kod jedinjenja **100**, odnosno 91% u slučaju jedinjenja **102**, ali je broj živih ćelija među plivajućim značajno opao (samo 15% živih ćelija detektovano je među odlepljenim posle tretmana ćelija jedinjenjem **100**).

Rezultati ostvareni ispitivanjem vijabilnosti ćelija i apoptoze jasno ukazuju na to da karbamati **100** i **102** indukuju inhibiciju proliferacije NT2/D1 embrionalnog humanog teratokarcinoma, dovodeći najpre do gubitka adhezivne sposobnosti ćelija, a zatim do apoptoze. Pojava rezistencije na anoikis može dovesti do raznih patoloških stanja, uključujući i metastazu.<sup>124</sup> Iz tog razloga ispitano je kako ova jedinjenja, koja dovode do odlepljivanja ćelija, utiču na malignitet NT2/D1 ćelija.

### 3.5.2.6.1 Inhibicija rasta i formiranja kolonija NT2/D1 ćelija

Ispitana je sposobnost ćelija da formiraju kolonije nakon tretmana jedinjenjima, kao i uticaj tretmana na rast formiranih kolonija. Esej kojim se određuje efekat jedinjenja na formiranje kolonija izvodi se tako što se ćelije sade istovremeno sa dodatkom jedinjenja u subapoptoznoj koncentraciji. Važno je da ćelije tokom eksperimenta budu žive, pa su tretirane  $IC_{50}$  koncentracijama za **100** i **102** u kojima ne indukuju apoptozu (tabela 8). Posle sedam dana tretmana utvrđen je broj nastalih kolonija i upoređen je sa brojem kolonija formiranim u kontrolnim netretiranim ćelijama (slika 39A). Jedinjenje **102** pokazuje veću sposobnost inhibicije formiranja kolonija ćelija NT2/D1, čak 70%, u poređenju sa 40% ostvarene inhibicije jedinjenja **100**.



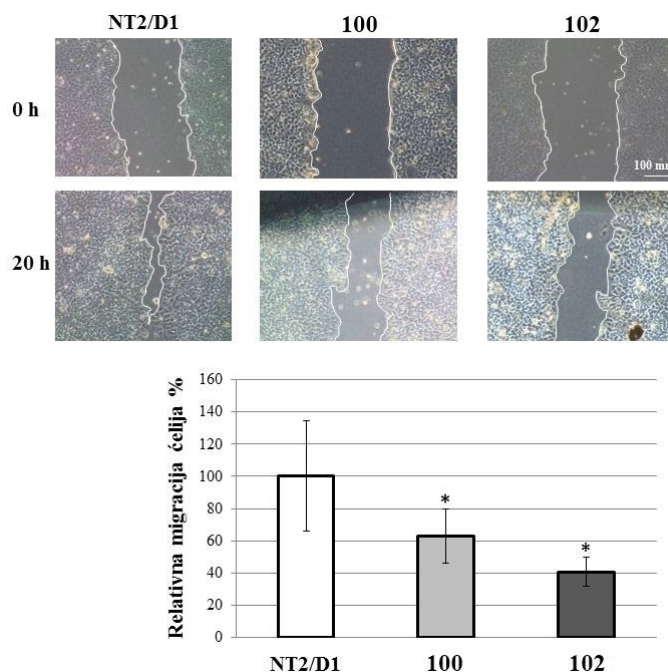
**Slika 39.** Prikaz uticaja derivata **100** i **102** na formiranje (A) i rast (B) kolonija. Prikazane su reprezentativne kolonije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SEM dva nezavisna ogleada.

Kad je reč o suzbijanju rasta kolonija, formirane kolonije, koje sadrže približno po 10 ćelija, tretirane su ispitivanim jedinjenjima **100** i **102** u  $IC_{50}$  koncentracijama. Po formiranju kolonija od 50 ćelija u kontrolnom uzorku, određen je broj i veličina kolonija prisutnih u tretiranim uzorcima ćelija. Rezultati ovog testa prikazani su na slici 39B. U poređenju sa kontrolom, ćelije koje su tretirane propilsulfanil-derivatom **100**, sadrže za 55% manji broj velikih kolonija, dok je u slučaju butilsulfanil-derivata **102**, procenat inhibicije rasta kolonija znatno viši i iznosi 75%.

### 3.5.2.6.2 Uticaj derivata benzotiazola na migratorni i invazivni potencijal NT2/D1 ćelija

Radi ispitivanja eventualne antimetastazne osobine jedinjenja, neophodno je ustanoviti njihov uticaj na migratornu sposobnost ćelija tumora i mogućnost invazije kroz ekstracelularni matriks. Činjenica da derivati benzotiazola **100** i **102** izazivaju masovno odlepljivanje ćelija sa podloge, doprinosi važnosti ispitivanja prirode njihovog efekta na migraciju ćelija. Za ispitivanje antimigratornog potencijala korišćen je *scratch* esej. NT2/D1 ćelije su zasejane i inkubirane u kompletnom medijumu. Po uspostavljanju konfluentnog monosloja, vrhom pipete zagrebano je po monosloju i tako formirana *rana*, odnosno prostor koji ne sadrži ćelije. Ćelije su zatim tretirane jedinjenjima **100** i **102** i

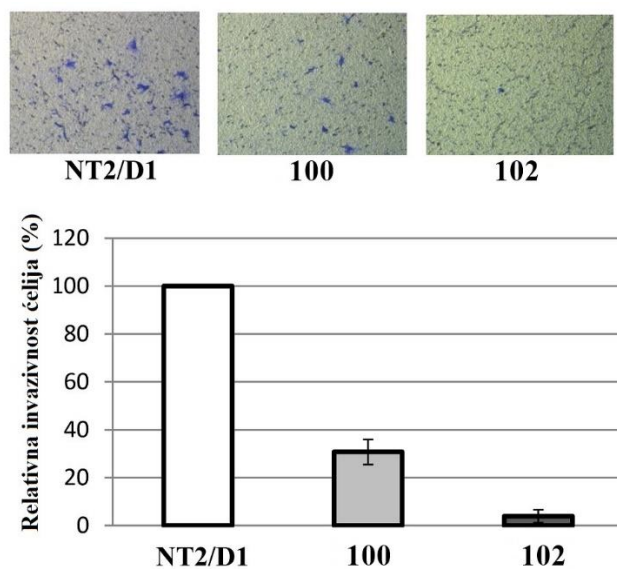
inkubirane 20 sati. Fotografije monoslojeva ćelija i praznine u trenucima  $t = 0$  h i  $t = 20$  h prikazane su na slici 40. Derivati **100** i **102** pokazali su značajnu inhibiciju migratornog potencijala tretiranih ćelija.



**Slika 40.** Efekti jedinjenja **100** i **102** na migratorni potencijal ćelija NT2/D1 posle 20 sati. Ogledi su izvedeni u triplikatu (\* $P < 0,01$ )

Uticaj derivata benzotiazola na invazivni potencijal NT2/D1 ćelija ispitan je u sledećem testu. Ćelije su tretirane subapoptoznim koncentracijama ispitivanih jedinjenja u medijumu bez hranljivog seruma tokom 24 sata i zasejane u insertima čija je donja površina (porozna membrana) prekrivena tankim slojem Matrigela. Matrigel je smeša proteina ekstracelularnog matriksa. Kao hemoatraktant korišćen je fetalni goveđi serum (FBS, fetal bovine serum). Tokom inkubacije u trajanju 48 sati, ćelije prolaze kroz poroznu membranu u deo sa hranljivom podlogom probijajući se kroz Matrigel. Određen je broj ćelija zadržanih na membrani sa strane ka hranljivom medijumu. U poređenju sa kontrolnim uzorkom netretiranih ćelija, ćelije tretirane karbamatima **100** i **102**, kako je prikazano na slici 41, pokazuju 70%, odnosno čak 95% inhibicije invazije NT2/D1 ćelija.





**Slika 41.** Inhibicija invazivnosti ćelija NT2/D1 jedinjenjima **100** ( $c = 0,2 \mu\text{M}$ ) i **102** ( $c = 0,1 \mu\text{M}$ )

### 3.5.3 Antitumorska aktivnost hinolinskog derivata **38** (MVNP001)

Antitumorska aktivnost **CQ** i derivata hinolina i njihova sposobnost senzitivizacije malignih ćelija prema hemoterapiji i radioterapiji intenzivno se ispituje u pretkliničkim i kliničkim studijama.<sup>149</sup> Nakon iskazivanja antimalarijske aktivnosti i visokog stepena netoksičnosti u *in vivo* uslovima prema različitim model-organizmima, ispitan je antitumorski potencijal derivata 4-aminohinolina **38** (MVNP001) u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

#### 3.5.3.1 Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **38** (MVNP001) u *in vitro* uslovima

Antitumorska aktivnost jedinjenja **38** (MVNP001) u *in vitro* uslovima ispitana je na dve ćelijske linije humanog adenokarcinoma dojke MCF-7 i MDA-MB-231 primenom MTT esaja. Dodatno, ispitan je antiproliferativni efekat jedinjenja **38** (MVNP001) na endotelnu ćelijsku liniju Ea.hy926, hibridu ljudskih somatskih ćelija. Izračunate su  $IC_{50}$  vrednosti antiproliferativne aktivnosti jedinjenja posle 48 sati kontinuiranog tretmana ćelija. Kao referentno jedinjenje za oglede na karcinomu dojke upotrebljen je **CQ**. Rezultati su prikazani u tabeli 10.

**Tabela 10.** *In vitro* antiproliferativna aktivnost jedinjenja **38 (MVNP001)**

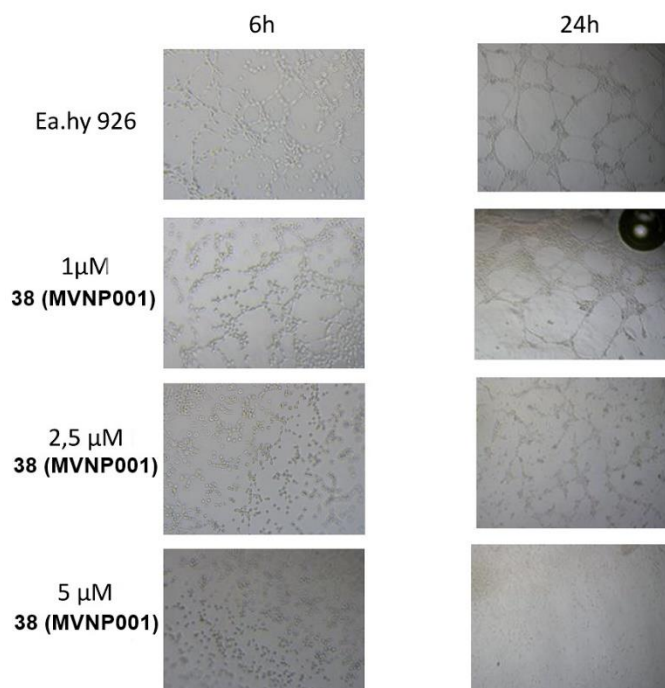
Jedinjenje	MCF-7 IC <sub>50</sub> (µM)	MDA-MB-231 IC <sub>50</sub> (µM)	Ea.hy926 IC <sub>50</sub> (µM)
<b>38 (MVNP001)</b>	4,2	2,0	8 ± 2
<b>CQ</b>	>100	60	-

Derivat 4-aminohinolina **38 (MVNP001)** pokazao je značajan stepen inhibicije proliferacije obe ispitivane ćelijske linije karcinoma dojke posle 48 sati tretmana. Rezultati ukazuju na dvostruko veću osetljivost invazivnije, hormonski-nezavisne ćelijske linije MDA-MB-231 prema jedinjenju **38 (MVNP001)** u poređenju sa MCF-7 ćelijama. Selektivnost ka MDA-MB-231 ćelijskoj liniji zabeležena je i u slučaju **CQ**, koji je 30 puta slabiji inhibitor proliferacije ove ćelijske linije u poređenju sa derivatom **38 (MVNP001)**.

Inhibitorna aktivnost jedinjenja **38 (MVNP001)** prema endotelnim ćelijama Ea.hy926 (IC<sub>50</sub> = 8 ± 2 µM) ukazuje na moguć uticaj jedinjenja na uspostavljanje vezivnih elemenata, proces angiogeneze.

#### **3.5.3.1.1 Inhibicija formiranja tubularnih struktura endotelних ćelija u Matrigelu**

Moguće antiangiogenozno dejstvo hinolinskog derivata **38 (MVNP001)** ispitano je primenom eseja kojim se analizira uticaj jedinjenja na sposobnost endotelnih ćelija Ea.hy926 za građenje tubularnih struktura u Matrigelu, smeši proteina ekstracelularnog matriksa (*Tube formation assay*, engl.). Proces morfološke reorganizacije Ea.hy926 ćelija zasejanih na Matrigelu i povezivanje ćelija koje vodi formiranju kompleksne mrežaste strukture, predstavlja pogodan *in vitro* model angiogeneze.<sup>200</sup> Ćelije su tretirane jedinjenjem **38 (MVNP001)** u koncentracijama manjim od antiproliferativne IC<sub>50</sub> vrednosti (1, 2,5 i 5 µM). Posle 12 sati tretmana, tretirane ćelije su zasejane na Matrigelu. Formiranje mreže tubularne strukture posmatrano je pod mikroskopom i fotografisano posle 6 sati i 24 sata inkubacije. Rezultati oglada predstavljeni su na slici 42.



**Slika 42.** Inhibicija formiranja mreže endotelnih ćelija Ea.hy926 u Matrigelu nakon 6 sati i 24 sata tretmana jedinjenjem **38 (MVNP001)** (1, 2,5 i 5  $\mu\text{M}$ )

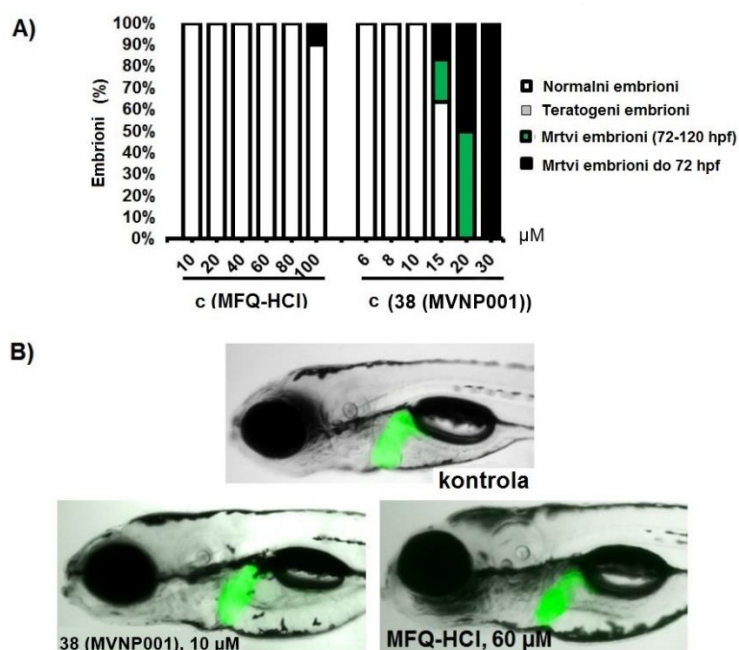
Fotografije tretiranih ćelija Ea.hy926 u Matrigelu posle 24 sata inkubacije jasno pokazuju kako sa povećanjem koncentracije jedinjenja **38 (MVNP001)** slabi intenzitet mrežne organizovanosti ćelija. Inhibicija umrežavanja endotelnih ćelija *in vitro* primenom ispitivanog jedinjenja u subtoksičnim koncentracijama može ukazivati na antiangiogeneznu aktivnost.

### 3.5.3.2 Ispitivanje toksičnosti i antitumorske aktivnosti jedinjenja **38 (MVNP001)** u *in vivo* uslovima – embrioni zebra-ribica

#### 3.5.3.2.1 Procena toksičnosti jedinjenja **38 (MVNP001)** prema embrionima zebra-ribica

Pored gore navedene evaluacije akutne toksičnosti jedinjenja **38 (MVNP001)** u *in vivo* uslovima na miševima, ispitana je i toksičnost jedinjenja prema embrionima tropskih slatkovodnih zebra-ribica vrste *Danio rerio*. Jednostavnost rukovanja velikim brojem jedinki transparentnih embriona koji se eksterno razvijaju i izuzetno poklapanje efekata koje tretman eksperimentalnim jedinjenjima u embrionima ribica i sisarima indukuje, čine zebra-ribice dobrim modelom za procenu *in vivo* toksičnosti bioaktivnih molekula u razvoju.<sup>201,202</sup>

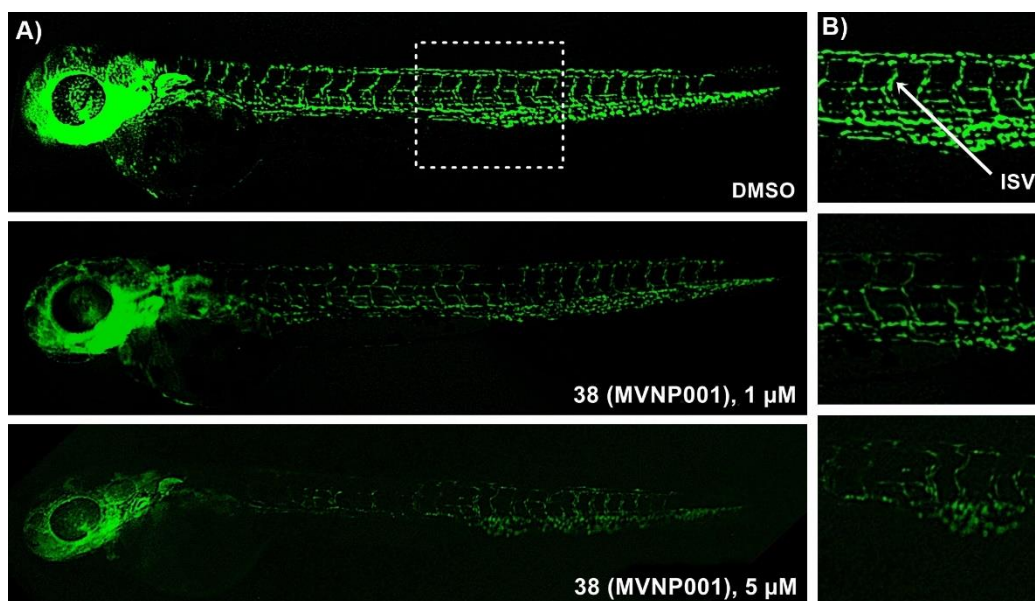
Rezultati ispitivanja teratogenosti i hepatotoksičnosti jedinjenja **38 (MVNP001)** prema embrionima zebra-ribica prikazani su na slici 43. Komercijalni antimalarik meflokin u obliku HCl soli (**MFQ-HCl**) je korišćen kao kontrolno jedinjenje. Teratogeni efekti i letalnost ispitivanog jedinjenja praćeni su tokom tretmana embriona 120 sati (slika 43A). Tretman embriona zebra-ribica jedinjenjem **38 (MVNP001)** ne dovodi do teratogenih promena na embrionima. Jedinjenje **38 (MVNP001)** primenjeno u koncentraciji 18,49  $\mu\text{M}$  dovodi do smrti 50% embriona ( $\text{LC}_{50}$ ). Hepatotoksičnost jedinjenja je ispitana na embrionima transgenom Tg(*I-fabr*: EGFP) soja zebra-ribica. Na slici 43B prikazan je uticaj jedinjenja **38 (MVNP001)** na morfologiju jetre Tg(*I-fabr*: EGFP) embriona zebra-ribica 120 hpf, primenjenog u koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  za koju je pokazano da nije letalna. Rezultati testa pokazuju da ispitivano jedinjenje nije hepatotoksično. Takođe, jedinjenje ne indukuje imunosupresivnost (primedba eksperimentatora autoru teksta).



**Slika 43. A)** Procena toksičnosti jedinjenja prema embrionima zebra-ribica 120 sati posle fertilizacije (120 hpf). Rezultati su prikazani kao procenat živih embriona pri različitim primenjenim koncentracijama jedinjenja **38 (MVNP001)** i kontrole **MFQ-HCl**. **B)** Prikaz morfologije jetre Tg(*I-fabr*: EGFP) embriona zebra-ribica 120 hpf posle tretmana jedinjenjem **38 (MVNP001)** (10  $\mu\text{M}$ ) i kontrolom **MFQ-HCl** (60  $\mu\text{M}$ ) u poređenju sa netretiranim embrionima.

### 3.5.3.2.2 Antitumorska aktivnost jedinjenja 38 (MVNP001) u *in vivo* uslovima – inhibicija angiogeneze i ksenograft model tumora na embrionima zebra-ribica

Antitumorska aktivnost jedinjenja **38 (MVNP001)** ispitana je i u *in vivo* uslovima, na embrionima zebra-ribica. Ispitan je uticaj jedinjenja na proces angiogeneze transgenih *Tg(fli1:EGFP)* embriona sa fluorescentno obeleženim endotelnim ćelijama koje se mogu pratiti fluorescentnom mikroskopijom. Embrioni su šest sati nakon fertilizacije tretirani različitim koncentracijama jedinjenja **38 (MVNP001)** (1  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$ ) pri kojim je u prethodnom eksperimentu utvrđeno da ne pokazuje embriotoksičnost. Nakon 48 sati tretmana, embrioni su anestetizirani trikainom i fotografisani pod fluorescentnim mikroskopom. Posmatran je efekat jedinjenja na broj i dužinu intersegmentalnih krvnih sudova (ISV, *intersegmental blood vessels*) u poređenju sa netretiranom kontrolom. Negativnu kontrolu činili su embrioni tretirani samo sa DMSO. Rezultati su prikazani na slici 44.



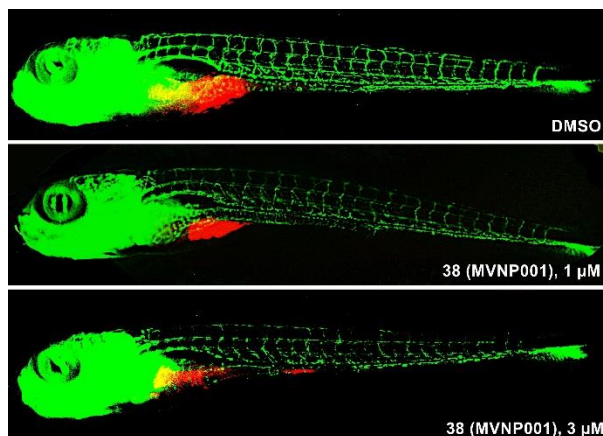
**Slika 44.** A) Antiangiogenetski efekat jedinjenja **38 (MVNP001)** na embrione zebra-ribica detektovan 48 sati posle fertilizacije kada su embrioni tretirani jedinjenjem 6 hpf. Zelenom bojom su prikazani intersegmentalni krvni sudovi (ISV). B) Uveličani delovi fotografija sa leve strane (deo označen isprekidanom linijom).

Posmatranjem intersegmentalnih krvnih sudova (ISV) embriona zebra-ribica, koji su tretirani ispitivanim jedinjenjem **38 (MVNP001)** šest sati posle oplodnje, nađeno je da

ovaj derivat snažno inhibira formiranje ISV i na nižoj primenjenoj koncentraciji (1  $\mu$ M). Sa povećanjem koncentracije, raste i inhibitorna sposobnost jedinjenja **38 (MVNP001)**.

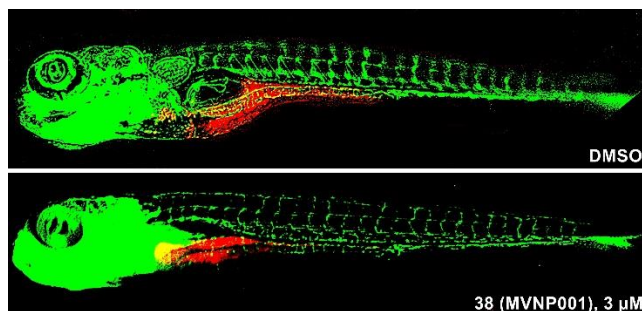
Paralelno sa ispitivanjem antiangiogenih osobina, ispitana je inhibitorna sposobnost jedinjenja **38 (MVNP001)** prema rastu i razvoju presađenih malignih ćelija u ksenograft modelu tumora na embrionima zebra-ribica. Ksenotransplantacija predstavlja presađivanje ćelija, tkiva, ili organa specifičnih za jednu vrstu u životinju druge vrste. Termin ksenograft odnosi se na presađeni entitet. U poslednjoj deceniji, za ispitivanje tumora u *in vivo* uslovima, uspešno se koristi ksenotransplantacija ćelijskih linija humanog kancera u zebra-ribice.<sup>203</sup> U poređenju sa glodarima, na kojima se uobičajeno izvode ksenograft eksperimenti kada je reč o ispitivanju antitumorskog dejstva eksperimentalnih terapeutika, ogledi sa zebra-ribicama su jednostavniji i iziskuju manju količinu dragocenog ispitivanog jedinjenja. Takođe, larve zebra-ribica u ranoj fazi nemaju razvijen adaptivni imunostem,<sup>204</sup> pa nije potrebno izvoditi imunosupresiju.

Ispitivanje antitumorske aktivnosti jedinjenja **38 (MVNP001)** *in vivo* izvedeno je na ksenograft modelu MCF-7 i MDA-MB-231 ćelijskih linija humanog kancera dojke na transgenim *Tg(fill:EGFP)* embrionima zebra-ribica. Fluorescentno obeležene maligne ćelije su presađene u anestetizirane embrione 48 – 50 sati posle fertilizacije direktnim injektovanjem u žumančanu kesu. Embrioni su tretirani različitim koncentracijama jedinjenja **38 (MVNP001)** (MCF-7: 1  $\mu$ M i 3  $\mu$ M, MDA-MB-231: 3  $\mu$ M) i inkubirani na 33 °C 120 hpf. Jedinjenje je dodato u medijum, tako da ga embrioni uzimaju difuzijom kroz telo, oralno, aktivnim i pasivnim transportom. Negativnu kontrolu predstavljali su embrioni tretirani sa DMSO. Posmatran je efekat jedinjenja na veličinu tumora i angiogenezu 120 sati nakon fertilizacije pod fluorescentnim mikroskopom. Rezultati su prikazani na slikama 45 i 46.



**Slika 45.** Ispitivanje antitumorskog dejstva jedinjenja **38 (MVNP001)** - ksenograft model tumora na embrionima zebra-ribica (MCF-7 ćelijska linija). Tumor je predstavljen crvenom bojom. Krvni sudovi su obojeni zeleno. Embrioni su tretirani jedinjenjem u koncentracijama 1  $\mu\text{M}$  i 3  $\mu\text{M}$ .

Na slici 45 koja prikazuje embrione sa presađenom MCF-7 ćelijskom linijom, tretirane jedinjenjem **38 (MVNP001)** u koncentracijama 1  $\mu\text{M}$  i 3  $\mu\text{M}$ , primećena je značajna inhibicija razvoja tumora (crvena boja) u poređenju sa kontrolom. Takođe, rezultati ksenograft testa pokazuju da se sa povećanjem koncentracije jedinjenja povećava i njegova antiangiogenezna sposobnost.



**Slika 46.** Ispitivanje antitumorskog dejstva jedinjenja **38 (MVNP001)** - ksenograft model tumora na embrionima zebra-ribica (MDA-MB-231 ćelijska linija). Tumor je predstavljen crvenom bojom. Krvni sudovi su obojeni zeleno. Embrioni su tretirani jedinjenjem u koncentraciji 3  $\mu\text{M}$ .

Rezultati prikazani na slici 46 ukazuju da jedinjenje **38 (MVNP001)** dovodi do supresije razvoja tumora (crvena boja) koji potiče od transplantacije MDA-MB-231 ćelija u embrione zebra-ribica.

U ksenograft testovima takođe se može uočiti antiangiogenetsko dejstvo ispitivanog jedinjenja, ali u manjoj meri u poređenju sa efektom ispoljenim na transgenim embrionima na slici 44. Zaključujemo da derivat **38 (MVNP001)** ispoljava slabiji antiangiogenetski potencijal kada se primeni u kasnijoj fazi razvoja embriona (48 – 50 hpf) u poređenju sa antiangiogenetskim potencijalom iskazanim na embrionima koji su tretirani jedinjenjem 6 hpf, u ranijoj fazi razvoja.

### 3.6 Diskusija

Uprkos razvoju rezistencije parazita malarije prema antimalaricima čija se struktura zasniva na hinolinu, antimalarijska aktivnost derivata aminohinolina više decenija predstavlja predmet iscrpnih istraživanja. Razlog za to je njihova jednostavna sinteza i relativno nizak stepen toksičnosti prema zdravim organizmima.<sup>39</sup> Cilj ovih istraživanja je sinteza jedinjenja koje bi efikasnije i bez sporednih efekata inhibiralo razvoj parazita. Veća efikasnost i novi mehanizam delovanja potencijalno bi uticali na dinamiku razvoja rezistencije parazita. Dodatno, povoljne farmakološke osobine hinolinskih derivata predstavljaju osnov ispitivanja biološke aktivnosti ovih jedinjenja i prema drugim indikacijama, poput kancera, reumatidnog artritisa, virusnih oboljenja.<sup>149</sup>

Predmet ove disertacije je unapređenje antimalarijske aktivnosti derivata aminohinolina, ranije sintetisanih u okviru naše istraživačke grupe, uvođenjem novih strukturnih elemenata. Rezultati ispitivanja antiplazmodijalne aktivnosti novih jedinjenja prema različitim sojevima *P. falciparum* u eritrocitnoj fazi životnog ciklusa parazita ukazali su da produžavanje alkil-niza, koji povezuje aromatični nosač i aminohinolinsku farmakoforu, povoljno utiče na aktivnost jedinjenja. U ovoj disertaciji identifikovani su derivati koji efikasnije *in vitro* inhibiraju proliferaciju CQ-rezistentnih sojeva u poređenju sa CQ-osetljivim sojevima parazita. U tom smislu naročito su se istakli derivati **36** i **38 (MVNP001)**. Ovaj podatak, već u ranoj fazi istraživanja, ukazuje na mogući mehanizam dejstva novih derivata koji se razlikuje od mehanizma **CQ**, a koji potencijalno doprinosi prevazilaženju rezistencije parazita prema **CQ**. Derivati **53** i **54** dobijeni delimičnom redukcijom hinolinskog jezgra su takođe aktivniji prema rezistentnom soju *P. falciparum* u poređenju sa **CQ** i **MB**, ali je stepen njihove aktivnosti manji u poređenju sa hinolinskim analogima. Na osnovu rezultata BHIA eseja, novosintetisana jedinjenja efikasnije inhibiraju *in vitro* nastajanje  $\beta$ -hematina u odnosu na **CQ**, pa se može pretpostaviti da se



njihovo antiplazmodijalno dejstvo u eritrocitnoj fazi jednim delom odvija u hranljivoj vakuoli parazita.

Pored iskazane aktivnosti prema eritrocitnoj formi parazita, jedinjenja sa dugim alkil-nizom pokazala su se umereno gametocitocidnim. Izuzetno je značajan podatak da nova jedinjenja ispoljavaju aktivnost prema zrelim gametocitima, što nije uobičajeno za hinolinske šizonticide, koji obično deluju na gametocite u ranijim razvojnim fazama<sup>175</sup> (na pr. **CQ**). Gametocitocidno dejstvo je važno jer sprečava transmisiju infekcije u komarca. Pored novog mehanizma dejstva i prevazilaženja rezistencije, aktivnost antimalarika u više razvojnih faza parazita predstavlja jedan od najvažnijih zahteva kada je reč o efikasnom tretmanu malarije.<sup>49</sup> Sintetisani derivati aminohinolina sa dugim nizom pokazali su značajnu *in vitro* inhibiciju razvoja sporozoita *P. berghei* ANKA soja ( $IC_{50} < 1 \mu M$ ), pritom ne uzrokujući toksične efekte na hepatocitima. Procena toksičnosti derivata aminohinolina sa dugim alkil-mostom **36–38 (MVNP001)** u *in vivo* sistemu pokazala je da jedinjenja nisu toksična prema zdravim miševima kada se primene u dozi 160 mg/kg telesne mase miša. Jedinjenje sa zapaženom *in vitro* antimalarijskom aktivnošću u eritrocitnoj fazi i fazi jetre, **38 (MVNP001)** dva puta produžava život miševa inficiranih *P. berghei* parazitom u poređenju sa kontrolom, kada se primeni oralno u koncentracijama 40 mg/kg i 80 mg/kg. Pošto ovo jedinjenje nije toksično ni pri koncentraciji (160 mg/kg), kandidat je za ispitivanje suzbijanja parazitemije i pri višim koncentracijama.

Kako je već navedeno, visok stepen proliferacije je zajednička karakteristika parazita malarije u pojedinim fazama životnog ciklusa i ćelija tumora. Imajući u vidu značajnu antimalarijsku aktivnost jedinjenja **38 (MVNP001)** u eritrocitnoj fazi u kojoj se parazit malarije intenzivno razmnožava i posebno izostanak toksičnosti u *in vivo* sistemu, a uzimajući u obzir aktivnost pojedinih derivata hinolina na ćelije tumora,<sup>149</sup> ispitana je i njegova antitumorska aktivnost. Inhibitorna sposobnost **38 (MVNP001)**, iskazana u *in vitro* uslovima prema proliferaciji dve ćelijske linije humanog adenokarcinoma dojke, hormonski-zavisne MCF-7 i u većoj meri invazivne MDA-MB-231, usmerila je istraživanje ka ispitivanju antitumorske aktivnosti ovog jedinjenja u *in vivo* uslovima. Za procenu antitumorske aktivnosti u *in vivo* uslovima odabrani su embrioni zebra-ribica, model-organizmi koji su veoma pogodni za praćenje uticaja dejstva eksperimentalnih terapeutika na razvoj bioloških funkcija. Transparentnost zebra-ribica pruža odličan uvid u morfologiju sistema organa, a jednostavnost gajenja olakšava izvođenje eksperimenata.

Najvažnije, zebra-ribice poseduje visok stepen genske homologije sa ljudima, pa se rezultati dobijeni u eksperimentima na njima lako transliraju i na više organizme.<sup>201,202</sup> Jedinjenje **38 (MVNP001)** nije pokazalo znake hepatotoksičnosti ni teratogenosti prema divljem soju *Danio rerio* embriona zebra-ribica ni pri koncentraciji 10  $\mu$ M. Kako je prethodno u *in vitro* eseju na endotelnim ćelijama Ea.hy926 jedinjenje u subtoksičnim koncentracijama inhibiralo nastajanje tubularnih struktura u Matrigelu, indicija mogućeg antiangiogenoznog efekta ispitana je na embrionima zebra-ribica. Supresija angiogeneze pokazana je na embrionima starim 6 hpf. Jedinjenje **38 (MVNP001)** pokazuje inhibitornu sposobnost jedinjenja prema formiranju krvnih sudova, procesu koji je ključan za metastazno širenje tumora. U ksenograft modelu kancera na embrionima zebra-ribica, koji je uspostavljen transplantacijom ćelijskih linija MCF-7 i MDA-MB-231 injektovanjem u žumančanu kesu embriona, jedinjenje je pokazalo inhibiciju razvoja tumora uz antiangiogenozni efekat. Antiangiogenozni efekat koji jedinjenje ispoljava kada se primeni nakon ksenotransplantacije malignih ćelija, slabijeg je intenziteta u poređenju sa efektom pokazanim na embrionima 6 hpf koji nemaju razvijen sistem krvnih sudova na početku tretmana.

Rezultati biološkog ispitivanja predočavaju da je dalje ispitivanje derivata 4-aminohinolina **38 (MVNP001)** u kontekstu potencijalnog terapijskog delovanja nužno, imajući u vidu iskazanu aktivnost na dve indikacije, malariju, u više faza životnog ciklusa parazita, i izraženom aktivnošću na kancer, sa nezanemarljivom selektivnošću.

Paralelno sa sintezom i ispitivanjem biološke aktivnosti derivata aminohinolina, predmet ove disertacije bio je i sinteza derivata benzotiazola i procena njihove antitumorske aktivnosti. U literaturi je poznato da jedinjenja čija se struktura zasniva na benzotiazolu iskazuju širok spektar bioloških aktivnosti.<sup>135</sup> Pokazano je da supstituisanost 2-aminobenzotiazola različitim grupama u položaju C(6) ima uticaj na antitumorsko dejstvo benzotiazola.<sup>148</sup> U okviru našeg istraživanja sintetisani su novi derivati karbamata i amida benzotiazola sa tioalkil-grupama u položaju C(6) benzotiazolovog jezgra. *In vitro* antiproliferativna aktivnost novih derivata iskazana je prema širokom spektru ćelijskih linija humanog kancera.

Uvid u detaljniji mehanizam dejstva derivata benzotiazola na ćelijskom nivou pružili su rezultati eksperimenata izvedenih na MCF-7, ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma dojke i NT2/D1, ćelijskoj liniji humanog teratokarcinoma. Derivati

odabrani za ova ispitivanja su pokazali izuzetnu selektivnost prema ćelijama tumora u poređenju sa MRC-5 ćelijama humanih fibroblasta pluća. Karbamat **100** i amid **110**, najpotentniji *in vitro* inhibitori proliferacije MCF-7 ćelija, zaustavljaju ćelijski ciklus u G2/M fazi uvodeći ćelije u proces programirane ćelijske smrti, apoptozu. Apoptoza je poželjan vid ćelijske smrti jer izaziva manje sporednih efekata po okolno tkivo apoptozne ćelije u poređenju sa nekrozom.<sup>114</sup> Apoptoza MCF-7 ćelija odigrava se uz promenu potencijala mitohondrijske membrane i povećanje nivoa proapoptoznog Bcl-2 proteina, regulatora apoptoze. Paralelno sa indukcijom apoptoze, jedinjenja **100** i **110** dovode do smanjenja nivoa unutarćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Praćenjem nivoa ROS u MCF-7 ćelijama nakon tretmana ćelija sulfonil- i sulfoksi-derivatima tio-analoga **100** utvrdili smo da smanjenje antioksidativnog potencijala umanjuje i sposobnost jedinjenja prema redukciji nastajanja ROS. Međutim, promena antioksidativnog potencijala ne menja proapoptozne osobine jedinjenja. Efekat umanjavanja produkcije ROS, iako bez uticaja na antiproliferativna svojstva, mogao bi sprečiti neželjeni oksidativni učinak na zdrave ćelije iz okoline tumora, umanjujući toksičnost terapije kancera.

Najaktivniji inhibitori proliferacije ćelijske linije NT2/D1, karbamati **100** i **102**, uzrokuju gubitak sposobnosti adhezije ćelija za podlogu praćen masovnom apoptozom. Ispitivanje vijabilnosti ćelija u adherentnoj i plivajućoj populaciji ćelija nakon tretmana ovim jedinjenjima pokazao je da odlepljivanje ćelija sa podloge prati apoptoza. Ovakav sled događaja upućuje na anoikis, apoptozu uzrokovanu gubitkom adhezivne sposobnosti za matriks i međućelijskih veza. Iako je pokazano da odlepljivanje ćelija, inicirano tretmanom jedinjenjima, prati apoptoza, udaljavanje ćelija tumora sa primarnog mesta predstavlja potencijalnu opasnost od metastaznog širenja.<sup>205</sup> Međutim, jedinjenja **100** i **102**, primenjena u subapoptoznim koncentracijama, u velikoj meri inhibiraju migracionu i invazivnu sposobnost NT2/D1 ćelija. Uzevši u obzir visok stepen inhibicije proliferacije NT2/D1 ćelija, iskazan izuzetan antimigracioni i antiinvazivni potencijal i izostanak toksičnih efekata na zdravim miševima, derivati benzotiazola **100** i **102** mogu se smatrati dobrim kandidatima za dalje ispitivanje njihovog antitumorskog i antimetastaznog dejstva.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

Tačke topljenja određivane su na Boetius PMHK aparatu i nisu korigovane. IR spektri snimani su na Perkin-Elmer FT-IR 1725X i Thermo-Scientific Nicolet 6700 FT-IR diamond crystal spektrofotometru. Položaji apsorpcionih traka izraženi su u  $\text{cm}^{-1}$ . Intenzitet apsorpcionih traka u IR spektrima: sl (slaba), sr (srednja), j (jaka) traka.  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimani su na Bruker Ultrashield Advance III spektrometru (na 500 i 125 MHz) i Varian Gemini-200 spektrometru (na 200 i 50 MHz) u navedenom rastvaraču, sa TMS kao unutrašnjim standardom. Hemijska pomeranja izražena su u ppm ( $\delta$ ), konstante kuplovanja ( $J$ ) u Hz, a multiplicitet signala označen je kao s (singlet), ps (proširen singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), ABq (AB kvartet), dd (dublet dubleta), 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-MS spektrometrom (Agilent Technologies) u pozitivnom ili negativnom jon-modu. Uzorci su rastvarani u čistom  $\text{CH}_3\text{CN}$  ili MeOH HPLC čistoće. Kao mobilna faza korišćena je smeša  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 1/1$  sa 0,2% HCOOH. ESI parametri: potencijal kapilare 4 kV; temperatura gasa  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ ; protok gasa za sušenje 12 L/min; pritisak raspršivača 45 psig i napon fragmentatora 70 V. ESI MS spektri derivata imidazola snimani su na LTQ Orbitrap XL masenom spektrometru u pozitivnom modu. Uzorak je uveden direktnim injektovanjem. Tip jonizacije je HESI. Vrednosti parametara: voltaža spreja 4,2 kV, napon kapilare 49 V, temperatura kapilare  $275 \text{ }^\circ\text{C}$ , protok gasa 12 L/min, protok pomoćnog gasa 3 L/min. GC/MS analize izvođene su na sistemu koji čine: Agilent Technologies 7890A gasni hromatograf, 5975C XL EI/CI MSD, FID detektor i HP-5 MS kolona ( $20 \text{ mm} \times 30 \text{ m} \times 0,25 \mu\text{m}$ ). Kao noseći gas korišćen je He (1 mL/min), a temperatura je linearno programirana u oblasti  $40\text{--}310 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $6 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ). 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 ( $70 \text{ eV}$ ) snimani su u opsegu  $30\text{--}550 \text{ m/z}$ . Za dry-flash hromatografiju korišćen je  $\text{SiO}_2$  ( $40\text{--}63 \mu\text{m}$ ). Prečišćavanja flash hromatografijom izvedena su na Biotage SP1 sistemu opremljenom UV detektorom i FLASH 12+, FLASH 25+ ili FLASH 40+ kolonama napunjenim sa KP-SIL ( $40\text{--}63 \mu\text{m}$ , prečnik pora  $60 \text{ \AA}$ ), KP-C18-HS ( $40\text{--}63 \mu\text{m}$ , prečnik pora  $90 \text{ \AA}$ ) ili KP-NH ( $40\text{--}63 \mu\text{m}$ , prečnik pora  $100 \text{ \AA}$ ) kao adsorbensima.

Tok reakcija praćen je tankoslojnom hromatografijom (TLC) na pločama Silica gel 60 F<sub>254</sub> i Silica gel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S (Merck). Reakcije pod uslovima ozračivanja mikrotalasima (MW) izvedene su u reaktoru Biotage Initiator 2.5. Čistoća jedinjenja određena je pomoću Agilent 1200 HPLC sistema opremljenog pumpom Quat Pump (G1311B), injektorom (G1329B) 1260 ALS, TCC 1260 (G1316A) i detektorom 1260 DAD VL+ (G1315C). HPLC čistoća svakog biološki ispitivanog jedinjenja određena je po dvema različitim metodama.

#### **HPLC metode:**

**Metoda A.** Zorbax Eclipse Plus C18 2.1 × 100 mm, 1.8μ, S.N. USUXU04444 se koristi kao stacionarna faza. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,2% HCOOH u vodi (A) i acetonitril (B). Hromatogram se snima na UV maksimumu ispitivanog jedinjenja da bi se ostvarila maksimalna selektivnost (330 nm za jedinjenja **36**, **53**, **54**, **75** i **78**, 320 nm za jedinjenja **76** i **77** i 295 nm za jedinjenje **118**). Koriste se rastvori jedinjenja u metanolu u koncentraciji ~1 mg/mL. Brzina protoka iznosi 0,5 mL/min (0,2 mL/min za jedinjenje **36**).

Jedinjenje **36** je eluirano sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–8 min 95% A → 5% A, 8–10 min 5% A, 10–12 min 5% A → 95% A, 12–14 min 95% A.

Jedinjenje **53** je eluirano sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–3 min 95% A → 5% A, 3–8 min 5% A, 8–10 min 5% A → 95% A, 10–11 min 95% A.

Jedinjenje **54** je eluirano sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–3 min 95% A → 5% A, 3–8 min 5% A, 8–10 min 5% A → 95% A.

Jedinjenja **75–78** eluirana su sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–2 min 95% A → 5% A, 2–10 min 5% A, 10–11 min 5% A → 95% A, 11–13 min 95% A.

Jedinjenje **118** eluirano je sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A → 5% A, 1–7 min 5% A, 7–8 min 5% A → 95% A, 8–10 min 95% A.

**Metoda B.** Zorbax Eclipse Plus C18 4.6 × 150 mm, 1.8μ S.N. USWKY01594 se koristi kao stacionarna faza. Eluent čine sledeći rastvarači: voda (A) i acetonitril (B). Hromatogram se snima na UV maksimumu ispitivanih jedinjenja da bi se ostvarila maksimalna selektivnost (330 nm za jedinjenje **36**, 290 nm za jedinjenja **107** i **108**, 280 nm za jedinjenje **109** i 270 nm za jedinjenja **121** i **122**). Koriste se rastvori jedinjenja u metanolu u koncentraciji ~1 mg/mL. Brzina protoka iznosi 0,5 mL/min.

Jedinjenje **36** je eluirano sistemom gradijenta: 0–1,5 min 95% A, 1,5–5 min 95% A → 5% A, 5–13 min 5% A, 13–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Jedinjenja **107** i **108** su eluirana sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–13 min 5% A, 13–14 min 5% A → 95% A, 14–17 min 95% A.

Jedinjenje **109** je eluirano sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–5 min 95% A → 5% A, 5–13 min 5% A, 13–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Jedinjenja **121** i **122** eluirana su sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–5 min 95% A → 5% A, 5–13 min 5% A, 13–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

**Metoda C.** Zorbax Eclipse Plus C18 4.6 × 150 mm, 1.8 $\mu$  S.N. USWKY01594 se koristi kao stacionarna faza. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,2% HCOOH u vodi (A) i metanol (B). Hromatogram se snima na UV maksimumu ispitivanog jedinjenja da bi se ostvarila maksimalna selektivnost (330 nm za jedinjenja **37** i **44**, 320 nm za jedinjenja **104** i **111–115**, 290 nm za jedinjenja **100**, **106** i **110** i 280 nm za jedinjenja **97–99** i **101–103**). Koriste se rastvori jedinjenja u metanolu u koncentraciji ~1 mg/mL. Brzina protoka iznosi 0,5 mL/min.

Jedinjenja **37** i **44** su eluirana sistemom gradijenta: 0–2 min 95% A, 2–6 min 95% A → 5% A, 6–17 min 5% A, 17–19 min 5% A → 95% A, 19–21 min 95% A.

Jedinjenja **97–99** i **101–103** su eluirana sistemom gradijenta: 0–0,5 min 95% A, 0,5–3 min 95% A → 5% A, 3–13 min 5% A, 13–14 min 5% A → 95% A, 14–16 min 95% A.

Jedinjenje **100** je eluirano sistemom gradijenta: 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, 18–21 min 95% A.

Jedinjenje **104** je eluirano sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–5 min 95% A → 5% A, 5–14 min 5% A, 14–15 min 5% A → 95% A, 15–16 min 95% A.

Jedinjenje **106** je eluirano sistemom gradijenta: 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, 18–20 min 95% A.

Jedinjenja **110–115** su eluirana sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–5 min 95% A → 5% A, 5–16 min 5% A, 16–18 min 5% A → 95% A.

**Metoda D.** Zorbax Eclipse Plus C18 4.6 × 150 mm, 1.8 $\mu$  S.N. USWKY01594 se koristi kao stacionarna faza. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,2% HCOOH u vodi (A) i acetonitril (B). Hromatogram se snima na UV maksimumu ispitivanog jedinjenja da bi se ostvarila maksimalna selektivnost (330 nm za jedinjenja **37** i **44**, 320 nm za jedinjenja **111–115**, 290 nm za jedinjenja **100**, **105**, **106** i **110** i 280 nm za jedinjenja **97–99** i **101–103**). Koriste

se rastvori jedinjenja u metanolu u koncentraciji ~ 1 mg/mL. Brzina protoka iznosi 0,5 mL/min.

Jedinjenja **37** i **44** su eluirana sistemom gradijenta: 0–1,5 min 95% A, 1,5–5 min 95% A → 5% A, 5–14 min 5% A, 14–15 min 5% A → 95% A, 15–16 min 95% A.

Jedinjenja **97–99** i **101–103** su eluirana sistemom gradijenta: 0–0,5 min 95% A, 0,5–3 min 95% A → 5% A, 3–13 min 5% A, 13–14 min 5% A → 95% A, 14–16 min 95% A.

Jedinjenje **100** je eluirano sistemom gradijenta: 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, 18–21 min 95% A.

Jedinjenja **105** i **106** su eluirana sistemom gradijenta: 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, 18–20 min 95% A.

Jedinjenje **110** je eluirano sistemom gradijenta: 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.

Jedinjenja **111–115** su eluirana sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–5 min 95% A → 5% A, 5–16 min 5% A, 16–18 min 5% A → 95% A.

**Metoda E.** Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 $\mu$  S.N. USCFU07797 se koristi kao stacionarna faza. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,2% HCOOH u vodi (A) i acetonitril (B). Hromatogram se snima na UV maksimumu ispitivanog jedinjenja da bi se ostvarila maksimalna selektivnost (330 nm za jedinjenje **38 (MVNP001)**, 290 nm za jedinjenje **105** i 280 nm za jedinjenja **116** i **117**). Koriste se rastvori jedinjenja u metanolu u koncentraciji ~1 mg/mL. Brzina protoka iznosi 1 mL/min (0,5 mL/min za jedinjenje **38 (MVNP001)**).

Jedinjenje **38 (MVNP001)** je eluirano sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–3 min 95% A → 5% A, 3–8 min 5% A, 8–10 min 5% A → 95% A, 10–11 min 95% A.

Jedinjenje **105** je eluirano sistemom gradijenta: 0–0,5 min 95% A, 0,5–3 min 95% A → 5% A, 3–13 min 5% A, 13–14 min 5% A → 95% A, 14–15 min 95% A.

Jedinjenja **116** i **117** su eluirana sistemom gradijenta: 0–0,5 min 95% A, 0,5–1,5 min 95% A → 5% A, 1,5–8 min 5% A, 8–9 min 5% A → 95% A, 9–10 min 95% A.

**Metoda F.** Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7 $\mu$  S.N. USCFU07797 se koristi kao stacionarna faza. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,2% HCOOH u vodi (A) i metanol (B). Hromatogram se snima na UV maksimumu ispitivanog jedinjenja da bi se ostvarila maksimalna selektivnost (330 nm za jedinjenje **38 (MVNP001)**, 295 nm za jedinjenje

**119**, 290 nm za jedinjenja **50** i **51** i 280 nm za jedinjenja **116** i **117**). Koriste se rastvori jedinjenja u metanolu u koncentraciji ~ 1 mg/mL. Brzina protoka iznosi 0,5 mL/min.

Jedinjenje **38** (MVNP001) je eluirano sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–3 min 95% A → 5% A, 3–8 min 5% A, 8–10 min 5% A → 95% A, 10–11 min 95% A.

Jedinjenja **50** i **51** su eluirana sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–1,5 min 95% A → 5% A, 1,5–6 min 5% A, 6–7 min 5% A → 95% A, 7–8 min 95% A.

Jedinjenja **116** i **117** eluirana su sistemom gradijenta: 0–0,5 min 95% A, 0,5–1,5 min 95% A → 5% A, 1,5–8 min 5% A, 8–9 min 5% A → 95% A, 9–10 min 95% A.

Jedinjenje **119** je eluirano sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–2 min 95% A → 5% A, 2–10 min 5% A, 10–11 min 5% A → 95% A, 11–12 min 95% A.

**Metoda G.** Zorbax Eclipse Plus C18 2.1 × 100 mm, 1.8μ, S.N. USUXU04444 se koristi kao stacionarna faza. Eluent čine sledeći rastvarači: 0,2% HCOOH u vodi (A) i metanol (B). Hromatogram se snima na UV maksimumu ispitivanog jedinjenja da bi se ostvarila maksimalna selektivnost (290 nm za jedinjenja **50** i **51**, 295 nm za jedinjenja **118** i **119**, 320 nm za jedinjenja **76** i **77** i 330 nm za jedinjenja **53**, **54**, **75** i **78**). Koriste se rastvori jedinjenja u metanolu u koncentraciji ~ 1 mg/mL. Brzina protoka iznosi 0,2 mL/min (0,5 mL/min za jedinjenja **118** i **119**).

Jedinjenje **50** je eluirano sistemom gradijenta: 0–2 min 95% A, 2–4 min 95% A → 5% A, 4–10 min 5% A, 10–11 min 5% A → 95% A, 11–12 min 95% A.

Jedinjenje **51** je eluirano sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–3 min 95% A → 5% A, 3–7 min 5% A, 7–8 min 5% A → 95% A, 8–9 min 95% A.

Jedinjenja **53** i **54** su eluirana sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–2 min 95% A → 5% A, 2–10 min 5% A, 10–11 min 5% A → 95% A, 11–12 min 95% A.

Jedinjenja **75–78** eluirana su sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–2 min 95% A → 5% A, 2–10 min 5% A, 10–11 min 5% A → 95% A, 11–13 min 95% A.

Jedinjenja **118** i **119** su eluirana sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A → 5% A, 1–7 min 5% A, 7–8 min 5% A → 95% A, 8–10 min 95% A.

**Metoda H.** Zorbax Eclipse Plus C18 2.1 × 100 mm, 1.8μ, S.N. USUXU04444 se koristi kao stacionarna faza. Eluent čine sledeći rastvarači: voda (A) i metanol (B). Hromatogram se snima na UV maksimumu ispitivanog jedinjenja da bi se ostvarila maksimalna selektivnost (320 nm za jedinjenje **104**). Koriste se rastvori jedinjenja u metanolu u koncentraciji ~ 1 mg/mL. Brzina protoka iznosi 0,5 mL/min.



Jedinjenje **104** je eluirano sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–5 min 95% A → 5% A, 5–14 min 5% A, 14–15 min 5% A → 95% A, 15–16 min 95% A.

**Metoda I.** Zorbax Eclipse Plus C18 4.6 × 150 mm, 1.8μ S.N. USWKY01594 se koristi kao stacionarna faza. Eluent čine sledeći rastvarači: voda (A) i metanol (B). Hromatogram se snima na UV maksimumu ispitivanog jedinjenja da bi se ostvarila maksimalna selektivnost (290 nm za jedinjenja **107** i **108**, 280 nm za jedinjenje **109** i 270 nm za jedinjenja **121** i **122**). Koriste se rastvori jedinjenja u metanolu u koncentraciji ~ 1 mg/mL. Brzina protoka iznosi 0,5 mL/min.

Jedinjenja **107** i **108** su eluirana sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–6 min 95% A → 5% A, 6–13 min 5% A, 13–14 min 5% A → 95% A, 14–17 min 95% A.

Jedinjenje **109** eluirano je sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–5 min 95% A → 5% A, 5–16 min 5% A, 16–17 min 5% A → 95% A, 17–18 min 95% A.

Jedinjenja **121** i **122** eluirana su sistemom gradijenta: 0–1 min 95% A, 1–5 min 95% A → 5% A, 5–14 min 5% A, 14–15 min 5% A → 95% A, 15–16 min 95% A.

### **Opšti eksperimentalni postupci za sintezu**

#### **Postupak A - Reakcija Suzuki-jevog kuplovanja u prisustvu katalizatora PdO × 1,4 H<sub>2</sub>O<sup>162</sup>**

U smešu odgovarajuće arilboronske kiseline (1,2 ekv), katalizatora PdO × 1,4 H<sub>2</sub>O (0,01 ekv), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,2 ekv) i smeše rastvarača CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH/H<sub>2</sub>O (3 : 1, v/v), doda se arilbromid (1 ekv). Posle 5 sati mešanja na 60 °C, u reakcionu smešu doda se voda i dihlormetan. Slojevi se razdvoje. Organski slojevi se ispere zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod se prečisti flash hromatografijom na stubu.

#### **Postupak B – Opšta metoda za reduktivno aminovanje**

U rastvor aldehida (1 ekv) i odgovarajućeg amina (1,2–1,5 ekv) u smeši MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 : 1, v/v), doda se glacijalna AcOH (1,2–1,5 ekv). Smeša se meša na sobnoj temperaturi. Posle tri sata, doda se NaBH<sub>4</sub> (6 ekv) i mešanje nastavi još 18 sati. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom, a suvi ostatak se rastvori u dihlormetanu i 2 M NH<sub>3</sub> i prenese u levak za odvajanje. Slojevi se razdvoje. Proizvod se ekstrahuje iz vodenog sloja

dihlormetanom. Spojeni organski slojevi isperu se zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

### **Postupak C - Sinteza aminohinolina nukleofilnom aromatičnom supstitucijom**

Smeša 4-hlorhinolina ili 4,7-dihlorhinolina (1 ekv) i odgovarajućeg amina (1,2–7 ekv) zagreva se u mikrotalasnom reaktoru u sledećim intervalima: 15 minuta na 80 °C, 30 minuta na 95 °C i dva sata na 140 °C. Reakciona smeša se rastvori u dihlormetanu i 1M vodenom rastvoru NaOH. Slojevi se razdvoje. Organski sloj se suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

### **Postupak D - *N*-metilovanje aminohinolina<sup>206</sup>**

U smešu aminohinolina (1 ekv), 37% vodenog rastvora formaldehida (2 ekv) i MeOH, koja se meša na sobnoj temperaturi, doda se smeša ZnCl<sub>2</sub> (2 ekv), NaHB<sub>3</sub>CN (4 ekv) i MeOH. Posle 4 sata, rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom i ostatak se rastvori u dihlormetanu i vodi. Dodavanjem 1 M NaOH podesi se kiselost sredine na pH = 12. Slojevi se razdvoje. Proizvod se ekstrahuje iz vodenog sloja dihlormetanom. Spojeni organski slojevi isperu se vodom i zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

### **Postupak E - Reakcija Suzuki-jevog kuplovanja u prisustvu Pd(OAc)<sub>2</sub>**

Rastvor Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,05 ekv) i PPh<sub>3</sub> (0,2 ekv) u toluenu meša se na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Posle 10 minuta doda se odgovarajući aril-bromid (1 ekv), arilboronska kiselina (1,1 ekv), 2M vodeni rastvor Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 ekv), MeOH i toluen. Smeša se meša tri sata na 110 °C.

### **Postupak F – Reakcija Buchwald-Hartwig-ovog aminovanja aril-halogenida u prisustvu Pd(OAc)<sub>2</sub><sup>207</sup>**

Suspencija Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,04 ekv) i SPhos (0,08 ekv) u deaerisanom dioksanu meša se na sobnoj temperaturi u atmosferi argona. Posle tri minuta, doda se rastvor jedinjenja **49** (1 ekv) u dioksanu, odgovarajući amin (1,5 ekv) i K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2,5 ekv). Smeša se zagreva na 85

°C u zatvorenoj kiveri. Posle 24 sata zagrevanja, smeša se procedi i sirovi proizvod prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent EtOAc/MeOH i flash, Biotage SP, NH kolona, eluent EtOAc/MeOH).

#### **Postupak G – Oksidacija alkohola do aldehida<sup>208</sup>**

U rastvor alkohola (1 ekv) u dihlormetanu doda se piridiniumhlor-hromat (PCC; 2,2–2,5 ekv). Posle dva sata mešanja na sobnoj temperaturi, smeša se izlije na stub SiO<sub>2</sub> i eluira heksanom i etil-acetatom.

#### **Postupak H - Uklanjanje zaštitne Boc-grupe**

Rastvor *t*-butilkarbamata i trifluorsirćetne kiseline (TFA) u dihlormetanu meša se tri sata na sobnoj temperaturi. Rastvarač se ukloni uz dodatak toluena. Uljasti ostatak se rastvori u dihlormetanu i par kapi MeOH. Doda se vodeni rastvor NaOH do pH = 10. Slojevi se razdvoje. Proizvod se izoluje ekstrakcijom iz vodenog sloja dihlormetanom. Organski sloj se suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja, rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom.

#### **Postupak I – Buchwald-Hartwig-ovo aminovanje aril-halogenida u prisustvu Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>**

Rastvor Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,05 ekv) i SPhos-a (0,1 ekv) u suvom toluenu meša se u atmosferi argona. Posle tri minuta mešanja, rastvor formiranog katalizatora se doda u smešu odgovarajućeg amina (1,5–2 ekv), jedinjenja **84** (1 ekv), NaO<sup>t</sup>Bu (2,8 ekv) i toluena. Reakciona kivera se ispuni argonom, zatvori i zagreva 19 h na 100 °C. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

#### **Postupak J – Sinteza 4-(alkiltio)anilina<sup>180</sup>**

U smešu koja sadrži 1-hlor-4-nitrobenzen (1 ekv), KOH (3 ekv) i PEG kao rastvarač, doda se odgovarajući alkiltiol (1,5 ekv). Posle 3,5 sata mešanja na 100 °C, smeša se izlije u vodu. Proizvod se izoluje iz vodenog sloja ekstrakcijom etil-acetatom. Spojeni organski slojevi se suše anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja, rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent heksan/ EtOAc).

### **Postupak K – Reakcija formiranja jezgra 2-aminobenzotiazola**

U smešu 4-(alkiltio)anilina (1 ekv),  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (4 ekv), glac. AcOH i vode, koja se meša na  $10\text{ }^\circ\text{C}$ , doda se rastvor broma u glac. AcOH (1,25 ekv). Posle 18 sati mešanja na sobnoj temperaturi, smeša se zagreva tri sata na  $80\text{ }^\circ\text{C}$ . Posle hlađenja reakcione smeše do sobne temperature, sadržaj smeše se izlije u vodu i dodatkom  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  podesi kiselost sredine na  $\text{pH} = 5\text{--}6$ . Proizvod se ekstrahuje iz vodenog sloja etil-acetatom. Organski slojevi se isperu zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Posle ceđenja, rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$ , eluent  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  ili heksan/EtOAc za jedinjenje **95** i flash, Biotage SP, RP kolona, eluent  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ ).

### **Postupak L – Sinteza karbamata**

U rastvor 6-(alkilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-amina (1 ekv) u benzenu, doda se odgovarajući alkil-hlorformat (1,1 ekv) i trietilamin (1,8 ekv). Posle tri sata mešanja na  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , reakciona smeša se izlije u vodu. Ekstrahuje se etil-acetatom. Organski sloj se suši anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$  i flash, Biotage SP,  $\text{SiO}_2$  kolona, eluent heksan/ EtOAc).

### **Postupak M – Sinteza amida**

Alkanoil-hloridi, koji su upotrebljeni u reakcijama sinteze amidnih derivata 2-aminobenzotiazola, sintetisani su prema postupku opisanom u literaturi iz odgovarajućih komercijalno dostupnih kiselina i tionil-hlorida.<sup>209</sup> Rastvor alkanoil-hlorida (1,3 ekv) u benzenu, ukapa se u rastvor odgovarajućeg 2-aminobenzotiazola (1 ekv) u smeši rastvarača  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{benzen}$  (1 : 1, v/v) na  $0\text{ }^\circ\text{C}$ . Smeša se meša na istoj temperaturi do potpunog prevođenja polaznog materijala u proizvod (tok reakcije prati se tankoslojnom hromatografijom). Reakcija se zaustavlja dodavanjem hladne vode. Razdvoje se slojevi, vodeni sloj se ekstrahuje dihlormetanom i spojeni organski slojevi se suše anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti višestrukom hromatografijom na stubu.

### Postupak N – Oksidacija *m*-hlorperbenzoevom kiselinom (mCPBA)<sup>182</sup>

U rastvor jedinjenja **97** (1 ekv) u dihlorometanu doda se mCPBA. Posle mešanja na sobnoj temperaturi, doda se 10% vodeni rastvor Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Razdvoje se slojevi. Organski sloj se ispere zasićenim vodenim rastvorom NaHCO<sub>3</sub> i suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

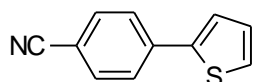
### Postupak O – Oksidacija vodonik-peroksidom<sup>183</sup>

Rastvoru jedinjenja **100** (1 ekv) u metanolu doda se acetonitril (1,5 ekv) i K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,7 ekv). Smeša se ohladi na 0 °C. U smešu, koja se intenzivno meša, ukapava se rastvor vodonik-peroksida u metanolu u toku 30 minuta. Smeša se meša na odgovarajućoj temperaturi. Reakciona smeša se izlije u zasićeni vodeni rastvor NaCl i doda se dihlorometan. Slojevi se razdvoje i organski sloj se suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, proizvod se prečisti hromatografijom na stubu.

### Postupak P – Reakcija karbamoilovanja benzotiazolona

U rastvor jedinjenja **120** (1 ekv) u suvom THF, koji se meša u atmosferi argona na –78 °C, doda se *n*-BuLi (1 ekv). Smeša se meša 15 minuta na istoj temperaturi. Nakon postepenog dostizanja sobne temperature, smeša se ponovo ohladi na –78 °C i doda se rastvor trifozgena (1 ekv) u suvom THF. Posle 45 minuta mešanja, doda se odgovarajući amin (2,5 ekv) na –78 °C i meša pet sati na sobnoj temperaturi. U reakcionu smešu se doda voda i etil-acetat. Slojevi se razdvoje. Proizvod se ekstrahuje iz vodenog sloja etil-acetatom. Spojeni organski slojevi suše se anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-glash, SiO<sub>2</sub>, eluent heksan/EtOAc).

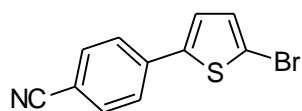
### 4-(tiofen-2-il)benzonitril (**33**)



Jedinjenje **33** sintetiše se po opštem postupku A korišćenjem komercijalno dostupnog 2-bromtiofena (412 µL, 4,17 mmol), 4-cijanofenilboronske kiseline (734 mg, 5,00 mmol), PdO × 1,4 H<sub>2</sub>O (6,2 mg, 0,042 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (691 mg, 5,00 mmol) i smeše rastvarača etanol/voda (14 mL, 3 : 1, v/v). Posle obrade, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>,

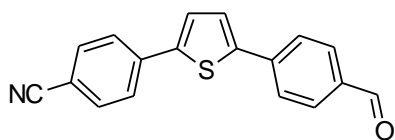
heksan/toluen). Prinos: 635 mg, 82%. Čvrsta bela supstanca, t. t. 78–80 °C.<sup>210</sup> IR (film): 3094sl, 2925sl, 2225sl, 1912sl, 1666sl, 1603sl, 1491sl, 1421sr, 1352sr, 1311sl, 1264sl, 1211sl, 1110sl, 1052sl, 959sl, 849sr, 823j, 770sl, 713j cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 7,71–7,64 (m, 4H), 7,43–7,40 (m, 2H), 7,13 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 5,0; *J*<sub>2</sub> = 3,7). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 142,10; 138,69; 132,76; 128,54; 127,08; 126,12; 125,12; 118,84; 110,60. GC/MS (m/z (%)): 185,0 ([M<sup>+</sup>], 100); 140,0 (16).

#### 4-(5-bromtiofen-2-il)benzonitril (**34**)<sup>163</sup>



U rastvor jedinjenja **33** (303 mg, 1,64 mmol) u 1,2-dihloretanu (5 mL), koji se meša na 0 °C, ukapa se rastvor broma (92 μL, 1,8 mmol) u 1,2-dihloretanu (5 mL). Po dostizanju sobne temperature, reakciona smeša se meša još dva sata. Tok reakcije prati se tankoslojnom hromatografijom (RP, MeOH). U reakcionu smešu se doda vodeni rastvor Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> do obezbojavanja reakcione smeše i 1,2-dihloretan (5 mL). Slojevi se razdvoje, a proizvod se ekstrahuje iz vodenog sloja 1,2-dihloretanom. Spojeni organski slojevi se isperu zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja, rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod prečisti se hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, RP kolona, eluent MeOH/H<sub>2</sub>O). Prinos: 393 mg, 91%. Praškasta bela supstanca, t. t. 96 °C.<sup>211</sup> (Ref: 98–99 °C) IR (film): 3092sl, 2919sl, 2850sl, 2229sl, 1912sl, 1774sl, 1654sl, 1602sl, 1558sl, 1536sl, 1495sl, 1426sr, 1329sl, 1309sl, 1247sl, 1209sl, 1179sl, 1110sl, 1067sl, 977sl, 942sl, 834sr, 804j, 737sl, 661sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 7,67–7,58 (m, 4H), 7,16 (d, 1H, *J* = 3,8), 7,08 (d, 1H, *J* = 4,0). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 143,41; 137,76; 132,88; 131,39; 125,78; 125,31; 118,64; 114,16; 111,05. GC/MS (m/z (%)): 264,8 ([M<sup>+</sup>], 100); 140,1 (68).

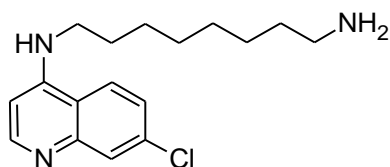
#### 4-[5-(4-formilfenil)tiofen-2-il]benzonitril (**35**)



Jedinjenje **35** sintetiše se po opštem postupku A korišćenjem jedinjenja **34** (886 mg, 3,35 mmol), 4-formilfenilboronske kiseline (603 mg, 4,02 mmol), katalizatora PdO × 1,4 H<sub>2</sub>O (24,7 mg, 0,0419 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (556 mg, 4,02 mmol) i smeše rastvarača etanol/voda (40 mL, 3 : 1, v/v). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, toluen/etil-acetat). Prinos: 1,07 g, 92%. Praškasta žuta supstanca, t.t. 212–214 °C. IR (film): 2916sl, 2849sl, 2754sl, 2222sr, 1698j, 1598j, 1535sl, 1492sl,

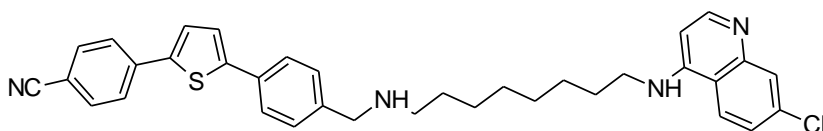
1449sl, 1396sl, 1342sl, 1306sl, 1277sl, 1214sr, 1167sr, 1110sl, 833j, 792j, 696sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 10,01 (s, 1H), 7,98–7,89 (m, 8H), 7,84 (ps, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 192,31; 143,19; 142,35; 138,51; 137,47; 135,30; 133,16; 130,47; 127,90; 127,65; 125,89; 125,78; 118,74; 110,04. HRMS: *m/z* 290,06339 odgovara molekulknoj formuli C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>NOSH<sup>+</sup> (greška u ppm –0,08).

#### ***N*-(7-hlorhinolin-4-il)oktan-1,8-diamin (AQ8)**



Jedinjenje **AQ8** sintetiše se po postupku C korišćenjem 4,7-dihlorhinolina (500 mg, 2 mmol) i 1,8-diaminoktana (1,8 g, 13 mmol). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH(NH<sub>3</sub>)). Prinos: 535,6 mg, 69%. Čvrsta supstanca svetložute boje, t. t. 97–98 °C. IR (ATR): 3325sr, 3262sr, 2928sr, 2851sr, 1612sr, 1577sr, 1537sr, 1480sl, 1449sl, 1431sl, 1369sr, 1330sl, 1281sl, 1251sl, 1198sl, 1134sl, 1080sl, 1027sl, 960sl, 922sl, 903sl, 876sl, 852sl, 809sl, 771sl, 729sl, 649sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O, δ): 8,51 (d, 1H, *J* = 5,4), 7,95 (d, 1H, *J* = 2,1), 7,66 (d, 1H, *J* = 8,9), 7,34 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,9, *J*<sub>2</sub> = 2,1), 6,40 (d, 1H, *J* = 5,4), 3,29 (t, 2H, *J* = 7,2), 2,66 (t, 2H, *J* = 7,0), 1,78–1,72 (m, 2H), 1,48–1,32 (m, 10H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 152,02; 149,68; 149,12; 134,74; 128,79; 125,16; 120,83; 117,09; 99,02; 43,22; 42,16; 33,70; 29,34; 29,28; 28,84; 27,05; 26,76. HRMS: *m/z* 306,17168 odgovara molekulknoj formuli C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>ClH<sup>+</sup> (greška u ppm –4,82).

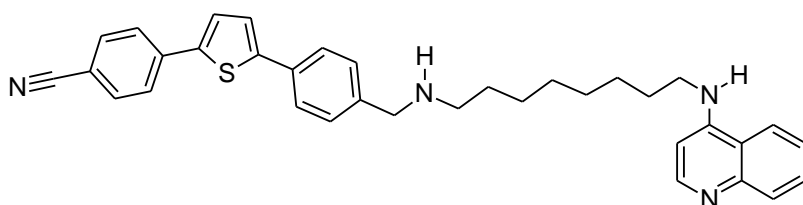
#### **4-(5-{4-[(8-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]oktil)amino]metil}fenil}-2-tienil)benzonitril (36)**



Jedinjenje **36** sintetiše se po postupku B korišćenjem aldehida **35** (242 mg, 0,835 mmol), **AQ8** (383,4 mg, 1,253 mmol), smeše rastvarača MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (23,5 mL, 2 : 1, v/v), glac. AcOH (75 μL, 1,2 mmol) i NaBH<sub>4</sub> (189,5 mg, 5,009 mmol). Posle obrade, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, EtOAc/MeOH i flash, Biotage SP, NH kolona, eluent heksan/EtOAc i EtOAc/MeOH). Prinos 173,8 mg, 36%. Čvrsta supstanca svetložute boje, t. t. 123–125 °C. IR (film): 3641sl, 3612sl, 3298sr, 3072sr, 2930j, 2855sr, 2222sr, 2173sl, 1602sr,

1581j, 1543sr, 1495sr, 1471sr, 1450sr, 1373sr, 1332sr, 1280sl, 1207sl, 1177sl, 1137sl, 1076sl, 1022sl, 907sl, 877sl, 840sr, 798sr, 770sl, 733sl, 648sl, 538sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ): 8,51 (d, 1H,  $J = 5,4$ ), 7,95 (d, 1H,  $J = 2,0$ ), 7,69–7,57 (m, 7H), 7,38–7,29 (m, 5H), 6,39 (d, 1H,  $J = 5,3$ ), 3,80 (s, 2H), 3,28 (t, 2H,  $J = 7,1$ ), 2,63 (t, 2H,  $J = 7,2$ ), 1,77–1,71 (m, 2H), 1,54–1,42 (m, 4H), 1,42–1,29 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 152,01; 149,67; 149,08; 145,93; 140,69; 138,50; 134,78; 132,70; 132,33; 128,80; 128,74; 126,05; 125,74; 125,61; 125,20; 124,14; 120,76; 118,84; 117,07; 110,32; 99,03; 53,64; 49,38; 43,23; 30,02; 29,38; 29,24; 28,84; 27,21; 27,04. HRMS:  $m/z$  579,23307 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{SClH}^+$  (greška u ppm –2,25). HPLC čistoća ( $\lambda = 330$  nm): metoda A: RT 11,456, površina 96,24%, metoda B: RT 6,658, površina 99,44%.

#### 4-{5-[4-({[8-(hinolin-4-ilamino)oktil]amino)metil]fenil]-2-tienil}benzonitril (37)

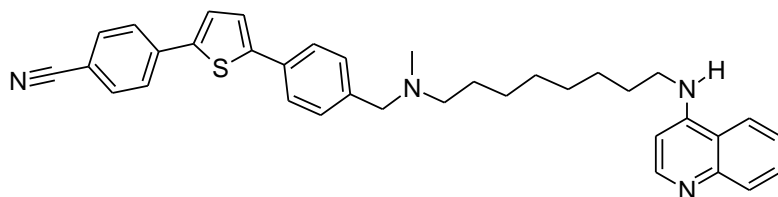


Jedinjenje **37**  
 sintetiše se po  
 postupku B  
 korišćenjem aldehida

**35** (96,0 mg, 0,332 mmol), **DCAQ8** (135 mg, 0,497 mmol), smeše rastvarača  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7,5 mL, 2 : 1, v/v), glac. AcOH (31  $\mu\text{L}$ , 0,50 mmol) i  $\text{NaBH}_4$  (75,3 mg, 1,99 mmol). Posle obrade, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$ , EtOAc/MeOH i flash, Biotage SP, NH kolona, eluent heksan/EtOAc i EtOAc/MeOH). Prinos: 62,7 mg, 35%. Čvrsta supstanca žute boje, t. t. 110–112  $^\circ\text{C}$ . IR (film): 3255sr, 3072sr, 2928j, 2854sr, 2226sr, 1582j, 1541sr, 1496sl, 1454sr, 1396sl, 1375sl, 1343sr, 1280sl, 1179sl, 1128sl, 838sl, 803sr, 766sl, 737sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ): 8,54 (d, 1H,  $J = 5,4$ ), 7,98 (d, 1H,  $J = 8,3$ ), 7,72–7,58 (m, 8H), 7,43–7,35 (m, 4H), 7,30 (d, 1H,  $J = 3,8$ ), 6,4 (d, 1H,  $J = 5,3$ ), 3,80 (s, 2H), 3,30 (t, 2H,  $J = 7,1$ ), 2,63 (t, 2H,  $J = 7,2$ ), 1,78–1,72 (m, 2H), 1,54–1,35 (m, 10H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 151,01; 149,64; 148,35; 145,96; 140,73; 140,70; 138,52; 132,72; 132,34; 129,94; 128,94; 128,75; 126,06; 125,76; 125,63; 124,54; 124,16; 119,09; 118,84; 118,64; 110,35; 98,74; 53,66; 49,42; 43,22; 30,05; 29,41; 29,27; 28,91; 27,22; 27,07. HRMS:  $m/z$  545,27237 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{SH}^+$  (greška u ppm –1,78). HPLC čistoća ( $\lambda = 330$  nm): metoda C: RT 10,092, površina 97,46%, metoda D: RT 10,772, površina 97,75%.



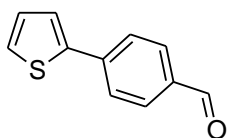
**4-{5-[4-({metil[8-(hinolin-4-ilamino)oktil]amino}metil)fenil]-2-tienil}benzonitril (38 (MVNP001))**



Jedinjenje **38**  
(MVNP001) sintetiše se po postupku D korišćenjem rastvora

derivata **37** (47,9 mg, 0,0879 mmol) u MeOH (2 mL), 37% vodenog rastvora formaldehida (13,2  $\mu$ L, 0,176 mmol) i smeše ZnCl<sub>2</sub> (24,0 mg, 0,176 mmol), NaBH<sub>3</sub>CN (22,1 mg, 0,352 mmol) i MeOH (2 mL). Posle obrade, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, NH kolona, eluent heksan/EtOAc i EtOAc/MeOH). Prinos: 23,4 mg, 45%. Čvrsta supstanca žute boje, t. t. 99–100 °C. IR (film): 3285sr, 3056sr, 2926j, 2853j, 2225sr, 1602j, 1582j, 1541j, 1497sr, 1456j, 1372sr, 1343sr, 1273sr, 1176sr, 1124sr, 1068sr, 1016sl, 838sr, 802sr, 765sr, 736sr cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O,  $\delta$ ): 8,53 (d, 1H, *J* = 5,2), 7,98 (d, 1H, *J* = 8,4), 7,71–7,57 (m, 8H), 7,43–7,40 (m, 4H), 7,30 (d, 1H, *J* = 3,9), 6,41 (d, 1H, *J* = 5,4), 3,50 (s, 2H), 3,29 (t, 2H, *J* = 7,2), 2,39–2,36 (m, 2H), 2,21 (s, 3H), 1,78–1,72 (m, 2H), 1,54–1,33 (m, 10H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 151,00; 149,69; 148,35; 146,08; 140,68; 139,67; 138,56; 132,75; 132,35; 129,96; 129,68; 129,00; 126,09; 125,65; 125,60; 124,58; 124,14; 119,11; 118,89; 118,66; 110,37; 98,78; 62,02; 57,45; 43,29; 42,36; 29,44; 29,34; 28,97; 27,38; 27,30; 27,14; HRMS: *m/z* 559,28899 odgovara molekulskoj formuli C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>SH<sup>+</sup> (greška u ppm –2,13). HPLC čistoća ( $\lambda$  = 330 nm): metoda F: RT 5,420, površina 95,23%, metoda E: RT 4,826, površina 96,54%.

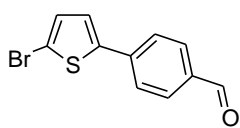
**4-(2-tienil)benzaldehyd (39)**



Jedinjenje **39** sintetiše se po postupku E korišćenjem Pd(OAc)<sub>2</sub> (68,8 mg, 0,306 mmol) i PPh<sub>3</sub> (321,6 mg, 1,226 mmol) u toluenu (35 mL), 2-bromtiofena (594  $\mu$ L, 6,13 mmol), 4-formilfenilboronske kiseline (1,01 g, 6,74 mmol) i 2M vodenog rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6 mL) u MeOH (6 mL). Posle hlađenja reakcione smeše do sobne temperature, doda se dihlormetan (20 mL). Slojevi se razdvoje. Organski sloj se ispere zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja, rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, SiO<sub>2</sub>, eluent heksan/EtOAc). Prinos: 1,0 g,

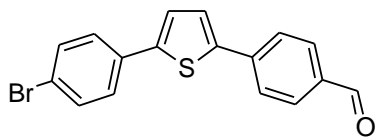
87%. Čvrsta supstanca svetložute boje, t. t. 60–61 °C.<sup>212</sup> IR (ATR): 3107sl, 2926sl, 2851sl, 2738sl, 2005sl, 1703j, 1604sr, 1565sl, 1426sl, 1216sl, 1174sl, 822sr, 708sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 10,00 (s, 1H), 7,90–7,76 (m, 4H), 7,47–7,40 (m, 2H), 7,15–7,13 (m, H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 191,47; 142,74; 140,12; 135,10; 130,47; 128,47; 126,92; 126,05; 125,03. GC/MS (m/z (%)): 188,0 ([M<sup>+</sup>], 100); 115,1 (40).

#### 4-(5-brom-2-tienil)benzaldehyd (40)



U rastvor jedinjenja **39** (226,4 mg, 1,203 mmol) u suvom THF (11 mL), koji se meša na sobnoj temperaturi, u mraku, doda se *N*-bromsukcinimid (228,9 mg, 1,286 mmol). Tok reakcije prati se tankoslojnom hromatografijom (RP, MeOH). Posle četiri sata mešanja, doda se vodeni rastvor Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> i dihlormetan. Slojevi se razdvoje. Proizvod se ekstrahuje iz vodenog sloja dihlormetanom. Spojeni organski slojevi se isperu zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja, rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, RP kolona, eluent MeOH/H<sub>2</sub>O). Prinos: 256,1 mg, 80%. Čvrsta supstanca narandžaste boje, t. t. 117–118 °C. IR (ATR): 3477j, 2922sr, 2851sr, 2759sl, 1692j, 1666sr, 1604sr, 1566sl, 1425sr, 1397sl, 1220sl, 1204sl, 1175sr, 1110sl, 832sl, 796sr, 686sl, 652sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 10,00 (s, 1H), 7,88; 7,66 (ABq, 4H, *J*<sub>AB</sub> = 8,3), 7,20; 7,09 (ABq, 2H, *J*<sub>AB</sub> = 3,9). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 191,29; 144,08; 139,14; 135,36; 131,32; 130,53; 125,70; 125,18; 113,92. GC/MS (m/z (%)): 267,9 ([M<sup>+</sup>], 100); 158,0 (66).

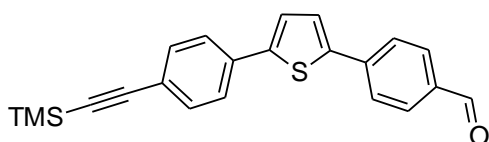
#### 4-[5-(4-bromfenil)-2-tienil]benzaldehyd (41)



Jedinjenje **41** sintetiše se po postupku E korišćenjem Pd(OAc)<sub>2</sub> (14,6 mg, 0,0650 mmol) i PPh<sub>3</sub> (68,7 mg, 0,262 mmol) u toluenu (15 mL), **40** (350 mg, 1,3 mmol), 4-bromfenilboronske kiseline (289,2 mg, 1,440 mmol) i 2M vodenog rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,3 mL) u MeOH (6 mL) i toluenu (15 mL). Posle hlađenja do sobne temperature, reakciona smeša se razblaži dodatkom CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, procedi se kroz tanak sloj celita i suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja, rastvarač se ukloni uparavanjem. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, SiO<sub>2</sub> kolona, eluent heksan/EtOAc). Prinos:

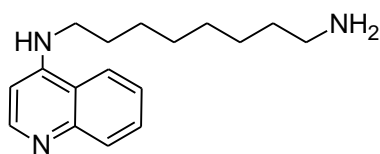
249,6 mg, 56%. Čvrsta supstanca svetložute boje. IR (ATR): 3435j, 2922sl, 2852sl, 2728sl, 1698j, 1662sl, 1560j, 1564sl, 1541sl, 1508sl, 1438sl, 1450sl, 1418sl, 1394sl, 1338sl, 1307sl, 1277sl, 1213sr, 1169sr, 1112sl, 1068sl, 1007sl, 939sl, 831sr, 803j, 695sl, 671sl, 633sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 10,01 (s, 1H), 7,90; 7,76 (ABq, 4H,  $J_{AB} = 8,4$ ), 7,53; 7,50 (ABq, 4H,  $J_{AB} = 8,8$ ), 7,02; 6,83 (ABq, 2H,  $J_{AB} = 4,0$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 191,32; 144,42; 142,15; 139,72; 135,16; 132,76; 132,11; 130,48; 127,16; 126,08; 125,70; 124,73; 121,90. GC/MS (m/z (%)): 343,9 ( $[\text{M}^+$ ], 100); 234,0 (54).

#### 4-(5-{4-[(trimetilsilil)etnil]fenil}-2-tienil)benzaldehyd (42)



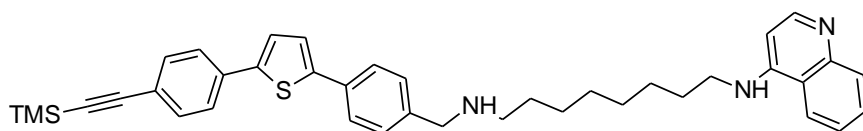
U kivetu spaljenu pod vakuumom, u atmosferi argona, sipa se redom: rastvor **41** (71 mg, 0,21 mmol) u DMF (1 mL),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (8,7 mg, 0,012 mmol),  $\text{PPh}_3$  (10,8 mg, 0,0412 mmol), etiniltrimetilsilan (32  $\mu\text{L}$ , 0,027 mmol),  $\text{CuI}$  (2,3 mg, 0,012 mmol) i  $\text{Et}_2\text{NH}$  (323  $\mu\text{L}$ , 3,12 mmol). Smeša se zagreva na 120  $^\circ\text{C}$  35 minuta u mikrotalasnom reaktoru. Posle hlađenja do sobne temperature, reakciona smeša se razblaži dodatkom dietil-etra i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , i procedi kroz tanak sloj celita. Filtrat se ispere 0,1 M  $\text{HCl}$  i ekstrahuje dihlormetanom. Organski sloj se ispere zasićenim vodenim rastvorom  $\text{NaHCO}_3$  i vodom. Nakon ispiranja, organski sloj se suši anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Posle ceđenja, rastvarač se ukloni uparavanjem pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP,  $\text{SiO}_2$  kolona, eluent heksan/ $\text{EtOAc}$ ). Prinos: 30,4 mg, 41%. Čvrsta supstanca svetložute boje. IR (ATR): 3392sl, 2962sl, 2835sl, 2742sl, 2156sl, 1702sr, 1598sr, 1566sl, 1491sl, 1449sl, 1415sl, 1341sl, 1308sl, 1250sr, 1216sl, 1169sl, 1112sl, 838sr, 799sr, 762sl, 699sl, 643sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 10,00 (s, 1H), 7,89; 7,76 (ABq, 4H,  $J_{AB} = 8,2$ ), 7,57; 7,49 (ABq, 4H,  $J_{AB} = 8,4$ ), 7,44; 7,34 (ABq, 2H,  $J_{AB} = 3,8$ ), 0,27 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 191,40; 145,03; 142,33; 139,84; 135,21; 133,77; 132,63; 130,56; 126,18; 125,75; 125,38; 124,94; 122,69; 104,74; 95,79. GC/MS (m/z (%)): 360,1 ( $[\text{M}^+$ ], 91); 345,1 (100).

### *N*<sup>1</sup>-(hinolin-4-il)oktan-1,8-diamin (**DCAQ8**)



Jedinjenje **DCAQ8** sintetiše se po postupku C korišćenjem 4-hlorhinolina (650 mg, 4,0 mmol) i 1,8-diaminooktana (2,86 g, 19,8 mmol). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH(NH<sub>3</sub>)). Prinos: 701,9 mg, 65%. Uljasta supstanca smeđe boje. IR (ATR): 3290sr, 2928j, 2854sr, 1653sl, 1583j, 1544sr, 1462sr, 1440sr, 1396sl, 1375sl, 1342sr, 1256sl, 1127sl, 882sl, 809sl, 767sr cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 8,55 (d, 1H, *J* = 5,3), 7,99–7,97 (m, 1H), 7,74–7,72 (m, 1H), 7,64–7,60 (m, 1H), 7,43–7,40 (m, 1H), 6,42 (d, 1H, *J* = 5,4), 5,04 (ps, H-N), 3,33 – 3,29 (m, 2H), 2,68 (t, 2H, *J* = 7,0), 1,79–1,73 (m, 2H), 1,50–1,30 (m, 12H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 151,03; 149,64; 148,40; 129,93; 128,89; 124,48; 119,14; 118,66; 98,72; 43,19; 42,16; 33,71; 29,30; 28,89; 27,06; 26,76. HRMS *m/z* 272,21141 odgovara molekulskoj formuli C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>H<sup>+</sup> (greška u ppm –2,62).

### *N*-hinolin-4-il-*N'*-[4-(5-{4-[(trimetilsilil)etnil]fenil}-2-tienil)benzil]oktan-1,8-diamin (**43**)

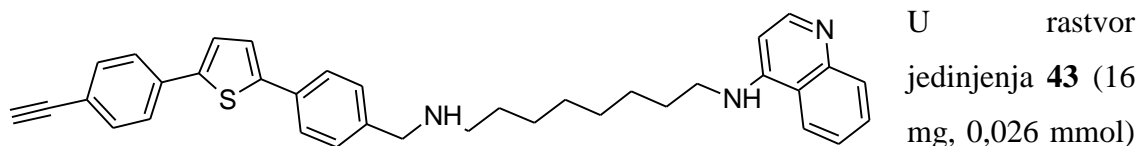


Jedinjenje **43** sintetiše se po postupku B

korišćenjem aldehida **42** (44,6 mg, 0,124 mmol), **DCAQ8** (40,2 mg, 0,148 mmol), smeše rastvarača MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5,4 mL, 2 : 1, v/v), glac. AcOH (12 μL, 0,21 mmol) i NaBH<sub>4</sub> (28 mg, 0,74 mmol). Posle obrade reakcije, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, EtOAc/MeOH i flash, Biotage SP, NH kolona, eluent heksan/EtOAc i EtOAc/MeOH). Prinos: 19 mg, 25%. Čvrsta supstanca svetložute boje. IR (ATR): 3244sr, 3073sr, 3025sr, 2924j, 2852sr, 2156sr, 1582j, 1544sr, 1496sr, 1454sr, 1398sr, 1376sr, 1280sr, 1248sr, 1130sl, 1109sl, 1017sl, 943sl, 863sr, 841sr, 802sr, 760sr, 664sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O, δ): 8,53 (d, 1H, *J* = 5,3), 7,98 (d, 1H, *J* = 8,5), 7,71 (d, 1H, *J* = 8,4), 7,64–7,60 (m, 1H), 7,58–7,54 (m, 4H), 7,47–7,46 (m, 2H), 7,43–7,40 (m, 1H), 7,34–7,33 (m, 2H), 7,29–7,26 (m, 2H, preklapa se sa signalom rastvarača), 6,41 (d, 1H, *J* = 5,3), 3,79 (s, 2H), 3,30 (t, 2H, *J* = 7,2), 2,63 (t, 2H, *J* = 7,2), 1,78–1,72 (m, 2H), 1,54–1,43 (m, 4H), 1,39–1,35 (m, 6H), 0,26 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 151,03; 149,70; 148,37; 144,19; 142,51; 140,20; 134,28; 132,84;

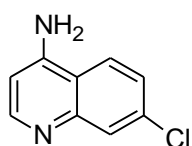
132,52; 129,96; 128,99; 128,73; 125,67; 125,14; 124,59; 124,57; 123,96; 121,99; 119,14; 118,68; 104,93; 98,79; 95,31; 53,72; 49,42; 43,27; 30,09; 29,46; 29,33; 28,97; 27,28; 27,12. HRMS:  $m/z$  616,31641 odgovara molekulknoj formuli  $C_{39}H_{45}N_3SSiH^+$  (greška u ppm  $-1,96$ ).

#### ***N*-{4-[5-(4-etinilfenil)-2-tienil]benzil}-*N'*-hinolin-4-iloktan-1,8-diamin (44)**



u suvom MeOH (0,5 mL), doda se anhidrovani  $K_2CO_3$ . Posle 24 sata mešanja na sobnoj temperaturi, proizvod se ekstrahuje etil-acetatom. Organski slojevi se isperu zasićenim vodenim rastvorom  $NaHCO_3$  i suše anhidrovanim  $NaSO_4$ . Posle ceđenja, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, NH kolona, eluent  $CH_2Cl_2/MeOH$ ). Prinos: 14 mg, 99%. Čvrsta supstanca svetložute boje, t. t. 110–112 °C. IR (film): 3302j, 2928sr, 2854sr, 1583j, 1541sr, 1496sr, 1456sr, 1397sl, 1375sl, 1342sr, 1281sl, 1127sl, 940sl, 837sr, 801j, 765sr, 737sr, 647sr  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 8,54 (d, 1H,  $J = 5,3$ ), 7,98 (dd, 1H,  $J_1 = 8,4$ ,  $J_2 = 0,9$ ), 7,72–7,71 (m, 1H), 7,64–7,60 (m, 1H), 7,59–7,56 (m, 4H), 7,50–7,49 (m, 2H), 7,43–7,40 (m, 1H), 7,34 (d, 2H,  $J = 8,3$ ), 7,31; 7,25 (ABq, 2H,  $J_{AB} = 3,8$ ), 6,41 (d, 1H,  $J = 5,4$ ), 5,00 (ps, H-N, izmenljiv sa  $D_2O$ ), 3,80 (s, 2H), 3,32–3,28 (m, 2H), 3,14 (s, 1H), 2,65–2,62 (m, 2H), 1,92 (ps, H-N, izmenljiv sa  $D_2O$ ), 1,78–1,72 (m, 2H), 1,56–1,43 (m, 4H), 1,40–1,34 (m, 6H).  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 150,93; 149,75; 148,26; 144,31; 142,34; 140,18; 134,64; 132,80; 132,68; 129,86; 129,02; 128,74; 125,68; 125,26; 124,68; 124,60; 123,97; 120,93; 119,16; 118,66; 98,77; 83,51; 78,09; 53,69; 49,39; 43,27; 30,05; 29,44; 29,31; 28,95; 27,26; 27,11. HRMS:  $m/z$  544,27759 odgovara molekulknoj formuli  $C_{36}H_{37}N_3SH^+$  (greška u ppm  $-0,94$ ). HPLC čistoća ( $\lambda = 330$  nm): metoda C: RT 10,262, površina 95,36%, metoda D: RT 11,233, površina 95,16%.

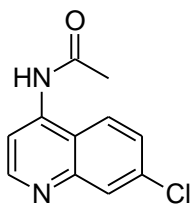
#### **7-Hlorohinolin-4-amin (45)<sup>169</sup>**



U rastvor 4,7-dihlorhinolina (676 mg, 3,41 mmol) u fenolu (3,2 g, 34 mmol), koji se meša u dvogrlom balonu na 110 °C, doda se u porcijama  $(NH_4)_2CO_3$  (1,64 g, 17,1 mmol) brzinom koju određuje intenzitet nastajanja pene u balonu. Po dodatku predviđene količine, smeša se zagreva tri sata na

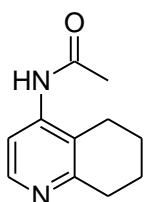
165 °C. Posle hlađenja do sobne temperature, reakciona smeša se razblaži dietil-etrom. Smeša se ispere 10% vodenim rastvorom NaOH, ekstrahuje dietil-etrom i organski sloj suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja, rastvarač je uklonjen destilacijom pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH). Prinos 602 mg, 99%. Čvrsta supstanca bele boje, t. t. 137–139 °C. IR (KBr): 3459j, 3358j, 3241j, 2460sr, 1698sr, 1639j, 1612j, 1576j, 1508j, 1445j, 1378sr, 1327sr, 1284sr, 1201sr, 1130sr, 1078sr, 910sr, 879sr, 855sr, 839sr, 813sr, 761sr, 675sl, 644sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 8,26 (d, 1H, *J* = 5,5), 8,05 (d, 1H, *J* = 8,9), 7,77 (d, 1H, *J* = 2,1), 7,37 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 9,0, *J*<sub>2</sub> = 2,2), 6,62 (d, 1H, *J* = 5,3). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 154,55; 152,11; 150,18; 136,66; 127,55; 125,93; 125,14; 118,48; 104,03. HRMS: *m/z* 179,03700 odgovara molekulknoj formuli C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>ClN<sub>2</sub>H<sup>+</sup> (greška u ppm –0,32).

#### ***N*-(7-hlorohinolin-4-il)acetamid (46)**<sup>169</sup>



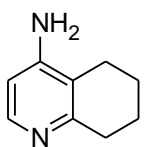
Rastvor jedinjenja **45** (844 mg, 4,73 mmol) u acetanhidridu (3,4 mL) zagreva se uz reflux dva sata. Posle hlađenja do sobne temperature, u reakcionu smešu se doda zasićeni vodeni rastvor NaCl i 10% vodeni rastvor NaOH. Smeša se ekstrahuje etil-acetatom. Spojeni organski slojevi suše se anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, EtOAc/MeOH i flash, Biotage SP, RP kolona, eluent MeOH/H<sub>2</sub>O). Prinos: 799 mg, 91%. Čvrsta supstanca bele boje, t. t. 169–172 °C. IR (KBr): 3434j, 3267j, 3048sr, 2924sr, 2852sr, 1662j, 1614j, 1594sr, 1570j, 1528j, 1491j, 1444sr, 1422sr, 1384sr, 1371sr, 1311j, 1274sr, 1244sr, 1187sl, 1167sl, 1104sl, 1081sl, 1041sl, 1016sl, 959sl, 970sl, 918sl, 854sr, 833sr, 818sr, 765sl, 714sr, 668sl, 636sl, 615sl, 587sl, 557sl, 519sl, 502sl, 474sl, 433sl, 420sl, 403sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 8,79–8,68 (m, 1H), 8,25–8,19 (m, 1H), 8,18–8,11 (m, 1H), 8,02–7,88 (m, 1H), 7,62–7,50 (m, 1H), 2,32 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 172,74; 153,10; 150,25; 144,14; 137,05; 128,55; 128,39; 124,95; 121,12; 113,90; 24,30. HRMS: *m/z* 221,04691 odgovara molekulknoj formuli C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>OH<sup>+</sup> (greška u ppm –3,19).

### ***N*-(5,6,7,8-tetrahidrohinolin-4-il)acetamid (47)**



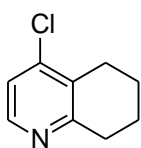
Jedinjenje **46** (551 mg, 2,49 mmol) se hidrogenizuje u Paar-ovoj boci vodonikom (50 psi), u prisustvu PtO<sub>2</sub> (55 mg, 10%) kao katalizatora, u smeši glac. AcOH (48 mL) i HClO<sub>4</sub> (0,3 mL). Smeša se mučka na sobnoj temperaturi 64 sata. Katalizator se odvoji ceđenjem. Doda se 10% rastvor NaOH u vodi i proizvod ekstrahuje dihlormetanom. Spojeni organski slojevi suše se anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, EtOAc/MeOH). Prinos: 310 mg, 65%. Čvrsta supstanca bele boje, t. t. 148–151 °C. IR (ATR): 3352sr, 3147sr, 3069sr, 2934j, 2860sr, 1702j, 1682j, 1583j, 1514j, 1459sr, 1435sr, 1406sr, 1369sr, 1337sr, 1297j, 1254sr, 1166sl, 1002sl, 845sl, 736sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 8,17 (d, 1H, *J* = 5,5), 7,72 (d, 1H, *J* = 5,5), 2,92–2,82 (m, 2H), 2,72–2,65 (m, 2H), 2,20 (s, 3H), 1,91–1,79 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 172,45; 158,64; 146,69; 146,37; 125,22; 116,29; 33,14; 24,81; 24,00; 23,47; 23,41. HRMS: *m/z* 191,11758 odgovara molekulskoj formuli C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>OH<sup>+</sup> (greška u ppm –1,64).

### **5,6,7,8-Tetrahidrohinolin-4-amin (48)**



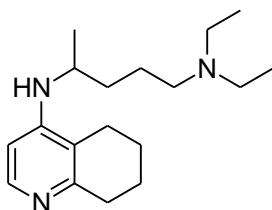
Rastvor acetamida **47** (549 mg, 2,88 mmol) u 2 M HCl (6,5 mL) meša se tri sata na 70 °C. Posle hlađenja do sobne temperature, podesi se kiselost smeše dodatkom amonijaka na pH = 12. Proizvod se ekstrahuje iz vodenog sloja dihlormetanom. Spojeni organski slojevi suše se anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja, rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Prinos: 382 mg, 89%. Čvrsta supstanca svetložute boje, t. t. 125–126 °C. IR (ATR): 3336j, 3194j, 2933j, 2860sr, 1637j, 1590j, 1481sr, 1451sr, 1351sr, 1274sl, 1190sl, 1164sl, 1102sl, 899sl, 818sr, 736sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 8,02 (d, 1H, *J* = 5,5), 6,38 (d, 1H, *J* = 5,5), 4,05 (ps, NH<sub>2</sub>), 2,95–2,73 (m, 2H), 2,59–2,33 (m, 2H), 2,10–1,76 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 157,03; 150,83; 146,74; 115,84; 107,10; 32,71; 22,87; 22,75; 22,48. HRMS: *m/z* 149,10661 odgovara molekulskoj formuli C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>H<sup>+</sup> (greška u ppm –4,78).

#### 4-Hloro-5,6,7,8-tetrahidrohinolin (49)



U rastvor amina **48** (380 mg, 2,6 mmol) u glac. AcOH (2,3 mL), koji se meša na 0 °C, ukapa se 28% HCl (1,5 mL) i vodeni rastvor NaNO<sub>2</sub> (257 mg, 0,85 mL). Tako dobijena smeša, posle 10 minuta mešanja na 0 °C, ukapa se u rastvor CuCl (659 mg, 6,66 mmol) u 28% HCl (1,2 mL) na istoj temperaturi. Mešanje se nastavi 17 sati na sobnoj temperaturi. Reakciona smeša se pomoću vodenog rastvora NaOH i dihlormetana prenese u levak za odvajanje. Slojevi se razdvoje. Organski sloj suši se anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, EtOAc/MeOH). Prinos: 226 mg, 53%. Bezbojna uljasta supstanca. GC/MS (m/z (%)): 165,9 ([M<sup>+</sup>], 100); 132,0 (33). Proizvod se bez detaljne karakterizacije koristi kao polazni supstrat u sledećem sintetičkom koraku.

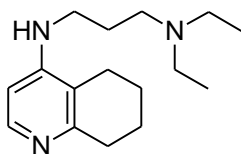
#### *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-dietil-*N*<sup>4</sup>-(5,6,7,8-tetrahidrohinolin-4-il)pentan-1,4-diamin (50)



Jedinjenje **50** sintetiše se po postupku F korišćenjem Pd(OAc)<sub>2</sub> (1,1 mg, 0,0049 mmol), SPhos (4,1 mg, 0,0010 mmol), **49** (21 mg, 0,12 mmol), *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-dietilpentan-1,4-diamina (29,7 mg, 0,188 mmol), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (66,5 mg, 0,312 mmol) i dioksana (1 mL). Prinos: 9,9 mg, 27%. Bezbojna uljasta supstanca. IR (ATR): 3314sl, 2967j, 2932j, 2865sr, 2802sr, 1589j, 1513sr, 1452sr, 1371sl, 1342sl, 1165sl, 805sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 8,07 (d, 1H, *J* = 5,6), 6,32 (d, 1H, *J* = 5,6), 3,85–3,70 (m, H-N), 3,65–3,47 (m, 1H), 2,95–2,71 (m, 2H), 2,60–2,25 (m, 8H), 1,95–1,75 (m, 4H), 1,63–1,44 (m, 4H), 1,22 (d, 3H, *J* = 6,7), 1,00 (t, 6H, *J* = 7,0). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 155,88; 150,68; 146,96; 114,97; 102,50; 52,75; 47,75; 46,79; 34,85; 32,75; 23,76; 22,79; 22,61; 22,52; 20,74; 11,56. HRMS: *m/z* 290,25771 odgovara molekularnoj formuli C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>H<sup>+</sup> (greška u ppm –4,69). HPLC čistoća: metoda G (λ = 290 nm): RT 8,644, površina 97,25%; metoda F (λ = 290 nm): RT 4,084, površina 97,18%.

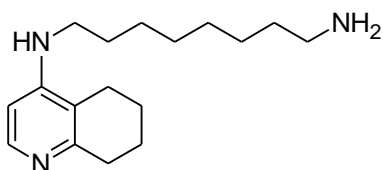


### *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-dietil-*N*<sup>3</sup>-(5,6,7,8-tetrahidrohinolin-4-il)propan-1,3-diamin (**51**)



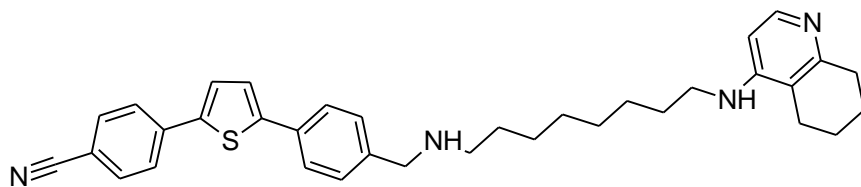
Jedinjenje **51** sintetise se po postupku F korišćenjem Pd(OAc)<sub>2</sub> (1,4 mg, 0,0064 mmol), SPhos (5,2 mg, 0,013 mmol), **49** (26,8 mg, 0,159 mmol), *N,N*-dietilpropan-1,3-diamin (38 μL, 0,24 mmol), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (84,6 mg, 0,398 mmol) i dioksana (1,3 mL). Prinos: 18 mg, 43%. Bezbojna uljasta supstanca. IR (ATR): 3266sl, 2968sr, 2933sr, 2873sr, 2831sr, 1591j, 1518sr, 1452sr, 1375sl, 1343sl, 1166sl, 1139sl, 1067sl, 801sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 8,06 (d, 1H, *J* = 5,6), 6,26 (d, 1H, *J* = 5,6), 5,94 (ps, H-N), 3,35–3,10 (m, 2H), 2,90–2,70 (m, 2H), 2,65–2,45 (m, 6H), 2,40–2,25 (m, 2H), 1,95–1,65 (m, 6H), 1,03 (t, 3H, *J* = 7,0). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 155,41; 147,13; 115,32; 101,84; 52,74; 46,73; 43,64; 32,68; 25,27; 23,17; 22,72; 22,54; 11,38. HRMS: *m/z* 262,22666 odgovara molekulskoj formuli C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>H<sup>+</sup> (greška u ppm –4,25). HPLC čistoća: metoda G (λ = 290 nm): RT 1,353, površina 96,66%; metoda F (λ = 290 nm): RT 4,016, površina 99,41%.

### *N*<sup>1</sup>-(5,6,7,8-tetrahidrohinolin-4-il)oktan-1,8-diamin (**52**)



Jedinjenje **52** sintetise se po postupku F korišćenjem Pd(OAc)<sub>2</sub> (9,9 mg, 0,044 mmol), SPhos (36,3 mg, 0,0883 mmol), **49** (185 mg, 1,10 mmol), 1,8-diaminooktan (239 mg, 1,66 mmol), K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (587 mg, 2,76 mmol) i dioksana (9,3 mL). Prinos: 200 mg, 66%. Bezbojna uljasta supstanca. IR (ATR): 3299sr, 2928j, 2855j, 1592j, 1523sr, 1456sr, 1344sr, 1165sl, 808 sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 8,08 (d, 1H, *J* = 5,7), 6,31 (d, 1H, *J* = 5,7), 3,93 (s, H-N, izmenljiv sa D<sub>2</sub>O), 3,25–3,05 (m, 2H), 2,90–2,75 (m, 2H), 2,68 (t, 2H, *J* = 7,0), 2,41–2,26 (m, 2H), 1,94–1,76 (m, 4H), 1,74–1,54 (m, 4H), 1,50–1,25 (m, 8H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 155,72; 151,44; 147,10; 114,97; 102,21; 42,95; 42,19; 33,75; 32,71; 29,37; 29,31; 29,21; 26,99; 26,79; 22,70; 22,64; 22,50. HRMS: *m/z* 276,24282 odgovara molekulskoj formuli C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>H<sup>+</sup> (greška u ppm –2,19).

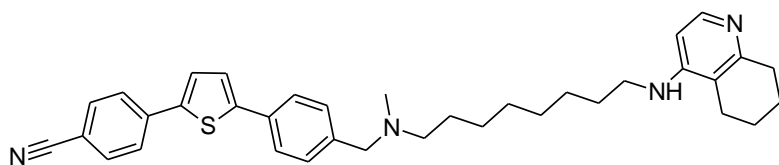
**4-{5-[4-({[8-(5,6,7,8-tetrahydrohinolin-4-ilamino)oktil]amino}metil)fenil]-2-tienil}benzonitril (53)**



Jedinjenje **53**  
sintetiše se po  
postupku B  
korišćenjem

aldehida **35** (61 mg, 0,21 mmol), amina **52** (87 mg, 0,32 mmol), glac. AcOH (19  $\mu$ L, 0,32 mmol), NaBH<sub>4</sub> (47,9 mg, 1,27 mmol) i smeše rastvarača MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9 mL, 2 : 1, v/v). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, EtOAc/MeOH i flash, Biotage SP, NH kolona, eluent EtOAc/MeOH). Prinos: 37 mg, 32%. Čvrsta supstanca svetložute boje, t. t. 155–157 °C. IR (film): 3328sr, 2930j, 2856j, 2869sr, 2221sr, 1701sl, 1670sl, 1653sr, 1590j, 1524j, 1494sr, 1452sr, 1347sr, 1310sr, 1277sr, 1166sr, 1098sl, 804sr cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 8,07 (d, 1H, *J* = 5,7), 7,74–7,53 (m, 6H), 7,45–7,28 (m, 4H), 6,30 (d, 1H, *J* = 5,7), 3,80 (s, 2H), 3,24–3,08 (m, 2H), 2,88–2,74 (m, 2H), 2,70–2,55 (m, 2H), 2,41–2,27 (m, 2H), 1,89–1,75 (m, 4H), 1,68–1,58 (m, 2H), 1,56–1,46 (m, 2H), 1,43–1,28 (m, 8H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 155,56; 151,54; 146,92; 145,99; 140,80; 138,53; 132,72; 132,34; 128,74; 126,06; 125,77; 125,64; 124,16; 118,84; 115,00; 110,37; 102,21; 53,68; 49,45; 42,96; 32,56; 30,08; 29,43; 29,27; 29,21; 27,24; 26,98; 22,69; 22,60; 22,48. HRMS: *m/z* 549,30216 odgovara molekulskoj formuli C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>SH<sup>+</sup> (greška u ppm –4,52). HPLC čistoća: metoda G ( $\lambda$  = 330 nm): RT 8,837, površina 97,09%; metoda A ( $\lambda$  = 330 nm): RT 7,689, površina 95,53%.

**4-{5-[4-({metil[8-(5,6,7,8-tetrahydrohinolin-4-ilamino)oktil]amino}metil)fenil]-2-tienil}benzonitril (54)**

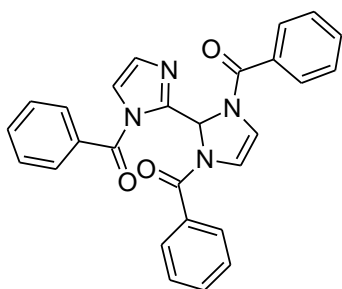


Jedinjenje **54** sintetiše se  
po postupku D  
korišćenjem rastvora  
jedinjenja **53** (19 mg,

0,035 mmol) u metanolu (0,9 mL), 37% vodenog rastvora formaldehida (2,1 mg, 0,069 mmol) i smeše ZnCl<sub>2</sub> (9,4 mg, 0,069 mmol), NaCNBH<sub>3</sub> (8,7 mg, 0,14 mmol) i metanola (0,9 mL). Smeša se meša dva sata na sobnoj temperaturi. Sirovi proizvod se prečisti

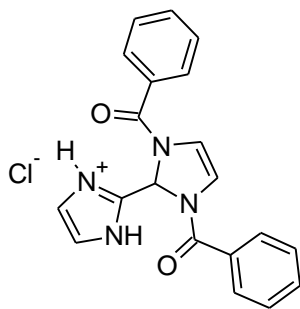
hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, NH kolona, eluent MeOH). Prinos: 16,4 mg, 84%. Bledožuta uljasta supstanca. IR (film): 3267sr, 3054sr, 2928j, 2855j, 2225sr, 1634j, 1600j, 1567j, 1537sr, 1454sr, 1374sr, 1274sr, 1175sr, 1114sl, 837sr, 806sr, 735sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8,08 (d, 1H,  $J = 5,7$ ), 7,72–7,62 (m, 4H), 7,60–7,55 (m, 2H), 7,41–7,27 (m, 4H), 6,30 (d, 1H,  $J = 6,3$ ), 3,49 (s, 2H), 3,20–3,10 (m, 2H), 2,89–2,75 (m, 2H), 2,43–2,27 (m, 4H), 2,20 (s, 3H), 1,90–1,78 (m, 4H), 1,68–1,58 (m, 4H), 1,57–1,47 (m, 2H), 1,43–1,28 (m, 8H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 155,81; 151,40; 147,21; 146,07; 140,64; 139,70; 138,55; 132,72; 132,30; 129,61; 126,06; 125,63; 125,57; 124,12; 118,85; 114,97; 110,34; 102,22; 61,99; 57,48; 42,97; 42,31; 32,79; 29,42; 29,30; 29,23; 27,38; 27,29; 27,02; 22,72; 22,67; 22,54. HRMS:  $m/z$  563,31839 odgovara molekularnoj formuli  $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{SH}^+$  (greška u ppm –3,38). HPLC čistoća: Metoda G ( $\lambda = 330$  nm): RT 8,651, površina 96,45%; Metoda A ( $\lambda = 330$  nm): RT 7,691, površina 95,11%.

### 1,1',3-tribenzoil-2,3-dihidro-1*H*,1'*H*-2,2'-biimidazol (55)<sup>172</sup>



U smešu imidazola (10 g, 0,15 mol), trietilamina (40,9 mL, 0,294 mol) i acetonitrila (147 mL) ukapava se benzoil-hlorid (36,9 mL) u toku jednog sata. Tokom ukapavanja, temperatura se održava u intervalu 15–25°C dodavanjem leda u vodeno kupatilo. Po dodatku celokupne količine benzoil-hlorida, mešanje se nastavi na sobnoj temperaturi. Posle jednog sata u reakcionu smešu doda se etar (147 mL) i voda (733 mL) i smeša se ohladi na 5 °C. Beli talog se odvoji ceđenjem i ispere vodom, acetonom i etrom. Talog se suši na vazduhu. Prinos: 31,2 g, 95%. t. t. 197–198 °C. IR (ATR): 3418sr, 3116sr, 3064sl, 1720j, 1647j, 1628j, 1599sr, 1576sr, 1478sl, 1448sr, 1393j, 1350j, 1283j, 1204sr, 1158sr, 1115sr, 1083sr, 1028sl, 1002sl, 912sr, 866sr, 791sr, 711j, 624sr, 580sr, 509sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8,06 (s, 1H), 7,91 (ps, 1H), 7,64–7,35 (m, 13H), 7,20–6,85 (m, 2H), 6,38 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 167,58; 164,63; 146,81; 133,69; 133,29; 132,96; 131,06; 130,64; 128,52; 127,88; 127,83; 120,74; 114,55; 69,22.

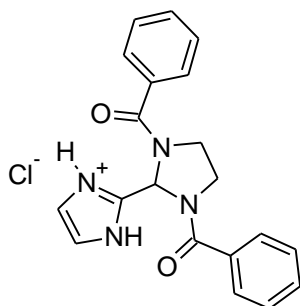
### 2-(1,3-dibenzoil-2,3-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-imidazol-3-ijum-hlorid (56)<sup>173</sup>



Smeša jedinjenja **55** (16,9 g, 0,038 mol), metanola (56 mL) i konc. HCl (3,4 mL) meša se u čaši na sobnoj temperaturi. Jedinjenje **55** se postupno rastvori posle jednog sata mešanja. Tokom pet sati stajanja bistrog rastvora na sobnoj temperaturi, izdvaja se beli čvrst proizvod. Doda se dietil-etar (202 mL). Posle 12 sati talog se procedi i ispere svežim dietil-etrom. Suši

se na vazduhu. Prinos: 13,2 g, 92%. Čvrsta supstanca bele boje, t. t. 223–225 °C. IR (ATR): 3423sr, 3355sr, 3147sr, 2837sr, 2766sr, 2680sr, 2572sr, 1654j, 1577sl, 1492sl, 1447sr, 1382j, 1343j, 1291sr, 1164sl, 1100sl, 977sl, 907sl, 866sr, 787sr, 763sl, 710sr, 622sl, 504sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 7,76–7,50 (m, 13H), 6,86 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 167,52; 143,29; 133,80; 133,18; 130,00; 129,17; 121,00; 116,27; 69,36.

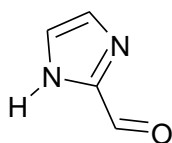
### 2-(1,3-dibenzoilimidazolidin-2-il)-1*H*-imidazol-3-ijum-hlorid (57)<sup>173</sup>



Jedinjenje **56** (19,16 g, 0,05 mol) se hidrogenizuje vodonikom (50 Psi) u Paar-ovoj boci, u prisustvu 10% paladijuma na ugljeniku (1 g, 5%) u deaerisanom 95% etanolu (151 mL) na sobnoj temperaturi dva sata. Katalizator se ukloni ceđenjem. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak se rastvori u ledenom acetonu (104 mL). Intenzivnim mućkanjem nastaje beli talog. Talog se procedi i ispere hladnim acetonom i etrom. Suši se na vazduhu.

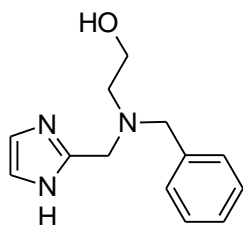
Prinos: 17,4 g, 90%. Čvrsta supstanca bele boje, t. t. 222–224 °C. IR (ATR): 3420sr, 3156sr, 2878sr, 2691sr, 1643j, 1576sr, 1448sr, 1385j, 1216sl, 909sr, 782sr, 716sr cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 7,64–7,47 (m, 12H), 7,07 (s, 1H), 4,27–4,19 (m, 2H), 3,97–3,88 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 171,85; 145,73; 135,23; 132,52; 129,78; 128,55; 120,62; 66,89.

### 1*H*-imidazol-2-karbaldehid (**59**)<sup>173</sup>



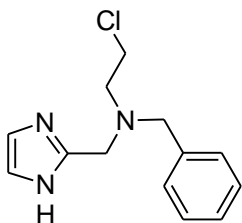
Rastvor jedinjenja **57** (20,58 g, 0,054 mol) u konc. HCl (215 mL) meša se uz refluks ( $T > 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Posle 27 sati mešanja, smeša se ohladi u ledenom kupatilu, što vodi izdvajanju belih kristala benzoeve kiseline. Benzoeva kiselina se odvoji ceđenjem. Rastvarač filtrata se ukloni pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak se rastvori u 95% etanolu (99 mL) i rastvor ohladi u ledenom kupatilu. Hlađenjem, nastaje bleožuti talog etilendiamina-dihidrohlorida, koji se odvoji ceđenjem. Posle ponovnog uklanjanja rastvarača filtrata pod sniženim pritiskom, suvi ostatak se rastvori u vodi (41 mL). U vodeni rastvor dodaje se u porcijama  $\text{NaHCO}_3$ . Sa prestankom izdvajanja  $\text{CO}_2$ , nastaje čvrsti proizvod oker boje. Smeša sa talogom se ohladi na ledu i procedi. Proizvod se suši na vazduhu. Prinos: 4,62 g, 90%. t. t. 205–206  $^{\circ}\text{C}$ . IR (ATR): 3147j, 3121j, 2977j, 2879j, 2650j, 1691sr, 1556sl, 1520sr, 1492j, 1450sr, 1413sr, 1376sr, 1338sr, 1312sr, 1285j, 1237sr, 1180sr, 1140sr, 1102j, 1083j, 1056j, 1008sr, 986sr, 940sr, 915sr, 852sr, 831sr, 770sr, 744sr, 705sr, 633sr, 570sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 9,64 (s, 1H), 7,42 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 181,32; 145,70.

### 2-[benzil(1*H*-imidazol-2-ilmetil)amino]etanol (**60**)



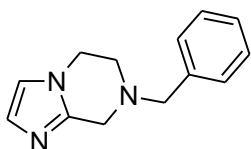
Jedinjenje **60** sintetiše se po postupku B korišćenjem aldehida **59** (2 g, 0,02 mol), alkohola **64** (4,09 g, 0,03 mol), smeše rastvarača  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (195 mL, 2 : 1, v/v), glac. AcOH (1,6 mL, 0,028 mol) i  $\text{NaBH}_4$  (4,72 g, 0,125 mol). Posle obrade, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$ , eluent  $\text{EtOAc}/\text{MeOH}$ ). Prinos: 3,54 g, 74%. Bezbojna uljasta supstanca. IR (ATR): 3165j, 2935j, 2823j, 1557sr, 1492sr, 1452j, 1375sr, 1346sr, 1266sr, 1130sr, 1100sr, 1049sr, 986sr, 871sr, 737j, 701j, 616sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,35–7,20 (m, 5H), 6,93 (s, 2H), 3,79 (s, 2H), 3,70–3,63 (m, 4H), 2,71 (t,  $J = 5,0\text{ Hz}$ , 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 146,52; 138,30; 128,84; 128,38; 127,25; 121,64; 59,40, 58,90; 55,92; 51,38. GC/MS (m/z (%)): 150,1 (40); 120,1 (55); 91,0 (100); 82,0 (65).

### ***N*-benzil-2-hloro-*N*-(1*H*-imidazol-2-ilmetil)etanamin (**61**)<sup>213</sup>**



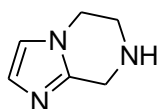
U rastvor jedinjenja **60** (3,54 g, 1,53 mmol) u dihlormetanu (133 mL), koji se meša na 0 °C, ukapa se SOCl<sub>2</sub> (10 mL) i mešanje nastavi uz refluks (40 °C). Posle pet sati, mešanje se prekine i rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom uz dodatak acetonitrila. Suvi ostatak se, bez prečišćavanja i karakterizacije, koristi u narednom sintetičkom koraku kao polazni supstrat.

### **7-benzil-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-*a*]pirazin (**62**)**



U suspenziju NaH (673 mg, 0,017 mol, 60% disperzija u ulju) u suvom DMF (20 mL), koja se meša u atmosferi argona, doda se deaerisani rastvor hlorida **61** (3,82 g, 0,015 mol) u DMF (39 mL). Smeša se meša na 100 °C. Posle 24 sata, doda se voda i rastvarač ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH). Prinos: 2,47 g, 76%. Smeđa uljasta supstanca. IR (ATR): 3352j, 3196j, 2929sl, 2816sl, 1666j, 1501sr, 1450sr, 1391sr, 1348sr, 1279sl, 1188sl, 1132sl, 1106sl, 1067sl, 1001sl, 865sl, 742sr, 700sr, 675sr, 571sr, 460sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 7,40–7,27 (m, 5H), 7,10–7,02 (m, 1H), 6,90–6,85 (m, 1H), 4,01 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 3,87 (s, 2H), 3,74 (s, 2H), 2,97–2,85 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 142,52; 136,30; 128,94; 128,61; 127,83; 122,87; 118,58; 61,47; 49,91; 48,14; 44,95. GC/MS (*m/z* (%)): 213,1 ([M<sup>+</sup>], 50); 122,0 (100); 91,0 (90).

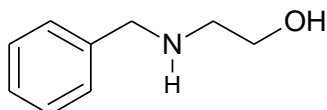
### **5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-*a*]pirazin (**63**)**



Benzil-grupa uklanja se hidrogenizacijom jedinjenja **62** (2,12 g, 9,94 mmol) vodonikom (30 Psi) u Paar-ovoj boci u prisustvu 10% paladijuma na ugljeniku (2,12 g) u deaerisanom metanolu (150 mL). Posle pet sati mućkanja, katalizator se odvoji ceđenjem. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>). Prinos: 1,07g, 88%. Smeđa uljasta supstanca. IR (ATR): 3296j, 2959j, 1660sr, 1532sr, 1502j, 1448sr, 1369sr, 1325sr, 1301sr, 1274sr, 1199sl, 1178sr, 1118sr, 1082sr, 996sl, 961sr, 936sr, 896sr, 853sr, 741sr, 693sr, 671sr, 528sr, 467sl cm<sup>-1</sup>.

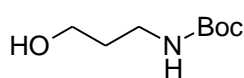
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 7,10 (s, 1H), 6,89 (s, 1H), 4,10–3,90 (m, 4H), 3,30–3,10 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 142,44; 126,08; 118,30; 44,19; 43,13; 42,11. GC/MS ( $m/z$  (%)): 123,1 ( $[\text{M}^+]$ , 70); 122,1 (100).

### 2-(benzilamino)etanol (64)<sup>214,215</sup>



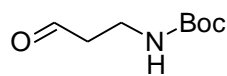
U rastvor benzaldehida (4 mL, 0,04 mol) u metanolu (130 mL), koji se meša na 0 °C, doda se etanolamin (2 g, 0,03 mol). Posle 40 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, smeša se ponovo ohladi na 0 °C i doda se u porcijama  $\text{NaBH}_4$  (1,24 g, 0,03 mol). Mešanje se nastavi na sobnoj temperaturi četiri sata. Reakcija se zaustavlja dodatkom vode. Metanol se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se ekstrahuje iz vodenog sloja dihlormetanom. Organski sloj se suši anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$ , eluent  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ). Prinos: 4,51g, 91%. Bezbojna uljasta supstanca. IR (ATR): 3749sl, 3671sl, 3647sl, 3280j, 2840j, 1562j, 1455j, 1408j, 1338sr, 1090sr, 1016sr, 924sl, 751sr, 701sr, 653sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,40–7,20 (m, 5H), 3,78 (s, 2H), 3,68–3,58 (m, 2H), 2,78–2,71 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 139,56; 128,45; 128,20; 127,14; 60,66; 53,44; 50,58.

### *tert*-butil (3-hidroksipropil)karbamat (65)<sup>216</sup>



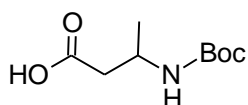
U rastvor 3-amino-1-propanola (400 mg, 5,32 mmol) u dihlormetanu (18 mL), koji se meša na 0 °C, doda se u porcijama di-*tert*-butil-dikarbonat,  $(\text{Boc})_2$ , (1,22 g, 5,59 mmol). Mešanje se nastavi na sobnoj temperaturi 2,5 sata. Doda se dihlormetan i voda. Slojevi se razdvoje, a organski sloj se ispere vodom i zasićenim vodenim rastvorom  $\text{NaCl}$ . Suši se anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Posle sušenja i ceđenja, rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$ , eluent heksan/EtOAc i EtOAc/MeOH). Prinos: 913 mg, 98%. Bezbojna uljasta supstanca.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 4,85 (ps, 1H), 3,85–3,50 (m, 2H), 3,40–3,20 (m, 2H), 1,75–1,62 (m, 2H), 1,44 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 157,16; 79,58; 59,19; 36,86; 32,84; 28,32.

### ***tert*-butil (3-oksopropil)karbamat (66)**



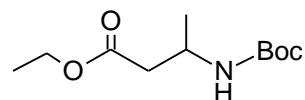
Jedinjenje **66** sintetise se po postupku G korišćenjem jedinjenja **65** (1,18 g, 6,73 mmol), PCC (3,19 g, 14,8 mmol) i dihlormetana (36 mL). Posle grubog prečišćavanja hromatografijom na stubu, dobija se bleđožuta uljasta supstanca. Prinos: 989 mg, 85%. Bez detaljne karakterizacije, jedinjenje **66** se koristi kao polazno jedinjenje u sledećem sintetičkom koraku.

### **3-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]butanska kiselina (67)<sup>217</sup>**



U suspenziju 3-aminobuterne kiseline (755 mg, 7,32 mmol) u dioksanu (15 mL) i vodi (7,6 mL) doda se 1M NaOH (3,8 mL). Smeša se zatim ohladi u ledenom kupatilu. Doda se di-*tert*-butil-dikarbonat (2,396 g, 10,98 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (615 mg, 7,32 mmol) i meša još 10 minuta na 0 °C. Mešanje se zatim nastavi na sobnoj temperaturi 16 sati. Smeša se koncentruje na polovinu prvobitne zapremine pod sniženim pritiskom, doda se etil-acetat, smeša ohladi na 0 °C i podesi se kiselost sredine na pH = 2–3 dodatkom 1M KHSO<sub>4</sub>. Slojevi se razdvoje. Proizvod se ekstrahuje etil-acetatom iz vodenog sloja. Organski sloj se ispere vodom i suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH). Prinos: 1,47 g, 99%. Bezbojna uljasta supstanca. IR (ATR): 3330sr, 2980j, 2936sr, 1809sr, 1715j, 1516sr, 1456sr, 1398sr, 1370j, 1303sr, 1251sr, 1213sr, 1169j, 1120j, 1068sr, 952sl, 847sr, 779sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 4,95 (ps, H-N), 4,05 (ps, 1H), 2,80–2,40 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,24 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 176,37; 155,30; 79,58; 43,32; 40,74; 28,35; 20,44.

### **Etil 3-[(*tert*-butoksikarbonil)amino]butanoat (68)**

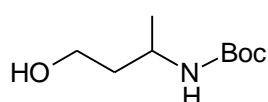


U rastvor jedinjenja **67** (1,47 g, 7,23 mmol) u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL), koji se meša na sobnoj temperaturi, doda se Et<sub>3</sub>N (2,0 mL, 14,4 mmol) i ClCO<sub>2</sub>Et (1,4 mL, 14,4 mL). Posle 18 sati mešanja, rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH). Prinos: 772 mg, 46%. IR (ATR): 3365 sr, 2978j, 2934sr, 1714j, 1517j, 1456sr, 1369j, 1299sr, 1249j, 1171j, 1094sr, 1058sr, 1030sr, 887sl, 851sl, 783sl, 593sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 4,94 (ps, H-N); 4,15 (q, *J* = 7,0 Hz,



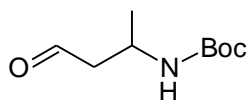
2H); 4,04 (ps, 1H); 2,60–2,30 (m, 2H); 1,44 (s, 9H); 1,26 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H); 1,21 (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 171,73; 155,31; 79,47; 60,69; 43,68; 41,04; 28,58; 20,67; 14,38. GC/MS ( $m/z$  (%)): ( $[\text{M}^+]$ , 2); 130,0 (57); 116,1 (100).

#### ***tert*-butil (3-hidroksi-1-metilpropil)karbamat (69)**



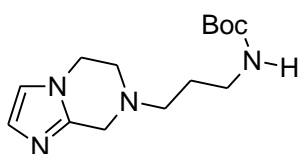
U suspenziju  $\text{LiAlH}_4$  (122,7 mg, 3,235 mmol) u suvom THF (3 mL), koja se meša na  $0^\circ\text{C}$  u atmosferi argona, ukapa se rastvor jedinjenja **68** (299 mg, 1,29 mmol) u THF (3 mL). Mešanje se nastavi na sobnoj temperaturi jedan sat. Zatim se reakciona smeša ohladi na  $0^\circ\text{C}$ . U smešu se pažljivo ukapa THF/voda (8 mL, 3 : 1, v/v). Talog se odvoji ceđenjem i ispere etil-acetatom. Rastvarač filtrata se ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod iz suvog ostatka se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$ , eluent heksan/EtOAc). Prinos: 214 mg, 88%. Bezbojna uljasta supstanca. IR (ATR): 3334sr, 2974j, 2934sr, 1686j, 1530j, 1454sr, 1390sr, 1366sr, 1276sr, 1250sr, 1173j, 1077sr, 1052sr, 987sl, 967sl, 853sl, 782sl, 751sl, 648sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 4,57 (ps, H-N), 3,88 (ps, 1H), 3,70–3,56 (m, 2H), 1,90–1,72 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,40–1,30 (m, 1H), 1,19 (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 156,71; 79,66; 58,85; 43,01; 40,61; 28,28; 21,39.

#### ***tert*-butil (1-metil-3-oksopropil)karbamat (70)**



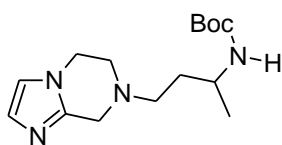
Jedinjenje **70** sintetiše se po postupku G korišćenjem jedinjenja **69** (299 mg, 1,58 mmol), PCC (749 g, 3,47 mmol) i dihlormetana (10 mL). Prinos: 232 mg, 84%. Bezbojna uljasta supstanca. IR (ATR): 3340sr, 2977j, 2933sr, 2731sl, 1692j, 1522j, 1455sr, 1391sr, 1368j, 1250j, 1172j, 1068sr, 856sl, 782sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 9,76 (s, 1H), 4,69 (ps, H-N), 4,20–4,10 (m, 1H), 2,80–2,40 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,30–1,20 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 200,86; 155,00; 79,69; 50,46; 42,26; 28,26; 20,87.

**tert-butyl [3-(5,6-dihydroimidazo[1,2-a]pirazin-7(8H)-il)propil]karbamat (71)**



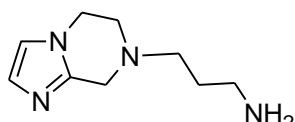
Jedinjenje **71** sintetiše se po postupku B korišćenjem jedinjenja **66** (343,2 mg, 1,981 mmol), **63** (292,8 mg, 2,377 mmol), smeše rastvarača MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (24 mL, 2 : 1, v/v), glac. AcOH (143 μL, 2,377 mmol) i NaBH<sub>4</sub> (450 mg, 11,9 mmol). Posle obrade reakcije, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent heksan/EtOAc i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH). Prinos: 311,4 mg, 60%. Bezbojna uljasta supstanca. IR (ATR): 3336sl, 3112sl, 3048sl, 2973sr, 2934sr, 2873sl, 2816sl, 2772sl, 1700j, 1528sr, 1505sr, 1452sr, 1390sl, 1366sr, 1323sl, 1275sr, 1251sr, 1172j, 1110sr, 1077sl, 994sl, 943sl, 858sl, 734sr, 698sl, 676sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 6,99 (s, 1H), 6,81 (s, 1H), 5,00 (ps, H-N), 4,00 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H), 3,70 (s, 2H), 3,30–3,15 (m, 2H), 2,87 (t, *J* = 5,3 Hz, 2H), 2,62 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,85–1,65 (m, 2H), 1,43 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 157,55; 144,33; 129,78; 119,05; 80,66; 57,06; 53,55; 51,38; 45,55; 40,64; 29,97; 28,64.

**tert-butyl [3-(5,6-dihydroimidazo[1,2-a]pirazin-7(8H)-il)-1-metilpropil]karbamat (72)**



Jedinjenje **72** sintetiše se po postupku B korišćenjem jedinjenja **70** (451,7 mg, 2,41 mmol), **63** (386,2 mg, 3,133 mmol), smeše rastvarača MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL, 2 : 1, v/v), glac. AcOH (188 μL, 3,133 mmol) i NaBH<sub>4</sub> (547 mg, 11,9 mmol). Posle obrade reakcije, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent heksan/EtOAc i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH). Prinos: 406,2 mg, 65%. Bezbojna uljasta supstanca. Proizvod se bez detaljne karakterizacije koristi u sledećem koraku.

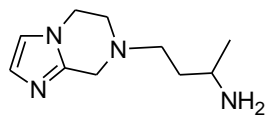
**3-(5,6-dihydroimidazo[1,2-a]pirazin-7(8H)-il)propan-1-amin (73)**



Jedinjenje **73** sintetiše se po postupku H korišćenjem **71** (311,4 mg, 1,112 mmol), TFA (1,3 mL) i dihlormetana (7 mL). Prinos: 139,4 mg, 70%. Svetlosmeđa uljasta supstanca. IR (ATR): 3361j, 2946j, 2821j, 1689sr, 1572sr, 1502j, 1469sr, 1374sr, 1324sr, 1279sr, 1199sr, 1110sr, 1077sr, 994sl, 939sr, 824sl, 741sr, 676sr cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ): 6,99 (s, 1H), 6,90 (s, 1H), 4,08–3,98 (m, 2H), 3,66 (s, 2H), 2,97–2,85 (m, 2H),

2,77 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 2,65 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,85-1,70 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 144,25; 129,27; 119,21; 57,02; 53,02; 51,42; 45,48; 41,42; 30,83. HRMS:  $m/z$  181,14477 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_4\text{H}^+$  (greška u ppm +3,04).

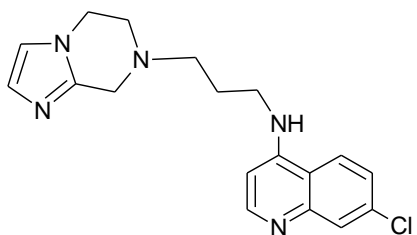
#### 4-(5,6-dihidroimidazo[1,2-*a*]pirazin-7(8*H*)-il)butan-2-amin (74)



Jedinjenje **74** sintetiše se po postupku H korišćenjem **72** (406,2 mg, 1,853 mmol), TFA (2 mL), dihlormetana (10 mL) i MeOH (0,5 mL). Prinos: 174 mg, 65%. Svetlosmeđa uljasta supstanca.

IR (ATR): 3417sl, 2972sr, 2830sr, 1677j, 1540sl, 1506sr, 1460sl, 1424sl, 1393sl, 1327sl, 1280sl, 1201j, 1133j, 1034sl, 942sl, 834sl, 801sl, 743sl, 723sl, 676sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 7,78 (ps, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7,14 (s, 1H), 6,97 (s, 1H), 4,05–3,95 (m, 2H), 3,75–3,55 (m, 2H), 3,35–3,25 (m, 1H), 2,90–2,75 (m, 2H), 2,70–2,55 (m, 2H), 1,90–1,55 (m, 2H), 1,19 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 142,33; 126,10; 118,96; 53,07; 50,85; 49,24; 46,01; 43,99; 31,08; 18,62. HRMS:  $m/z$  195,16053 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{H}^+$  (greška u ppm +2,26).

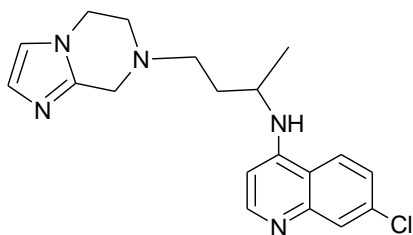
#### 7-hlor-*N*-[3-(5,6-dihidroimidazo[1,2-*a*]pirazin-7(8*H*)-il)propil]hinolin-4-amin (75)



Jedinjenje **75** sintetiše se po postupku C korišćenjem jedinjenja amina **73** (19,1 mg, 0,105 mmol) i 4,7-dihlorhinolina (17,4 mg, 0,088 mmol). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$ , eluent EtOAc/MeOH). Prinos: 15,1 mg, 50%. Čvrsta

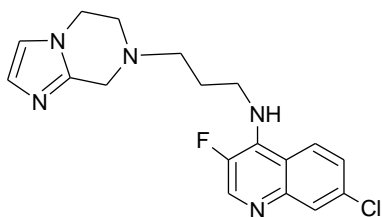
supstanca bež boje, t. t. 71 °C. IR (ATR): 3274sr, 2925j, 2853sr, 1673sr, 1609sr, 1582j, 1541sr, 1502sr, 1452sr, 1370sr, 1329sr, 1281sr, 1246sl, 1202sl, 1137sr, 1111sr, 1080sl, 942sl, 900sl, 879sl, 850sl, 809sl, 767sl, 731sl, 677sl, 647sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 8,49 (d,  $J = 5,2$  Hz, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,22–7,07 (m, 2H), 7,05–6,92 (m, 2H), 6,33 (d,  $J = 5,2$  Hz, 1H), 4,09 (t,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 3,88 (s, 2H), 3,50–3,42 (m, 2H), 3,01 (t,  $J = 5,7$  Hz, 2H), 2,95–2,85 (m, 2H), 2,10–2,00 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 151,88; 150,24; 148,87; 142,23; 134,56; 128,97; 128,45; 125,10; 121,23; 117,75; 117,36; 98,44; 57,30; 51,81; 50,47; 44,01; 43,55; 24,22. HRMS:  $m/z$  342,14700 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClN}_5\text{H}^+$  (greška u ppm 4,53). HPLC čistoća ( $\lambda = 330$  nm): metoda A: RT 3,872, površina 99,36%, metoda G: RT 4,504, površina 99,20%.

**7-hlor-N-[3-(5,6-dihidroimidazo[1,2-*a*]pirazin-7(8*H*)-il)-1-metilpropil]hinolin-4-amin (76)**



Jedinjenje **76** sintetise se po postupku C korišćenjem amina **74** (63,8 mg, 0,328 mmol) i 4,7-dihlorhinolina (32,5 mg, 0,164 mmol). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent EtOAc/MeOH i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (NH<sub>3</sub>) i Biotage SP, NH kolona, eluent heksan/EtOAc i EtOAc/MeOH). Prinos: 23,5 mg, 40%. Bledožuta uljasta supstanca. IR (ATR): 3269sr, 2963sr, 2818sr, 1610sr, 1578j, 1538sr, 1501sr, 1450sr, 1374sr, 1329sr, 1277sr, 1193sl, 1153sl, 1110sl, 1078sl, 933sl, 880sl, 850sl, 810sl, 734sr, 699sl, 678sl, 648sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 8,47 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,88 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,20 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,11 (s, 1H), 7,02–6,90 (m, 3H), 6,37 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 4,10–3,98 (m, 2H), 3,95–3,78 (m, 3H), 3,05–2,85 (m, 3H), 2,78–2,69 (m, 1H), 2,12–2,00 (m, 1H), 1,86–1,75 (m, 1H), 1,34 (d, *J* = 6,1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 151,88; 149,33; 149,23; 142,26; 134,53; 128,89; 128,61; 124,92; 121,26; 117,72; 117,49; 98,71; 54,38; 51,90; 50,38; 48,00; 43,93; 31,73; 19,28. HRMS: *m/z* 356,16272 odgovara molekulskoj formuli C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>5</sub>H<sup>+</sup> (greška u ppm 4,15). HPLC čistoća (λ = 320 nm): metoda A: RT 3,490, površina 95,35%, metoda G: RT 7,515, površina 97,30%.

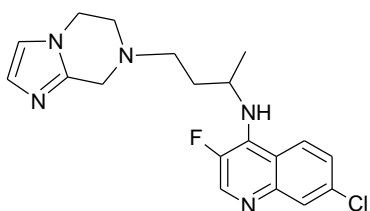
**7-hlor-N-[3-(5,6-dihidroimidazo[1,2-*a*]pirazin-7(8*H*)-il)propil]-3-fluorhinolin-4-amin (77)**



Jedinjenje **77** sintetise se po postupku I korišćenjem Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (8 mg, 0,009 mmol), SPhos (7,2 mg, 0,017 mmol), amina **73** (63 mg, 0,35 mmol), **84** (53,7 mg, 0,175 mmol), NaO<sup>t</sup>Bu (47 mg, 0,49 mmol) i toluena (1,5 mL + 1,5 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, heksan/EtOAc i EtOAc/MeOH i Biotage SP, NH kolona, eluent heksan/EtOAc i EtOAc/MeOH). Prinos: 13,4 mg, 21%. Uljasta supstanca žute boje. IR (ATR): 3270j, 2952j, 2822sr, 1700sr, 1597j, 1575j, 1539j, 1501j, 1455j, 1420j, 1372j, 1324sr, 1298sr, 1270sr, 1191sr, 1139sr, 1110sr, 1077sr, 992 sl, 942sr, 892sl, 814sr, 762sr, 735sr, 700sl, 676sl, 656sl, 622sl, 542sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O, δ): 8,45 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,21 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,15–7,12 (m, 1H), 6,97–6,91 (m, 2H),

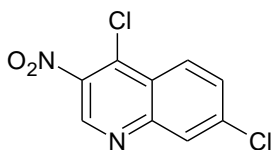
4,07 (t,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 3,90–3,80 (m, 4H), 3,05–2,95 (m, 2H), 2,90–2,80 (m, 2H), 2,05–1,95 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 146,44; 143,58 (d,  $J = 238,3$  Hz); 142,50 (d,  $J = 27,1$  Hz); 142,88; 136,67 (d,  $J = 5,4$  Hz); 133,80; 129,05; 128,85; 125,90; 121,74 (d,  $J = 5,4$  Hz); 119,15 (d,  $J = 5,4$  Hz); 117,85; 57,61; 52,13; 50,49; 46,59; 44,01; 25,52. HRMS:  $m/z$  360,13767 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{ClFN}_5\text{H}^+$  (greška u ppm 4,04). HPLC čistoća ( $\lambda = 320$  nm): metoda A: RT 3,471, površina 95,05%, metoda G: RT 7,381, površina 97,14%.

**7-hlor-*N*-[3-(5,6-dihidroimidazo[1,2-*a*]pirazin-7(8*H*)-il)-1-metilpropil]-3-fluorhinolin-4-amin (78)**



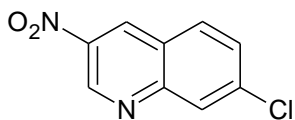
Jedinjenje **78** sintetise se po postupku I korišćenjem  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (6,8 mg, 0,007 mmol), SPhos (6,1 mg, 0,015 mmol), amina **74** (43,5 mg, 0,224 mmol), **84** (46 mg, 0,015 mmol),  $\text{NaO}^t\text{Bu}$  (40,2 mg, 0,419 mmol) i toluena (1mL + 1mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$ , heksan/EtOAc i EtOAc/MeOH). Prinos: 31,5 mg, 56%. Uljasta supstanca oker boje. IR (ATR): 3271j, 2966j, 2822sr, 1596j, 1574j, 1540sr, 1502sr, 1449sr, 1421sr, 1380j, 1350sr, 1298sr, 1270sr, 1192sr, 1142sr, 1112sr, 1078sr, 992sl, 927sl, 879sl, 815sl, 762sl, 734sr, 675sl, 622sl, 540sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 8,42 (d,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 7,86 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H), 7,48 (d,  $J = 8,9$  Hz, 1H), 7,10–7,00 (m, 2H), 6,93 (d,  $J = 1,2$  Hz, 1H), 4,41–4,32 (m, 1H), 4,10–3,92 (m, 2H), 3,87–3,75 (m, 2H), 3,10–3,00 (m, 1H), 2,99–2,89 (m, 2H), 2,80–2,70 (m, 1H), 2,15–2,05 (m, 1H), 1,87–1,75 (m, 1H), 1,36 (d,  $J = 6,1$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 146,15; 143,05 (d,  $J = 239,2$  Hz); 142,43; 142,12 (d,  $J = 28,0$  Hz); 136,38 (d,  $J = 4,5$  Hz); 134,21; 128,26; 128,14; 125,94; 122,10 (d,  $J = 5,4$  Hz); 119,33 (d,  $J = 4,5$  Hz); 118,02; 54,23; 51,66; 50,37; 50,19; 44,05; 32,62; 21,63. HRMS:  $m/z$  374,15307 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClFN}_5\text{H}^+$  (greška u ppm 4,56). HPLC čistoća ( $\lambda = 330$  nm): metoda A: RT 3,520, površina 97,15%, metoda G: RT 7,549, površina 98,21%.

#### 4,7-dihlor-3-nitrohinolin (**80**)<sup>83</sup>



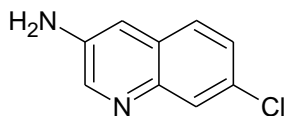
Suspenzija 7-hlor-3-nitrohinolin-4-ola **79** (5,94 g, 0,0264 mol) u POCl<sub>3</sub> (48 mL, 0,52 mol) meša se dva sata na 90 °C, a zatim 24 sata na 120 °C. Reakciona smeša se, posle hlađenja na sobnu temperaturu, pažljivo izlije u smešu led/voda, uz konstantno hlađenje dodavanjem leda. Posle otapanja leda, izdvojeni bež talog se odvoji ceđenjem i suši u sušnici na 80 °C pod sniženim pritiskom. Suvi talog se rastvori u dihlormetanu. Na ovaj način se željeni proizvod odvaja od nerastvornog 7-hlor-3-nitrohinolin-4-ola. Posle ceđenja, filtrat se suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, dobija se bleđožuti amorfni prah. Prinos: 1,99 g, 31%. IR (ATR): 3570sr, 3431sr, 3063j, 2988sr, 2880sr, 1630sr, 1601j, 1581j, 1556j, 1529j, 1481sr, 1395 sr, 1353j, 1333j, 1294sr, 1254sr, 1204sr, 1165sr, 1079sr, 1020sr, 924sr, 898sl, 872sr, 810sr, 774sr, 740sl, 699sr, 605sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 9,28 (s, 1H), 8,38 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,78 (dd, *J*<sub>1</sub> = 9,2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,5 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 149,34; 145,56; 141,06; 139,81; 136,74; 130,74; 129,10; 127,21; 124,03.

#### 7-hlor-3-nitrohinolin (**81**)<sup>218</sup>



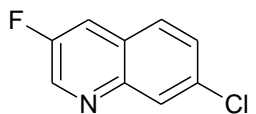
Rastvor jedinjenja **80** (1,99 g, 0,008 mol) i 98% *p*-toluensulfonilhidrazida (1,73 g, 0,009 mol) u hloroformu (72 mL) meša se na sobnoj temperaturi. Tokom mešanja, rastvor se boji narandžasto, a zatim u reakcionoj smeši nastaje bež talog. Posle 24 sata mešanja, smeša se procedi i talog ispere hladnim hloroformom. Talog se suši na vazduhu. Na ovaj način nastali hidrazidni derivat (2,89 g) se rastvori u 0,5 M NaOH (140 mL) i rastvor zagreva jedan sat na 80 °C. Posle zagrevanja, nastaje smeđa talog. Reakciona smeša se ohladi na sobnu temperaturu i procedi. Talog se ispere vodom, a zatim suspenduje u dihlormetanu. Smeša se procedi i filtrat, koji sadrži jedinjenje **81**, suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom dobija se žuta čvrsta supstanca. Prinos: 839 mg, 50%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 9,66 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 9,03 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,99 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,70 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8,9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,8 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 150,32; 145,08; 140,94; 139,80; 131,98; 130,71; 130,01; 128,96; 124,35.

### 7-hlorhinolin-3-amin (**82**)<sup>83</sup>



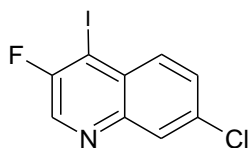
U rastvor jedinjenja **82** (799 mg, 3,83 mmol) u metanolu (78 mL) doda se SnCl<sub>2</sub> (3,63 g, 19,5 mmol). Smeša se zagreva 1,5 sat na 80 °C. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak se rastvori u etil-acetatu. Doda se zasićeni vodeni rastvor NaHCO<sub>3</sub>. Nastali beli talog se procedi kroz celit preko sloja vate na Büchner-ovom levku. Filtrat se prenese u levak za odvajanje. Doda se etil-acetat. Razdvoje se slojevi. Organski sloj se suši anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom dobija se bleđožuta čvrsta supstanca. Prinos: 628 mg, 92%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 8,49 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,51 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,37 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,20 (s, 1H), 4,25–3,60 (m, 2H, NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 143,82; 142,76; 139,86; 130,94; 127,91; 127,84; 127,49; 126,95; 114,62.

### 7-hlor-3-fluorhinolin (**83**)<sup>83</sup>



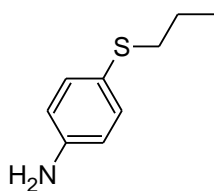
U rastvor jedinjenja **82** (620 mg, 3,47 mmol) u 48% HBF<sub>4</sub> (6,2 mL), koji se meša na 0 °C, polako se ukapa vodeni rastvor NaNO<sub>2</sub> (239 mg, 3,47 mmol, 1,3 mL). Mešanje se nastavi na istoj temperaturi jedan sat. Posle dostizanja sobne temperature, reakciona smeša se procedi i žuti talog nastalog diazonijum-tetrafluorborata ispere se hladnim etanolom i etrom. Nakon sušenja pod sniženim pritiskom, talog se suspenduje u toluenu (7 mL) i zagreva jedan sat na 110 °C. Reakciona smeša se ohladi na sobnu temperaturu, doda se voda i etil-acetat. Razdvoje se slojevi. Organski sloj suši se anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posle ceđenja i uklanjanja rastvarača pod sniženim pritiskom, dobija se bleđožuta čvrsta supstanca. Prinos: 558 mg, 88%. IR (ATR): 3074sr, 3050j, 2958sr, 2926sr, 2855sr, 1725sl, 1615sr, 1597j, 1566sr, 1504sr, 1486j, 1446sr, 1411sr, 1359sr, 1334j, 1263sr, 1188j, 1130sr, 1072sr, 987sr, 959sl, 913sr, 892j, 811sr, 774sr, 734sr, 646sr, 540sr, 513sl, 470sr cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 8,82 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,85–7,70 (m, 2H), 7,60–7,50 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 156,30 (d, *J* = 255,4 Hz); 145,67; 142,58 (d, *J* = 27,1 Hz); 134,48 (d, *J* = 2,71 Hz); 128,80; 128,56; 128,40 (d, *J* = 4,5 Hz); 126,81 (d, *J* = 5,4 Hz); 118,37 (d, *J* = 16,2 Hz). GC/MS (m/z (%)): 181,0 ([M<sup>+</sup>], 100); 146,0 (40).

### 7-hlor-3-fluor-4-jodhinolin (**84**)<sup>83</sup>



U rastvor diizopropilamina (425  $\mu$ L, 3,024 mmol) u suvom THF (2 mL), koji se meša u atmosferi argona na  $-78$  °C, postepeno se ukapa *n*-BuLi. Balon sa reakcionom smešom se prenese u ledeno kupatilo (led/NaCl) i meša 20 minuta. Zatim se smeša ohladi na  $-85$  °C. U smešu se doda rastvor jedinjenja **83** (500 mg, 2,75 mmol) u suvom THF (2 mL) automatskim špricom u toku 30 minuta. Posle četiri sata mešanja na  $-85$  °C, automatskim špricom u toku 30 minuta, doda se rastvor joda u suvom THF. Reakcija se prekida, posle dva sata mešanja na istoj temperaturi, dodatkom smeše rastvarača THF/H<sub>2</sub>O (2–3 mL, 9 : 1, v/v). Smeša se meša tokom noći na sobnoj temperaturi. Sirovi proizvod se prečisti višestrukom hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, eluent heksan/EtOAc i flash, Biotage SP, NH kolona, eluent heksan i metanol). Prinos: 290 mg, 30%. Bela amorfná supstanca. IR (ATR): 3137sl, 3079sr, 3027sr, 2955sr, 2922sr, 2852sr, 1908sl, 1838sr, 1790sl, 1766sr, 1739sr, 1716sl, 1684sl, 1622sl, 1602sr, 1584j, 1550j, 1480j, 1441j, 1383sr, 1356j, 1316j, 1306j, 1254sr, 1209sr, 1177j, 1138sr, 1074j, 1017sr, 950sr, 925j, 870sr, 851sr, 813j, 755sr, 667sr, 642sr, 575sl, 535sr, 508sr, 428sr  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 8,60 (s, 1H), 8,11 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,98 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 7,61 (dd,  $J_1 = 8,8$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 157,19 (d,  $J = 253,6$  Hz); 145,44; 140,87 (d,  $J = 30,7$  Hz); 135,44 (d,  $J = 3,6$  Hz); 132,28 (d,  $J = 5,4$  Hz); 130,02; 129,30; 128,69; 94,96 (d,  $J = 22,6$  Hz). GC/MS ( $m/z$  (%)): 306,9 ([M<sup>+</sup>], 100); 180,0 (30).

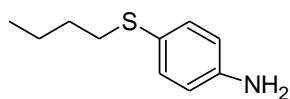
### 4-(Propil)tioanilin (**86**)



Jedinjenje **86** sintetise se po postupku J korišćenjem 1-propantiola (471 mg, 6,18 mmol), 1-hlor-4-nitrobenzena (650 mg, 4,12 mmol), KOH (694 mg, 12,4 mmol) i PEG-600 (19 mL) kao rastvarača. Prinos: 433 mg, 63%. Smeđa uljasta supstanca. IR (ATR): 3456sr, 3349j, 3214sr, 3026sr, 2961j, 2928j, 2870sr, 1620j, 1596j, 1494j, 1457sr, 1377sr, 1284j, 1236sr, 1176sr, 1146sr, 1089sr, 1011sr, 821sr, 734sl, 629sl, 515sl  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 7,23 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 6,62 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 2,77–2,71 (m, 2H), 1,63–1,54 (m, 2H), 0,97 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 145,54; 133,69; 123,78; 115,52; 38,33; 22,62; 13,22.

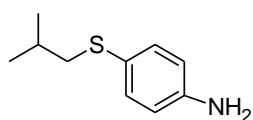


#### 4-(Butiltio)anilin (87)



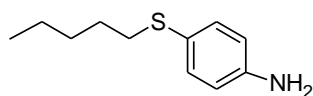
Jedinjenje **87** sintetiše se po postupku J korišćenjem 1-butantiola (204  $\mu$ L, 1,904 mmol), 1-hlor-4-nitrobenzena (200 mg, 1,27 mmol), KOH (214 mg, 3,81 mmol) i PEG-1000 (6 g) kao rastvarača. Prinos: 111,7 mg, 49%. Smeđa uljasta supstanca.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,23 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 6,62 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 3,72 (ps, 2H), 2,77 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,58–1,52 (m, 2H), 1,44–1,36 (m, 2H), 0,89 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 145,61; 133,67; 123,92; 115,57; 36,05; 31,49; 21,79; 13,63.

#### [4-(Izobutiltio)fenil]amin (88)



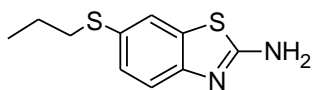
Jedinjenje **88** sintetiše se po postupku J korišćenjem 2-metil-1-propantiola (516  $\mu$ L, 4,75 mmol), 1-hlor-4-nitrobenzena (500 mg, 3,17 mmol), KOH (534 mg, 9,52 mmol) i PEG-600 (15 mL) kao rastvarača. Prinos: 110,1 mg, 19%. Smeđa uljasta supstanca. IR (ATR): 3462sr, 3360sr, 3217sr, 3023sr, 2956j, 2926sr, 2868sr, 1621j, 1598j, 1494j, 1462sr, 1282sr, 1245sr, 1175sr, 822sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,22 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H), 6,61 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H), 3,67 (ps, 2H), 2,66 (d,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 1,76 (sep,  $J = 6,8$  Hz, 1H), 0,99 (d,  $J = 6,6$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 145,54; 133,47; 124,42; 115,56; 45,52; 28,18; 21,89. HRMS:  $m/z$  182,09943 odgovara molekulskoj formuli  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NSH}^+$  (greška u ppm -2,02).

#### 4-(Pentiltio)anilin (89)



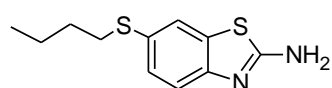
Jedinjenje **89** sintetiše se po postupku J korišćenjem 1-pentantiola (472  $\mu$ L, 3,80 mmol), 1-hlor-4-nitrobenzena (400 mg, 2,54 mmol), KOH (428 mg, 7,63 mmol) i PEG-600 (12 mL) kao rastvarača. Prinos: 156 mg, 31%. Žuta uljasta supstanca. IR (ATR): 3459sr, 3362j, 3213sr, 3026sr, 2956j, 2927j, 2857j, 1621j, 1597j, 1495j, 1462sr, 1378sl, 1336sr, 1283j, 1177sr, 1111sl, 1094sl, 822sr, 518sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,22 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 6,62 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 3,72 (ps, 2H), 2,76 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 1,59–1,53 (m, 2H), 1,39–1,26 (m, 4H), 0,87 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 145,62; 133,65; 123,91; 115,56; 36,34; 30,86; 29,06; 22,24; 13,95. HRMS:  $m/z$  196,11548 odgovara molekulskoj formuli  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NSH}^+$  (greška u ppm +0,15).

### 6-(Propilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-amin (92)



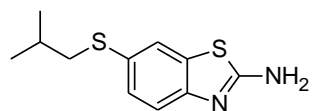
Jedinjenje **92** sintetise se po postupku K korišćenjem rastvora broma (215  $\mu\text{L}$ , 4,20 mmol) u glac. AcOH (1,4 mL), 4-(propiltio)anilina (562,7 mg, 3,364 mmol),  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (1,02 g, 13,4 mmol), glac. AcOH (5,6 mL) i vode (0,3 mL). Prinos: 617,2 mg, 82%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 115–117 °C. IR (ATR): 3369j, 3290sr, 3092j, 2962j, 2924j, 2863sr, 2753sr, 1641j, 1589sr, 1532j, 1445j, 1300sr, 1268sr, 1117sr, 1001sl, 894sl, 876sl, 810sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,60 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,45 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,35 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 2,87 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,68–1,60 (m, 2H), 1,01 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 166,69; 151,66; 131,89; 128,24; 126,78; 122,76; 117,93; 36,32; 22,04; 13,04. HRMS:  $m/z$  225,05194 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm +2,10).

### 6-(Butilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-amin (93)



Jedinjenje **93** sintetise se po postupku K korišćenjem rastvora broma (209  $\mu\text{L}$ , 4,08 mmol) u glac. AcOH (2,1 mL), jedinjenja **87** (593 mg, 3,27 mmol),  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (995,6 mg, 13,08 mmol), glac. AcOH (8,5 mL) i vode (0,45 mL). Prinos: 725 mg, 93%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 96–98 °C. IR (ATR): 3397j, 3277sr, 3084sr, 2962j, 2928j, 2871sr, 2736sl, 1635j, 1591sr, 1529j, 1453j, 1299sr, 1271sr, 1110sr, 809sr, 766sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,61 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,46 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 7,34 (dd,  $J_1 = 8,3$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 5,21 (ps, 2H), 2,89 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,63–1,57 (m, 2H), 1,47–1,40 (m, 2H), 0,91 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 165,77; 150,85; 132,32; 129,71; 129,18; 123,12; 119,36; 35,27; 31,35; 21,84; 13,61. HRMS:  $m/z$  239,06740 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm +1,18).

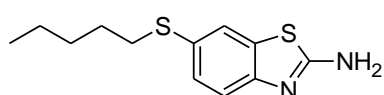
### 6-(Izobutiltio)-1,3-benzotiazol-2-amin (94)



Jedinjenje **94** sintetise se po postupku K korišćenjem rastvora broma (36  $\mu\text{L}$ , 0,70 mmol) u glac. AcOH (0,4 mL), 4-(izobutiltio)anilina **88** (83 mg, 0,56 mmol),  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (170,3 mg, 2,237 mmol), glac. AcOH (1,5 mL) i vode (70  $\mu\text{L}$ ). Prinos: 72,2 mg, 54%. Žuta čvrsta supstanca, t. t. 129–131 °C. IR (ATR): 3354sr, 3290sr, 3234sr, 3080j, 2959j, 2748sl,

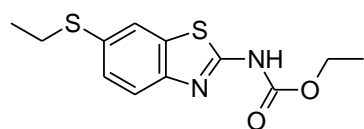
1642j, 1588sl, 1526j, 1440j, 1365w, 1332sl, 1301sr, 1269sr, 1114sr, 821sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,61 (ps, 1H), 7,43 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 7,3–7,32 (m, 1H), 5,47 (ps, 2H), 2,78 (d,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 1,82 (sep,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 1,02 (d,  $J = 6,6$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 165,83; 150,80; 132,31; 130,16; 129,10; 123,02; 119,35; 44,68; 28,24; 21,94. HRMS:  $m/z$  239,06666 odgovara molekulkovoj formuli  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm –1,89).

#### 6-(Pentilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-amin (95)



Jedinjenje **95** sintetiše se po postupku K korišćenjem rastvora broma (42  $\mu\text{L}$ , 0,82 mmol) u glac. AcOH (0,5 mL), 4-(pentiltio)anilina **89** (129 mg, 0,660 mmol),  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (201 mg, 2,64 mmol), glac. AcOH (2 mL) i vode (0,1 mL). Prinos: 68,8 mg, 56%. Žuta uljasta supstanca. IR (ATR): 3429sr, 3279sr, 3075j, 2957j, 2927j, 2859j, 2730sr, 1643j, 1588sr, 1526j, 1452j, 1372sr, 1338sr, 1319sr, 1298sr, 1271sr, 1106sr, 1045sl, 894sl, 814sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,61 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,44 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,33 (dd,  $J_1 = 8,2$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 5,46 (s, 2H), 2,89–2,86 (m, 2H), 1,64–1,58 (m, 2H), 1,42–1,28 (m, 4H), 0,88 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 165,82; 150,89; 132,32; 129,70; 129,17; 123,11; 119,35; 35,57; 30,88; 28,95; 22,21; 13,93. HRMS:  $m/z$  235,08255 odgovara molekulkovoj formuli  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm –0,85).

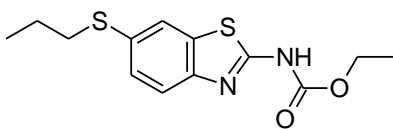
#### Etil [6-(etilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbamat (97)



Jedinjenje **97** sintetiše se u dve faze. Prvi sintetički korak odvija po postupku K korišćenjem rastvora broma (101  $\mu\text{L}$ , 1,97 mmol) u glac. AcOH (1 mL), 4-(etiltio)anilin-hidrochlorida (300 mg, 1,58 mmol),  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (481 mg, 6,32 mmol), glac. AcOH (4 mL) i vode (0,15 mL). Druga reakciona faza odvija se po postupku L korišćenjem rastvora sirovog proizvoda prve faze u benzenu (5 mL), etil-hlorformijata (165  $\mu\text{L}$ , 1,73 mmol) i trietilamina (395  $\mu\text{L}$ , 2,83 mmol). Sirovi proizvod se prečisti kristalizacijom iz benzena. Prinos: 179,4 mg, 40%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 162–165  $^{\circ}\text{C}$ . IR (ATR): 3432sl, 3400sl, 3162sr, 3124sr, 3079sr, 3045sr, 2973j, 2924j, 2776sr, 1720j, 1599j, 1557j, 1444j, 1364sr, 1290j, 1250j, 1119sr, 1070sr, 1048sr, 1021sl, 820sr, 757sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 7,96 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 7,61 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 7,36 (dd,  $J_1 = 8,4$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 4,24 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 2,98 (q,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,28 (t,  $J = 7,1$

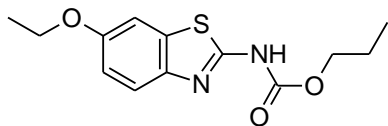
Hz, 3H), 1,22 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 159,53; 153,88; 147,84; 132,61; 130,26; 127,58; 121,85; 120,52; 61,94; 27,48; 14,30. HRMS:  $m/z$  283,05655 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm  $-1,38$ ). HPLC čistoća, metoda D:  $t_{\text{R}} = 8,695$ , površina 99,27%. Metoda C:  $t_{\text{R}} = 9,906$ , površina 96,29%.

#### Etil [6-(propilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbamat (98)



Jedinjenje **98** sintetiše se u dve faze. Prvi sintetički korak odvija po postupku K korišćenjem rastvora broma (63  $\mu\text{L}$ , 1,2 mmol) u glac. AcOH (0,5 mL), 4-(propiltio)anilin-hidrohlorida (200 mg, 0,982 mmol),  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (299 mg, 3,93 mmol), glac. AcOH (2,5 mL) i vode (0,1 mL). Druga reakciona faza odvija se po postupku L korišćenjem rastvora sirovog proizvoda prve faze u benzenu (5 mL), etil-hlorformijata (103  $\mu\text{L}$ , 1,08 mmol) i trietilamina (246  $\mu\text{L}$ , 1,76 mmol). Prinos: 60 mg, 21%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 158–162 °C. IR (ATR): 3135sl, 3076sl, 2957sr, 2909sr, 2869sr, 2782sr, 1725j, 1597j, 1561j, 1453j, 1428sr, 1270j, 1243j, 1110sr, 1069sr, 1045sr, 1022sr, 816sr, 759sr, 707sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 12,00 (ps, 1H), 7,96 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1H), 7,60 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1 H), 7,36 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 4,24 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 2,94 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 1,61–1,54 (m, 2H), 1,27 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H), 0,96 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 159,85; 154,23; 148,00; 132,89; 130,76; 127,84; 122,09; 120,78; 62,20; 35,57; 22,22; 14,52; 13,34. HRMS:  $m/z$  297,07191 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm  $-2,30$ ). HPLC čistoća, metoda D:  $t_{\text{R}} = 9,194$ , površina 99,67%. Metoda C:  $t_{\text{R}} = 10,528$ , površina 99,44%.

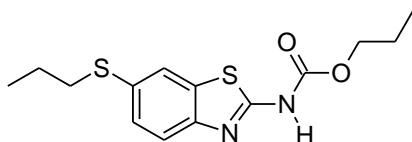
#### Propil (6-etoksi-1,3-benzotiazol-2-il)karbamat (99)



Jedinjenje **99** sintetiše se u dve faze. Prvi sintetički korak odvija po postupku K korišćenjem rastvora broma (93  $\mu\text{L}$ , 1,8 mmol) u glac. AcOH (0,5 mL), 4-etoksianilina (188  $\mu\text{L}$ , 1,46 mmol),  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (444 mg, 5,83 mmol), glac. AcOH (2,5 mL) i vode (0,1 mL). Druga reakciona faza odvija se po postupku L korišćenjem rastvora sirovog proizvoda prve faze u benzenu (5 mL), propil-hlorformijata (180  $\mu\text{L}$ , 1,6 mmol) i trietilamina (366  $\mu\text{L}$ , 2,63 mmol). Posle hromatografskog prečišćavanja, proizvod se kristališe iz benzena. Prinos: 100,7 mg, 25%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 168–169 °C. IR (ATR): 3161sl, 3081sr, 2977j, 2933sr, 2802sr, 1718j, 1612j, 1562j, 1463j, 1391sr,

1272j, 1242j, 1212j, 1113sr, 1057j, 971sl, 941sr, 792sr, 760sr cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 11,83 (ps, 1H), 7,56 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,51 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 6,97 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8,7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2,5 Hz, 1H), 4,14 (t, *J* = 6,6 Hz, 1H), 4,04 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 1,69–1,62 (m, 2H), 1,33 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H), 0,93 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 157,46; 155,12; 154,06; 143,28; 132,76; 120,81; 114,97; 105,47; 67,16; 63,62; 21,73; 14,70; 10,13. HRMS: *m/z* 281,09541 odgovara molekulknoj formuli C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>SH<sup>+</sup> (greška u ppm -0,10). HPLC čistoća, metoda D: t<sub>R</sub> = 8,520, površina 99,48%. Metoda C: t<sub>R</sub> = 9,741, površina 96,69%.

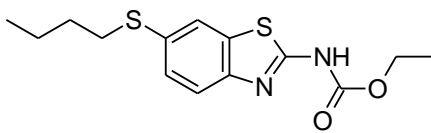
### Propil [6-(propilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbammat (100)



Jedinjenje **100** sintetiše se po postupku L korišćenjem propil-hlorformijata (854 μL, 7,60 mmol), trietilamina (1,75 mL, 12,4 mmol), jedinjenja **92** (1,55 g, 6,91 mmol) i benzena (18 mL). Prinos: 778 mg, 47%.

Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 138–140 °C. IR (ATR): 3167sr, 3062sr, 2960j, 2932sr, 2876sr, 1724j, 1598j, 1562j, 1449sr, 1447j, 1308sr, 1273j, 1244j, 1047sr, 962sl, 888sl, 805sr, 782sr, 755sr cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 12,01 (ps, 1H), 7,96 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,60 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,36 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8,4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,9 Hz, 1H), 4,15 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,94 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,70–1,63 (m, 2H), 1,61–1,54 (m, 2H), 0,98–0,92 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 159,54; 154,00; 147,74; 132,61; 130,49; 127,58; 121,82; 120,49; 67,28; 35,38; 21,99; 21,68; 13,09; 10,10. HRMS: *m/z* 311,08810 odgovara molekulknoj formuli C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sup>+</sup> (greška u ppm -0,47). HPLC čistoća, metoda D: t<sub>R</sub> = 11,532, površina 98,23%. Metoda C: t<sub>R</sub> = 13,159, površina 98,53%.

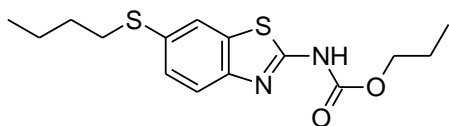
### Etil [6-(butilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbammat (101)



Jedinjenje **101** sintetiše se u dve faze. Prvi sintetički korak odvija po postupku K korišćenjem rastvora broma (90 μL, 1,8 mmol) u glac. AcOH (1 mL), 4-(butiltio)anilina **87** (253,9 mg, 1,400 mmol), NH<sub>4</sub>SCN (426 mg, 5,60 mmol), glac. AcOH (4 mL) i vode (0,15 mL). Druga reakciona faza odvija se po postupku L korišćenjem rastvora sirovog proizvoda prve faze u benzenu (5 mL), etil-hlorformijata (147 μL, 1,54 mmol) i trietilamina (351 μL, 2,52 mmol). Posle prečišćavanja hromatografijom na stubu, konačni proizvod se dobija kristalizacijom iz benzena. Prinos: 83,2 mg, 19%. Bledožuta

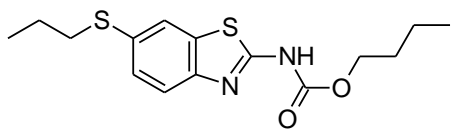
čvrsta supstanca, t. t. 138–140 °C. IR (ATR): 3139sr, 3072j, 2983j, 2954j, 2931j, 2865j, 2794j, 1724j, 1603j, 1570j, 1452j, 1366sr, 1340sr, 1313sr, 1293j, 1274j, 1250j, 1113sr, 1070sr, 1048sr, 1022sr, 816j, 781sr, 760j, 708sr cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 11,90 (ps, 1H), 7,86 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,78 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,40 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8,4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,8 Hz, 1H), 4,41 (q, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,96 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,67–1,61 (m, 2H), 1,50–1,41 (m, 5H), 0,93 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, δ): 161,39; 153,81; 147,21; 132,40; 131,82; 128,33; 122,21; 120,81; 62,88; 34,73; 31,28; 21,89; 14,46; 13,63. HRMS: *m/z* 311,08801 odgovara molekulknoj formuli C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sup>+</sup> (greška u ppm -0,76). HPLC čistoća, metoda D: t<sub>R</sub> = 9,757, površina 97,08%. Metoda C: t<sub>R</sub> = 11,594, površina 96,14%.

### Propil [6-(butilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbamat (102)



Jedinjenje **102** sintetiše se po postupku L korišćenjem jedinjenja **93** (1,37 g, 5,77 mmol) propil-hlorformijata (713 μL, 6,34 mmol), trietilamina (1,45 mL, 10,4 mmol) i benzena (29 mL). Prinos: 543 mg, 29%. Žuta čvrsta supstanca, t. t. 130 °C. IR (ATR): 3169sr, 3068sr, 2960j, 2926j, 2785sr, 1725j, 1601sr, 1564sr, 1451sr, 1288sr, 1247sr, 1070sl, 818sl, 752sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 11,35 (ps, 1H), 7,82 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,78 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H), 7,40 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8,5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,8 Hz, 1H), 4,30 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,96 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,84–1,77 (m, 2H), 1,67–1,61 (m, 2H), 1,50–1,42 (m, 2H), 0,99 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H), 0,92 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 161,06; 153,80; 147,35; 132,54; 131,83; 128,42; 122,29; 120,83; 68,53; 34,77; 31,31; 22,14; 21,91; 13,65; 10,32. HRMS: *m/z* 325,10408 odgovara molekulknoj formuli C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sup>+</sup> (greška u ppm +0,56). HPLC čistoća, metoda D: t<sub>R</sub> = 10,371, površina 96,76%. Metoda C: t<sub>R</sub> = 12,388, površina 98,58%.

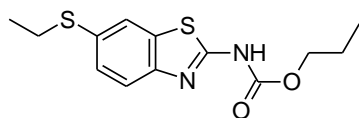
### Butil [6-(propilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbamat (103)



Jedinjenje **103** sintetiše se u dve faze. Prvi sintetički korak odvija po postupku K korišćenjem rastvora broma (94 μL, 1,8 mmol) u glac. AcOH (1 mL), 4-(propiltio)anilin-hidrohlorida (300 mg, 1,47 mmol), NH<sub>4</sub>SCN (448 mg, 5,88 mmol), glac. AcOH (4 mL) i vode (0,15mL). Druga reakciona faza odvija se po postupku L korišćenjem rastvora sirovog proizvoda prve faze u benzenu (5 mL), butil-hlorformijata

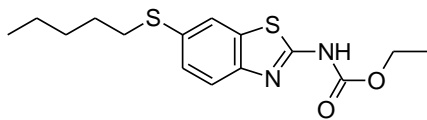
(205  $\mu\text{L}$ , 1,61 mmol) i trietilamina (369  $\mu\text{L}$ , 2,65 mmol). Posle prečišćavanja hromatografijom na stubu, konačni proizvod se dobija kristalizacijom iz benzena. Prinos: 133 mg, 28%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 74–80 °C. IR (ATR): 3170sr, 3070sr, 2961j, 2931j, 2872sr, 1721j, 1602j, 1562j, 1456sr, 1293j, 1248j, 1074sl, 814sl, 762sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 7,94 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 7,60 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 7,35 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 4,19 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 2,94 (t,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 1,65–1,53 (m, 4H), 1,41–1,35 (m, 2H), 0,95 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H), 0,91 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 159,60; 154,04; 147,74; 132,63; 130,53; 127,60; 121,84; 120,51; 65,59; 35,43; 30,34; 22,02; 18,50; 13,55; 13,11. HRMS:  $m/z$  325,10391 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm +0,05). HPLC čistoća, metoda D:  $t_R = 10,346$ , površina 99,78%. Metoda C:  $t_R = 11,916$ , površina 99,36%.

#### Propil [6-(etilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbamat (104)



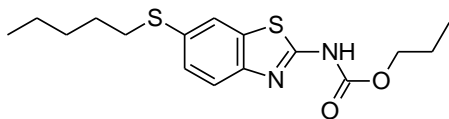
Jedinjenje **104** sintetiše se u dve faze. Prvi sintetički korak odvija po postupku K korišćenjem rastvora broma (101  $\mu\text{L}$ , 1,80 mmol) u glac. AcOH (1 mL), 4-(propiltio)anilin-hidrohlorida (300 mg, 1,58 mmol),  $\text{NH}_4\text{SCN}$  (481 mg, 6,32 mmol), glac. AcOH (4 mL) i voda (0,15mL). Druga reakciona faza odvija se po postupku L korišćenjem rastvora sirovog proizvoda prve faze u benzenu (7 mL), propil-hlorformijata (195  $\mu\text{L}$ , 1,73 mmol) i trietilamina (396  $\mu\text{L}$ , 2,84 mmol). Posle prečišćavanja hromatografijom na stubu (dry-flash), proizvod je prečišćen i flash hromatografijom (Biotage SP, RP kolona, eluent MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ ). Prinos: 125 mg, 27%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 137–138 °C. IR (ATR): 3062sr, 2968j, 2922j, 1717j, 1600sr, 1562sr, 1445sr, 1396sr, 1287sr, 1248sr, 1072sl, 1044sl, 759sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 12,01 (ps, 1H), 7,95 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,61 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,36 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 4,15 (t,  $J = 6,8$  Hz, 1H), 2,98 (q,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,70–1,63 (m, 2H), 1,22 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H), 0,93 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 160,13; 154,54; 148,24; 133,06; 130,67; 128,02; 122,27; 120,93; 67,73; 27,93; 22,12; 14,74; 10,56. HRMS:  $m/z$  297,07243 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm –0,57). HPLC čistoća, metoda C:  $t_R = 12,996$ , površina 95,61%. Metoda H:  $t_R = 14,178$ , površina 95,09%.

### Etil [6-(pentilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbamat (105)



Jedinjenje **105** sintetiše se po postupku L korišćenjem jedinjenja **89** (188 mg, 0,745 mmol), etil-hlorformijata (78  $\mu\text{L}$ , 0,82 mmol), trietilamina (186  $\mu\text{L}$ , 1,33 mmol) i benzena (4 mL). Prinos: 51,4 mg, 21%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 137–138 °C. IR (ATR): 3175sr, 3152sr, 3123sr, 3058sr, 2956j, 2924j, 2854j, 1724j, 1597j, 1550j, 1460j, 1370sr, 1296j, 1241j, 1069sr, 818sr, 766sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 11,60 (ps, 1H), 7,84 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,78 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 7,40 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz, 1H), 4,40 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 2,95 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 1,69–1,63 (m, 2H), 1,45–1,39 (m, 5H), 1,37–1,29 (m, 2H), 0,89 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 161,19; 153,75; 147,25; 132,47; 131,85; 128,37; 122,22; 120,82; 62,90; 35,01; 30,93; 28,88; 22,23; 14,46; 13,94. HRMS:  $m/z$  325,10435 odgovara molekulskoj formuli  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm +1,40). HPLC čistoća, metoda D:  $t_{\text{R}} = 12,206$ , površina 98,52%. Metoda E:  $t_{\text{R}} = 4,563$ , površina 98,28%.

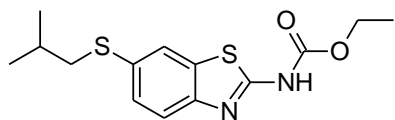
### Propil [6-(pentilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbamat (106)



Jedinjenje **106** sintetiše se po postupku L korišćenjem jedinjenja **89** (188 mg, 0,745 mmol), propil-hlorformijata (92  $\mu\text{L}$ , 0,82 mmol), trietilamina (186  $\mu\text{L}$ , 1,33 mmol) i benzena (4 mL). Prinos: 101,4 mg, 40%. Žuta čvrsta supstanca, t. t. 116 – 118 °C. IR (ATR): 3166sr, 3131sr, 3061sr, 2955j, 2927j, 2873j, 1724j, 1599j, 1561j, 1450sr, 1378sr, 1337sl, 1308sr, 1274j, 1245j, 1109sl, 1069sr, 973sl, 894sl, 818sr, 778sr, 753sr, 714sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 11,72 (ps, 1H), 7,84 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 7,78 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 7,40 (dd,  $J_1 = 8,4$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 4,30 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 2,94 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,84–1,77 (m, 2H), 1,69–1,63 (m, 2H), 1,45–1,39 (m, 2H), 1,36–1,29 (m, 2H), 0,99 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H), 0,89 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 161,31; 153,88; 147,26; 132,43; 131,80; 128,37; 122,23; 120,77; 68,50; 35,03; 30,92; 28,87; 22,22; 22,11; 13,93; 10,30. HRMS:  $m/z$  339,12006 odgovara molekulskoj formuli  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm +1,51). HPLC čistoća, metoda D:  $t_{\text{R}} = 13,079$ , površina 96,82%. Metoda C:  $t_{\text{R}} = 14,812$ , površina 95,51%.

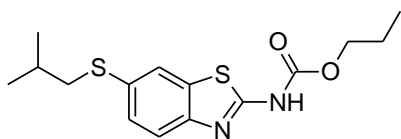


### Etil {6-[(2-metilpropil)sulfanil]-1,3-benzotiazol-2-il}karbamat (107)



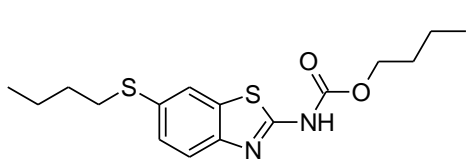
Jedinjenje **107** sintetiše se po postupku L korišćenjem jedinjenja **88** (77 mg, 0,32 mmol), etil-hlorformijata (34  $\mu\text{L}$ , 0,36 mmol), trietilamina (82  $\mu\text{L}$ , 0,58 mmol) i benzena (1,8 mL). Prinos: 19,1 g, 23%. Bela čvrsta supstanca, t. t. 159 – 160 °C. IR (ATR): 3139sr, 3081sr, 2968j, 2914j, 2866sr, 1722j, 1599j, 1560j, 1458sr, 1275j, 1246j, 1111sr, 1070sr, 1049sr, 1019sr, 820sr, 789sr, 762sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 11,47 (ps, 1H), 7,84 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,77 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 7,40 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 4,41 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 2,85 (d,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 1,88 (sep,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 1,42 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H), 1,05 (d,  $J = 6,6$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 161,25; 153,77; 147,18; 132,44; 132,27; 128,30; 122,13; 62,88; 44,10; 28,32; 22,01; 14,46. HRMS:  $m/z$  311,08796 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm -0,92). HPLC čistoća, metoda B:  $t_{\text{R}} = 12,189$ , površina 99,00%. Metoda I:  $t_{\text{R}} = 13,873$ , površina 99,59%.

### Propil {6-[(2-metilpropil)sulfanil]-1,3-benzotiazol-2-il}karbamat (108)



Jedinjenje **108** sintetiše se po postupku L korišćenjem jedinjenja **88** (63,9 mg, 0,268 mmol), propil-hlorformijata (33  $\mu\text{L}$ , 0,29 mmol), trietilamina (67  $\mu\text{L}$ , 0,29 mmol) i benzena (1,5 mL). Prinos: 53,7 mg, 62%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 139–141 °C. IR (ATR): 3172sr, 3131sr, 3074sr, 2919j, 2852sr, 1722j, 1599sr, 1565sr, 1456sr, 1282j, 1245j, 1074sr, 818sr, 760sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 11,60–11,58 (m, 1H), 7,83 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 7,77 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 7,40 (dd,  $J_1 = 8,4$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 4,30 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 2,85 (d,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 1,91–1,77 (m, 3H), 1,05 (d,  $J = 6,6$  Hz, 6H), 0,99 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 161,18; 153,85; 147,23; 132,47; 132,25; 128,33; 122,16; 120,79; 68,49; 44,11; 28,31; 22,00; 10,30. HRMS:  $m/z$  325,10387 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm -0,08). HPLC čistoća, metoda B:  $t_{\text{R}} = 12,787$ , površina 98,08%. Metoda I:  $t_{\text{R}} = 14,618$ , površina 99,74%.

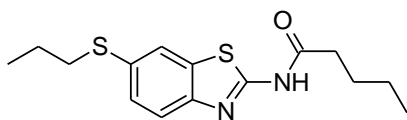
### Butil [6-(butilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbamat (109)



Jedinjenje **109** sintetise se po postupku L korišćenjem jedinjenja **93** (293,7 mg, 1,232 mmol), butil-hlorformijata (175  $\mu$ L, 1,35 mmol), trietilamina (309  $\mu$ L, 2,21 mmol) i benzena (5 mL).

Prinos: 131 mg, 32%. Žuta čvrsta supstanca, t. t. 120–121 °C. IR (ATR): 3143sr, 3077sr, 2953j, 2928j, 2866sr, 1727j, 1598j, 1452sr, 1276sr, 1246sr, 1108sl, 1074sl, 820sr, 782sl, 756sr  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 11,64–11,41 (m, 1H), 7,84–7,81 (m, 1H), 7,78 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H), 7,40 (dd,  $J_1 = 8,6$  Hz,  $J_2 = 1,7$  Hz, 1H), 4,35 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 2,96 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,79–1,73 (m, 2H), 1,67–1,61 (m, 2H), 1,50–1,38 (m, 4H), 0,97–0,91 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 161,50; 153,95; 147,22; 132,39; 131,77; 128,33; 122,25; 120,76; 66,76; 34,75; 31,28; 30,76; 21,88; 18,99; 13,66. HRMS:  $m/z$  339,12048 odgovara molekulskoj formuli  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm +2,77). HPLC čistoća, metoda B:  $t_R = 12,749$ , površina 95,92%. Metoda I:  $t_R = 14,577$ , površina 98,25%.

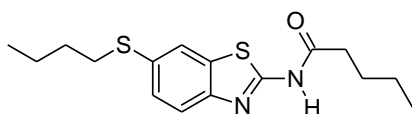
### N-[6-(propilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]pentanamid (110)



Jedinjenje **110** sintetise se po postupku M korišćenjem rastvora pentanoil-hlorida (87,2 mg, 0,723 mmol) u benzenu (1,5 mL) i rastvora jedinjenja **92** (124,8 mg,

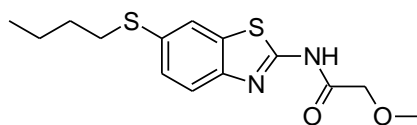
0,556 mmol) u smeši rastvarača  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /benzen (2 mL, 1 : 1, v/v). Reakciona smeša se meša četiri sata. Sirovi proizvod prečisti se hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$ , eluent heksan/EtOAc i flash, Biotage SP, RP kolona, eluent MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ ). Prinos: 35,3 mg, 21%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 113 °C. IR (ATR): 3276sr, 3178sr, 3128sr, 3064sr, 2960j, 2930sr, 2870sr, 1660j, 1594j, 1538j, 1439sr, 1374sl, 1345sr, 1295sr, 1266sr, 1192sl, 1087sl, 815sl, 774sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 10,66 (ps, 1H), 7,81 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 7,65 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,44 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 2,94 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 2,46 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 1,73–1,66 (m, 4H), 1,37–1,30 (m, 2H), 1,04 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H), 0,88 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 171,64; 158,91; 146,43; 132,89; 132,38; 128,68; 122,46; 120,58; 36,91; 36,26; 26,97; 22,54; 22,19; 13,64; 13,38. HRMS:  $m/z$  309,10813 odgovara molekulskoj formuli  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm –2,76). HPLC čistoća, metoda D:  $t_R = 11,671$ , površina 97,05%. Metoda C:  $t_R = 13,245$ , površina 98,01%.

### ***N*-[6-(butilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]pentanamid (111)**



Jedinjenje **111** sintetise se po postupku M korišćenjem rastvora pentanoil-hlorida (69,6 mg, 0,58 mmol) u benzenu (1 mL) i rastvora jedinjenja **93** (86 mg, 0,36 mmol) u smeši rastvarača CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/benzen (2,2 mL, 1 : 1, v/v). Smeša se meša tri sata na 0 °C i 13 sati na sobnoj temperaturi. Posle obrade, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, heksan/EtOAc i flash, Biotage SP, RP kolona, eluent MeOH/H<sub>2</sub>O). Prinos: 32,6 mg, 28%. Bela čvrsta supstanca, t. t. 117 °C. IR (ATR): 3144sr, 3116sr, 3036sr, 2958j, 2927j, 2870j, 1694j, 1590j, 1542j, 1443sr, 1380sr, 1349sr, 1306sl, 1269j, 1172sr, 1099sl, 1052sl, 976sl, 892sl, 810sr, 769sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 10,15 (ps, 1H), 7,80 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H), 7,65 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,43 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8,5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,8 Hz, 1H), 2,98–2,95 (m, 2H), 2,49–2,46 (m, 2H), 1,74–1,68 (m, 2H), 1,67–1,61 (m, 2H), 1,50–1,34 (m, 4H), 0,94–0,89 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 171,61; 158,86; 146,39; 132,87; 132,45; 128,53; 122,31; 120,55; 36,22; 34,53; 31,21; 26,94; 22,16; 21,86; 13,61; 13,59. HRMS: *m/z* 323,12407 odgovara molekulskoj formuli C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>OS<sub>2</sub>H<sup>+</sup> (greška u ppm –1,73). HPLC čistoća, metoda D: t<sub>R</sub> = 12,200, površina 96,72%. Metoda C: t<sub>R</sub> = 13,409, površina 98,18%.

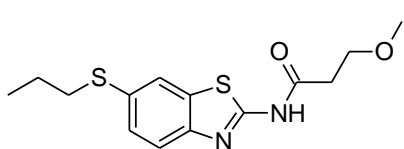
### ***N*-[6-(butilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]-2-metoksiacetamid (112)**



Jedinjenje **112** sintetise se po postupku M korišćenjem metoksiacetil-hlorida (51,5 mg, 0,474 mmol) u benzenu (1 mL) i rastvora jedinjenja **93** (70,7 mg, 0,296 mmol) u smeši rastvarača CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/benzen (2,2 mL, 1 : 1, v/v). Smeša se meša četiri sata na 0 °C i 13 sati na sobnoj temperaturi. Sirovi proizvod prečisti se hromatografijom na stubu (dry-flash, SiO<sub>2</sub>, heksan/EtOAc). Prinos: 41,3 mg, 45%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 62 °C. IR (ATR): 3382sr, 3207sl, 2956sr, 2929sr, 2871sl, 1703sr, 1594sr, 1537j, 1448sr, 1272sr, 1196sl, 1119sr, 994sl, 817sl, 745sl cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 9,86 (ps, 1H), 7,79–7,78 (m, 1H), 7,68 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,43 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8,5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1,8 Hz, 1H), 4,16 (s, 2H), 3,52 (s, 3H), 2,97–2,94 (m, 2H), 1,67–1,61 (m, 2H), 1,49–1,42 (m, 2H), 0,92 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 168,07; 156,52; 146,85; 133,03; 132,65; 128,58; 122,18; 121,26; 71,25; 59,57; 34,55; 31,24; 21,89; 13,61. HRMS: *m/z* 311,08743 odgovara molekulskoj formuli

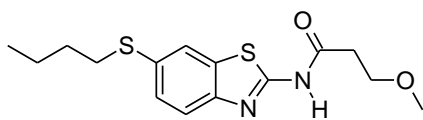
$C_{14}H_{18}N_2O_2S_2H^+$  (greška u ppm  $-2,62$ ). HPLC čistoća, metoda D:  $t_R = 10,999$ , površina 98,02%. Metoda C:  $t_R = 12,336$ , površina 98,37%.

### 3-Metoksi-N-[6-(propilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]propanamid (113)



Jedinjenje **113** sintetise se po postupku M korišćenjem rastvora 3-metoksipropionil-hlorida (106 mg, 0,869 mmol) u benzenu (1,5 mL) i rastvora jedinjenja **92** (150 mg, 0,67 mmol) u smeši rastvarača  $CH_2Cl_2$ /benzen (2 mL, 1 : 1, v/v). Reakciona smeša se meša 18 sati. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $SiO_2$ , eluent heksan/EtOAc, flash, Biotage SP, RP kolona, eluent EtOH/ $H_2O$  i NH kolona, eluent heksan/EtOAc). Prinos: 63,2 mg, 30%. Bela čvrsta supstanca, t. t.  $111\text{ }^\circ C$ . IR (ATR): 3270sl, 3118sr, 3038sr, 2962j, 2922j, 2811sr, 1704sr, 1591j, 1544j, 1447sr, 1394sr, 1270j, 1174sr, 1120sr, 1067sr, 810sr  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 10,26 (ps, 1H), 7,79 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,69 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,43 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, 1H), 3,76 (t,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 3,48 (s, 1H), 2,93 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 2,77 (t,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 1,71–1,64 (m, 2H), 1,03 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 169,86; 157,57; 146,97; 133,08; 132,12; 128,67; 122,39; 121,02; 67,67; 59,20; 36,96; 36,90; 22,56; 13,37. HRMS:  $m/z$  311,08741 odgovara molekulskoj formuli  $C_{14}H_{18}N_2O_2S_2H^+$  (greška u ppm  $-2,67$ ). HPLC čistoća, metoda D:  $t_R = 10,325$ , površina 98,09%. Metoda C:  $t_R = 11,326$ , površina 99,00%.

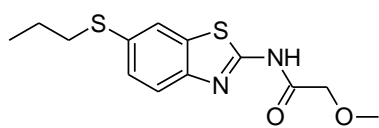
### N-[6-(butilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]-3-metoksipropanamid (114)



Jedinjenje **114** sintetise se po postupku M korišćenjem rastvora 3-metoksipropionil-hlorida (163,8 mg, 1,342 mmol) u benzenu (2 mL) i rastvora jedinjenja **93** (200 mg, 0,839 mmol) u smeši rastvarača  $CH_2Cl_2$ /benzen (4,4 mL, 1 : 1, v/v). Reakciona smeša se meša šest sati na  $0\text{ }^\circ C$  i 16 sati na sobnoj temperaturi. Posle obrade, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $SiO_2$ , eluent heksan/EtOAc i višestrukou flash hromatografijom, Biotage SP, RP kolona, eluent MeOH/ $H_2O$ ). Prinos: 86,9 mg, 32%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t.  $99\text{ }^\circ C$ . IR (ATR): 3147j, 3046sr, 2953j, 2924j, 2875j, 2814sr, 1703j, 1592j, 1536j, 1451sr, 1417sr, 1395sr, 1332sr, 1267j, 1160j, 1116j, 1068sr, 988sl, 960sr, 808sr, 793sr, 757sr  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 10,33 (ps, 1H), 7,78 (d,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 7,69 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,42 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz,

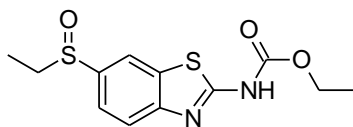
1H), 3,77–3,74 (m, 2H), 3,47 (s, 3H), 2,97–2,94 (m, 2H), 2,78–2,75 (m, 2H), 1,67–1,61 (m, 2H), 1,50–1,42 (m, 2H), 0,92 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 169,88; 157,62; 146,90; 133,07; 132,24; 128,55; 122,24; 121,00; 67,67; 59,18; 36,90; 34,60; 31,26; 21,89; 13,62. HRMS:  $m/z$  325,10332 odgovara molekulkov formuli  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm  $-1,77$ ). HPLC čistoća, metoda D:  $t_R = 10,636$ , površina 96,78%. Metoda C:  $t_R = 12,682$ , površina 98,30%.

## 2-Metoksi-*N*-[6-(propilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]acetamid (115)



Jedinjenje **115** sintetiše se po postupku M korišćenjem rastvora metoksiacetil-hlorida (60,9 mg, 0,561 mmol) u benzenu (1 mL) i rastvora jedinjenja **92** (96,8 mg, 0,431 mmol) u smeši rastvarača  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /benzen (2 mL, 1 : 1, v/v). Reakciona smeša se meša dva sata na 0 °C. Posle obrade, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$ , eluent heksan/EtOAc). Prinos: 28,9 mg, 23%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 62 °C. IR (ATR): 3170sr, 3062sr, 2966sr, 2938sr, 2829sl, 1688sr, 1590sr, 1534j, 1453sr, 1273j, 1197sr, 1119sr, 992sl, 809sl, 772sl, 744sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 9,80 (ps, 1H), 7,79 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1H), 7,69 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,44 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,4$  Hz, 1H), 4,16 (s, 2H), 3,52 (s, 3H), 2,93 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,71–1,64 (m, 2H), 1,03 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 168,01; 156,40; 146,99; 133,09; 132,48; 128,67; 122,32; 121,32; 71,22; 59,54; 36,90; 22,53; 13,35. HRMS:  $m/z$  297,07173 odgovara molekulkov formuli  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm  $-2,91$ ). HPLC čistoća, metoda D:  $t_R = 10,423$ , površina 97,81%. Metoda C:  $t_R = 11,602$ , površina 98,30%.

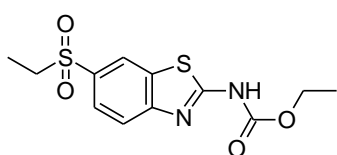
## Etil [6-(etansulfanil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbammat (116)



Jedinjenje **116** sintetiše se po postupku N korišćenjem jedinjenja **97** (42,5 mg, 0,151 mmol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) i mCPBA (26,0 mg, 0,151 mmol). Smeša se meša četiri sata na sobnoj temperaturi u mraku. Posle obrade, sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (flash, Biotage SP, RP kolona, eluent MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ ). Prinos: 12,6 mg, 28%. Bela čvrsta supstanca, t. t. 195 °C. IR (ATR): 3359sr, 3175sr, 3056sr, 2924j, 2853j, 1713j, 1658sr, 1634sr, 1602j, 1564j, 1448sr, 1366sr, 1301j, 1276sr, 1250j, 1103sr, 1072sr, 1044sr, 891sl, 827sl, 794sr, 761sr, 708sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 10,94 (ps,

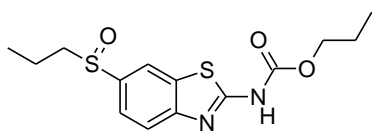
1H), 8,13 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1H), 8,02 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,59 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz, 1H), 4,43 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 3,00–2,93 (m, 1H), 2,88–2,81 (m, 1H), 1,43 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H), 1,23 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 163,04; 153,58; 150,90; 138,24; 132,77; 121,84; 121,18; 117,98; 63,26; 50,76; 14,47; 6,14. HRMS:  $m/z$  299,05162 odgovara molekulkovoj formuli  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm  $-0,81$ ). HPLC čistoća, metoda E:  $t_{\text{R}} = 4,087$ , površina 95,52%. Metoda F:  $t_{\text{R}} = 4,668$ , površina 95,14%.

#### Etil [6-(etansulfonil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbamat (117)



Jedinjenje **117** sintetiše se po postupku N korišćenjem jedinjenja **97** (50 mg, 0,2 mmol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) i mCPBA (122 mg, 0,707 mmol). Smeša se meša 16 sati na sobnoj temperaturi. Prinos: 30,5 mg, 55%. Bledožuta čvrsta supstanca, t. t. 257–259 °C. IR (ATR): 3121sr, 3072sl, 2979sr, 2944sr, 2775sl, 1721j, 1602sr, 1556j, 1450sr, 1307j, 1254sr, 1150j, 1103sl, 1044sl, 1018sl, 830sl, 786sl, 757sl, 715sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 12,37 (ps, 1H), 8,58 (d,  $J = 0,9$  Hz, 1H), 7,89–7,85 (m, 2H), 4,28 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 3,31–3,28 (m, 2H), 1,30 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H), 1,12 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ,  $\delta$ ): 163,77; 153,80; 152,94; 132,42; 132,16; 125,29; 122,37; 120,27; 62,05; 49,76; 14,12; 7,18. HRMS:  $m/z$  315,04662 odgovara molekulkovoj formuli  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm  $-0,48$ ). HPLC čistoća, metoda E:  $t_{\text{R}} = 4,187$ , površina 95,46%. Metoda F:  $t_{\text{R}} = 4,662$ , površina 95,51%.

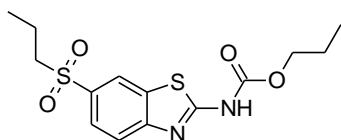
#### Propil [6-(propan-1-sulfinil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbamat (118)



Jedinjenje **118** sintetiše se po postupku O korišćenjem jedinjenja **100** (30,3 mg, 0,098 mmol), metanola (0,5 mL), acetonitrila (8  $\mu\text{L}$ , 0,1 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (10 mg, 0,07 mmol) i rastvora 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (12  $\mu\text{L}$ , 0,12 mmol) u metanolu (0,5 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $\text{SiO}_2$ , eluent heksan/EtOAc). Prinos: 8,4 mg, 26%. Bela čvrsta supstanca. IR (ATR): 3165sr, 3127sr, 3057sr, 2964j, 2933j, 2876j, 2780sr, 1724j, 1601j, 1557j, 1449j, 1404sr, 1292j, 1274j, 1249j, 1066j, 1032sr, 966sr, 890sr, 829sr, 784sr, 754sr, 708sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 12,21 (ps, N-H), 8,28–8,26 (m, 1H), 7,84–7,83 (m, 1H), 7,66–7,64 (m, 1H), 4,17 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 2,95–2,77 (m, 2H), 1,70–1,47 (m, 4H), 0,97–0,92 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ): 161,76; 154,08; 151,19; 138,54; 132,39; 121,86; 120,73; 118,13; 67,47; 57,75; 21,63; 15,32;

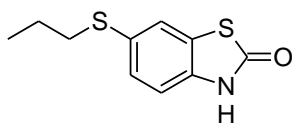
12,91; 10,09. HRMS:  $m/z$  327,08293 odgovara molekulknoj formuli  $C_{14}H_{18}N_2O_3S_2H^+$  (greška u ppm  $-0,72$ ). HPLC čistoća, metoda G:  $t_R = 5,365$ , površina 97,49%. Metoda A:  $t_R = 3,559$ , površina 96,03%.

### Propil [6-(propan-1-sulfonil)-1,3-benzotiazol-2-il]karbamat (119)



Jedinjenje **119** sintetiše se po postupku O korišćenjem jedinjenja **100** (42,2 mg, 0,136 mmol), metanola (0,5 mL), acetonitrila (10  $\mu$ L, 0,2 mmol),  $K_2CO_3$  (13 mg, 0,095 mmol) i rastvora 30%  $H_2O_2$  (54  $\mu$ L, 0,54 mmol) u metanolu (0,5 mL). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $SiO_2$ , eluent heksan/EtOAc i flash, Biotage SP, RP kolona, eluent MeOH/ $H_2O$ ). Prinos: 22,5 mg, 48%. Bela čvrsta supstanca, t. t. 270  $^{\circ}C$ . IR (ATR): 3169sr, 3125sr, 2971j, 2936sr, 2880sr, 2771sl, 1730j, 1598sr, 1550j, 1454sr, 1405sl, 1346sl, 1306j, 1279j, 1231j, 1147j, 1103sr, 1072sr, 942sl, 825sl, 784sr, 757sr, 710sl  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$ ): 12,37 (ps, N-H), 8,57–8,56 (m, 2H), 7,88–7,84 (m, 2H), 4,18 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 3,30–3,26 (m, 2H), 1,72–1,66 (m, 2H), 1,60–1,53 (m, 2H), 0,96–0,89 (m, 6H).  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ ,  $\delta$ ): 164,40; 154,55; 153,40; 133,75; 132,65; 125,91; 123,03; 120,99; 68,09; 57,20; 22,11; 16,76; 12,99; 10,57. HRMS:  $m/z$  343,07768 odgovara molekulknoj formuli  $C_{14}H_{18}N_2O_4S_2H^+$  (greška u ppm  $-1,16$ ). HPLC čistoća, metoda G:  $t_R = 5,253$ , površina 98,21%. Metoda F:  $t_R = 5,480$ , površina 97,67%.

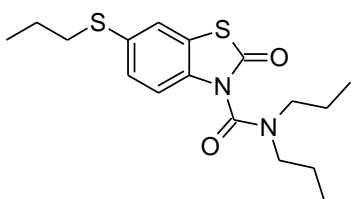
### 6-(propilsulfanil)-1,3-benzotiazol-2(3H)-on (120)



U rastvor 6-brom-2-benzotiazolona (250 mg, 1,09 mmol) u dioksanu (6 mL) doda se DIPEA (739  $\mu$ L, 4,34 mmol),  $Pd_2(dba)_3$  (49,7 mg, 0,0543 mmol), Xphos (50,8 mg, 0,109 mmol) i propantiol (99  $\mu$ L, 1,09 mmol) u atmosferi argona. Smeša se podvrgne mikrotalasnom ozračivanju dva sata na temperaturi 130 $^{\circ}C$  u Biotage Initiator 2.5 reaktoru. Ohlađena reakciona smeša se procedi i rastvarač ukloni pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na stubu (dry-flash,  $SiO_2$ , eluent heksan/EtOAc i flash, Biotage SP, RP kolona, eluent MeOH/ $H_2O$ ). Prinos: 90,5 mg, 37%. Čvrsta supstanca bele boje, t. t. 112–113  $^{\circ}C$ . IR (ATR): 3305sl, 3130sr, 3068sr, 3018sr, 2960sr, 2926sr, 2866sr, 2732sr, 1667j, 1472sr, 1432sr, 1385sr, 1275sr, 1233sr, 1211sr, 1099sl, 1052sl, 904sl, 816sr, 758sr, 710sl, 647sr, 566sl  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 10,02 (ps, 1H), 7,43 (d,

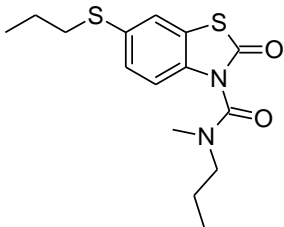
$J = 1,6, 1\text{H}$ ), 7,30 (dd,  $J_1 = 8,2, J_2 = 1,8, 1\text{H}$ ), 7,07 (d,  $J = 8,2, 1\text{H}$ ), 2,86 (t,  $J = 7,2, 2\text{H}$ ), 1,67–1,60 (m, 2H), 1,01 (t,  $J = 7,3, 3\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 172,66; 133,92; 131,15; 129,35; 124,68; 124,50; 112,02; 37,36; 22,53; 13,29. HRMS:  $m/z$  243,06166 odgovara molekulknoj formuli  $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NOS}_2 + \text{NH}_4]^+$  (greška u ppm  $-1,51$ ).

**2-okso-*N,N*-dipropil-6-(propilsulfanil)-1,3-benzotiazol-3(2*H*)-karboksamid (121)**



Jedinjenje **121** sintetiše se po postupku P korišćenjem jedinjenja **120** (20 mg, 0,088 mmol) u suvom THF (0,7 mL), *n*-BuLi (68  $\mu\text{L}$ , 0,088 mmol), rastvora trifozgena (26,1 mg, 0,088 mmol) u suvom THF (0,7 mL) i dipropilamina (30  $\mu\text{L}$ , 0,22 mmol). Prinos: 11,5 mg, 37%. Bezbojna uljasta supstanca. IR (ATR): 3380sl, 3062sl, 2963sr, 2933sr, 2874sr, 2734sl, 1724j, 1713j, 1702j, 1695j, 1691j, 1681j, 1586sl, 1566sr, 1513sl, 1470j, 1421j, 1382sr, 1343sr, 1323sr, 1291j, 1238sr, 1192j, 1146sr, 1100sr, 1067sl, 1009sl, 897sl, 877sl, 862sl, 804sr, 750sl, 725sl, 697sl, 673sr, 636sl, 582sl, 558sl, 516sl, 423sl, 413sl, 404sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 7,42 (d,  $J = 1,6, 1\text{H}$ ), 7,30 (dd,  $J_1 = 8,5, J_2 = 1,8, 1\text{H}$ ), 7,02 (d,  $J = 8,5, 1\text{H}$ ), 3,70–3,64 (m, 1H), 3,89–3,32 (m, 2H), 3,18–3,12 (m, 1H), 2,86 (t,  $J = 7,2, 2\text{H}$ ), 1,84–1,69 (m, 2H), 1,68–1,55 (m, 3H), 1,53–1,43 (m, 1H), 1,03–0,98 (m, 6H), 0,79 (t,  $J = 7,45, 3\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 167,29; 149,98; 133,52; 132,30; 129,07, 124,05; 123,72; 112,86; 50,76; 49,15; 37,05; 22,48; 21,75; 20,61; 13,28; 11,20. HRMS:  $m/z$  353,13588 odgovara molekulknoj formuli  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{H}^+$  (greška u ppm  $+1,94$ ). HPLC čistoća, metoda B:  $t_R = 12,261$ , površina 95,99%. Metoda I:  $t_R = 12,299$ , površina 97,46%

***N*-metil-2-okso-*N*-propil-6-(propilsulfanil)-1,3-benzotiazol-3(2*H*)-karboksamid (122)**



Jedinjenje **122** sintetiše se po postupku P korišćenjem rastvora **120** (19,8 mg, 0,087 mmol) u suvom THF (0,6 mL), *n*-BuLi (67  $\mu\text{L}$ , 0,087 mmol), rastvora trifozgena (25,8 mg, 0,087 mmol) u suvom THF (0,6 mL) i *N*-metilpropilamina (23  $\mu\text{L}$ , 0,22 mmol). Prinos: 17,5 mg, 61%. Bezbojna uljasta supstanca, smeša rotamera. IR (ATR): 2963sr, 2932sr, 2873sl, 1709j, 1584sl, 1567sl, 1469sr, 1399sr, 1323sl, 1292sr, 1270sl, 1233sl, 1191sr, 1149sl, 1086sl, 1065sl, 998sl, 888sl, 807sl, 649sl, 561sl  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): **Z rotamer:** 7,42 (d,  $J = 1,6, 1\text{H}$ ), 7,32–7,30



(m, 1H), 7,09 (d,  $J = 8,5$ , 1H), 3,61–3,55 (m, 1H), 3,52–3,47 (m, 1H), 3,02 (s, 3H), 2,88–2,85 (m, 2H), 1,79–1,72 (m, 2H), 1,68–1,61 (m, 2H), 1,04–0,99 (m, 6H). **E rotamer:** 7,42 (d,  $J = 1,6$ , 1H), 7,32–7,30 (m, 1H), 7,05 (d,  $J = 8,5$ , 1H), 3,40–3,34 (m, 1H), 3,24–3,32 (m, 1H), 3,17 (s, 3H), 2,88–2,85 (m, 2H), 1,68–1,61 (m, 3H), 1,58–1,50 (m, 1H), 1,04–0,99 (m, 3H), 0,80 (t,  $J = 7,5$ , 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): **Z rotamer:** 167,09; 150,16; 133,14; 132,39; 129,15; 124,13; 123,64; 113,17; 51,31; 37,11; 35,98; 22,49; 20,20; 13,28; 11,04. **E rotamer:** 167,37; 150,16; 133,44; 132,46; 129,08; 124,01; 123,64; 113,10; 52,70; 37,05; 34,69; 22,49; 21,08; 13,28; 11,02. (+)ESI-HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M} + \text{H}]^+$  325,10378 (greška u ppm  $-0,37$ ). HPLC čistoća, metoda B:  $t_{\text{R}} = 11,201$ , površina 96,27%. Metoda I:  $t_{\text{R}} = 11,426$ , površina 99,10%.

## Ekperimentalni postupci bioloških testova

### *In vitro* antimalarijska aktivnost jedinjenja u eritrocitnoj fazi razvoja parazita

Ekperimenti sa jedinjenjima **44**, **36** i **38** (MVNP001) izvedeni su u Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR), Silver Spring, USA, korišćenjem Malaria SYBR Green I–Based Fluorescence (MSF) eseja.<sup>219</sup> Ispitivanje aktivnosti zasniva se na određivanju količine malarijske DNK, detekcijom fluorescencije interkalirane boje SYBR Green I. Rezultujuća fluorescencija srazmerna je proliferaciji parazita. Korišćeni su sojevi *P. falciparum*: D6 (CDC, Sierre Leone), TM91C235 (WRAIR, Thailand) i W2 (CDC, Indochina). Jedinjenja su rastvorena u DMSO u opsegu od 0,5 ng/mL do 10000 ng/mL. Mikrotitar pločice su automatski popunjene primenom Tecan Freedom Evo liquid handling sistema (Tecan US, Inc., Durham, NC). Kao kontrolna jedinjenja korišćeni su **CQ** i **MFQ**. U bunarčice sa eksperimentalnim jedinjenjima dodati su paraziti *P. falciparum* sojeva u kasnoj formi prstenova ili ranoj fazi trofozoita (0,3% parazitemija, 2% hematokrit). Kultura je zatim inkubirana 72 sata na 37 °C u kontrolisanoj atmosferi (5%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$  i 90%  $\text{N}_2$ ). Nakon inkubacije dodat je lizirajući pufer, koji sadrži 20 mM Tris HCl, 5 mM EDTA, 1,6% Tritona X, 0,016% saponina i boju SYBR Green I. Pločice su inkubirane 24 sata na sobnoj temperaturi u mraku. Izmerena je relativna fluorescencija pomoću Tecan Genius Plus (Tecan US, Inc., Durham, NC). Izračunate su  $\text{IC}_{50}$  vrednosti korišćenjem GraphPad Prism programa (GraphPad Software Inc., SanDiego, CA) primenom jednačine nelinearne regresije.

Eksperimenti sa ostalim jedinjenjima izvedeni su na Univerzitetu u Milanu primenom LDH esaja.<sup>220</sup> Korišćeni su sojevi *P. falciparum*: D10 (CQ-osetljiv) i W2 (CQ-rezistentan). Sojevi parazita su kultivisani *in vitro* po postupku opisanom u literaturi.<sup>221</sup> Ukratko, paraziti su održavani u 5% hematokritu (humani eritrociti tipa A+) u RPMI 1640 medijumu sa dodatkom 10% inaktiviranog humanog seruma, 20 mM HEPES i 2 mM glutamina, na 37 °C u kontrolisanoj atmosferi (1–3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> i 92–94% N<sub>2</sub>). Ispitivana jedinjenja su rastvorena u DMSO i dodat je medijum do konačne koncentracije, (finalna koncentracija DMSO ne sme prelaziti 1%). Asinhrono kulture sa parazitom i 1% finalnim hematokritom su dodate u mikrotitar pločicu sa 96 oglednih mesta (COSTAR), zajedno sa serijom razblaženja testiranih jedinjenja i inkubirane 72 sata na 37 °C. Step en rasta parazita određen je spektrofotometrijski (OD<sub>650</sub>) merenjem aktivnosti parazitske laktat-dehidrogenaze (pLDH) prema postupku opisanom u literaturi<sup>220</sup> u kontrolnom uzorku i tretiranim uzorcima. Antimalarijska aktivnost je izražena kao koncentracija na kojoj jedinjenje inhibira 50% parazita (IC<sub>50</sub>). Prikazane su srednje vrednosti i standardne devijacije najmanje tri nezavisna eksperimenta izvedena u duplikatu.

### ***In vitro* antimalarijska aktivnost jedinjenja u gametocitnoj fazi**

Eksperimenti su izvedeni na Univerzitetu u Milanu, pod rukovodstvom prof. dr Taramelli. Gametociti su kultivisani po protokolu opisanom u literaturi.<sup>222</sup> Procenat gametocita u fazi V bio je veći od 90%, što je utvrđeno u Giemsa bojenim razmazima. Koristi se transgenski soj *P. falciparum* 3D7-CBG99 sa eksprimovanom CBG99 luciferazom. Meru vijabilnosti gametocita predstavlja aktivnost luciferaze.<sup>223,224</sup> Kao pozitivna kontrola koristi se metilensko plavo. Izračunate su IC<sub>50</sub> vrednosti primenom jednačine nelinearne regresije korišćenjem programa Software Gen5 1.10, Synergy4 plate reader, Biotek.

### **Ispitivanje sposobnosti inhibicije nastajanja β-hematina (BHIA-esej)**

Sposobnost jedinjenja da inhibiraju formiranje β-hematina ispitano je po postupku koji su razvili Taramelli i saradnici.<sup>225</sup> U ependorf-tube od 1,5 mL u kojima se nalazi po 50 μL 16 mM rastvora hemina u DMSO, dodat je 80 mM rastvor jedinjenja u DMSO u opsegu 0,125–5 molskih ekvivalenata. Umesto jedinjenja, u kontrolne uzorke je dodat čist DMSO. Zatim je u svaku tubu dodato 100 μL vode (prečišćene na TKA Germany

MicroPure sistemu za prečišćavanje vode, 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Inicirano je formiranje  $\beta$ -hematina dodatkom 200  $\mu\text{L}$  8 M acetatnog pufera ( $\text{pH} = 5,2$ ). Koncentracija DMSO je bila 25%. Uzorci su termostatorani 18 sati na 37  $^{\circ}\text{C}$ , a zatim centrifugirani. Nakon centrifugiranja, talog je resuspendovan u DMSO, da bi se odstranio neizreagovani hematin. Posle ponovnog centrifugiranja, supernatant je odbačen, a talog je rastvoren u 1 mL 0,1 M NaOH. Alikvoti rastvora od 10  $\mu\text{L}$  preneti su u bunarčice mikrotitar ploče. Svaki bunarčić je dopunjen sa 190  $\mu\text{L}$  0,1 M NaOH. Kontrolni bunarčići sadržali su 200  $\mu\text{L}$  0,1 M NaOH. Izmerena je apsorbancija na 405 nm, sa korekcijom na 670 nm. Konstruisana je kalibraciona kriva iz rastvora hemina u 0,1 M NaOH u opsegu 0,4 – 4,0  $\times 10^{-5}$  M.

### **Ispitivanje antimalarijske aktivnosti jedinjenja u fazi jetre**

Antimalarijska aktivnost jedinjenja u fazi jetre ispitana je na Institutu za molekularnu medicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Lisabonu, Portugalija. Eksperiment je zasnovan na merenju intenziteta luminescencije ćelijske linije humanog hepatoma Huh7, inficirane sporozoitima luciferaza-ekspimirajućeg *P. berghei* ANKA soja.<sup>226,227</sup> Ukratko, Huh7 ćelije su uzgajane u 1640 RPMI medijumu, koji sadrži 10% (v/v) fetalnog goveđeg seruma, 1% (v/v) neesencijalnih aminokiselina, 1% (v/v) penicilin/streptomicina, 1% (v/v) glutamina i 10 mM 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonsku kiselinu (HEPES), na 37  $^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7$ , sa 5%  $\text{CO}_2$ . Huh7 ćelije su zasejane na mikrotitar ploči sa 96 bunarčića ( $1 \times 10^{-4}$  ćelija po oglednom mestu) dan pre tretiranja eksperimentalnim jedinjenjima i infekcije. Medijum u kome su gajene ćelije je zamenjen medijumom, koji sadrži odgovarajuću koncentraciju eksperimentalnih jedinjenja, približno jedan sat pre infekcije sporozoitima. Sporozoiti su sveže izolovani iz pljuvačnih žlezda inficiranih ženki komarca *Anopheles stephensi*. Po dodatku sporozoitima, centrifugirano je 5 minuta na 1700g. Nivo parazitemije meren je 48 sati posle infekcije bioluminescentnim esejem (Biotum). Paralelno, praćena je konfluentnost Huh-7 ćelija kao mera relativne hepatotoksičnosti ispitivanih jedinjenja primenom AlamarBlue eseja (Invitrogen, UK) prema protokolu proizvođača.  $\text{IC}_{50}$  vrednost jedinjenja predstavlja srednju vrednost dva nezavisna eksperimenta.

### **Ispitivanje toksičnosti jedinjenja u *in vivo* uslovima (model miša)**

Ogledi ispitivanja toksičnosti na miševima izvedeni su u Centru izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima Instituta za medicinska istraživanja, uz dozvolu Etičkog saveta za rad sa eksperimentalnim životinjama (rešenja Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine br. 323-07-02444/2014-05/1 i br. 323-07-01211/2015-0511). Korišćene su zdrave ženke C57B1/6 miševa, koje su uzgajane u vivarijumu Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Na početku eksperimenta, telesna masa miševa je bila 19–21 g. Miševi su držani u odgovarajućim kavezima u grupama od pet jedinki, izlagani prirodnoj svetlosti, uz uzimanje hrane i vode *ad libitum*. Jedinjenja su u dozi 160 mg/kg administrirana oralno (u vidu suspenzije 0,5% HEC/0,1% Tween 80 u vodi). Dva puta dnevno je praćeno ponašanje miševa tokom 30 dana. Jedinjenje se smatra netoksičnim ukoliko svi tretirani miševi dožive 31. dan, bez pokazivanja vidljivih znakova toksičnosti kao što su gubitak telesne mase, letargija, salivacija, nakostrešeno krzno i slično.

### **Ispitivanje antimalarijske aktivnosti u *in vivo* uslovima (Thompson-ov test)**

Efikasnost sintetisanih jedinjenja kao potencijalnih antimalarika u *in vivo* uslovima ispitana je primenom modifikovanog Thompson-ovog testa. Eksperimenti su izvedeni u Centru izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima Instituta za medicinska istraživanja, uz dozvolu Etičkog saveta za rad sa eksperimentalnim životinjama (rešenja Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine br. 323-07-02444/2014-05/1 i br. 323-07-01211/2015-0511). Miševi soja C57B1/6 koji je osetljiv na infekciju *P. berghei*, tretirani su na isti način kao i u testu ispitivanja toksičnosti. Miševi su inficirani intraperitonealno *P. berghei* (ANKA soj) eritrocitima nultog dana. Suspenzije jedinjenja u smeši 0,5% hidroksietilceluloze i 0,1% Tween 80 u vodi administrirana su oralno jednom dnevno (tokom tri ili četiri dana) počevši od trećeg dana infekcije. Negativnu kontrolnu grupu predstavljali su nelečeni miševi, a pozitivnu, miševi tretirani hlorokinom (CQ). Miševi su posmatrani 30 dana. Nivo parazitemije je tokom trajanja eksperimenta meren u krvnom razmazu uzorkovanom iz repa eksperimentalnih miševa. Miševi koji dožive 31. dan bez parazitemije smatraju se izlečenim.

## **Ispitivanje antilajšmanijske aktivnosti jedinjenja – inhibicija proliferacije promastigota *L. infantum* i *L. tropica***

Sposobnost jedinjenja da inhibiraju proliferaciju parazita lajšmanije u fazi promastigota ispitana je na Univerzitetu u Milanu, pod rukovodstvom prof. dr Taramelli. Promastigoti sojeva *L. infantum* (MHOM/TN/80/IPT1) i *L. tropica* (MHOM/IT/2012/ISS3130) kultivisani su u medijumu Schneider's Drosophila (Lonza), koji sadrži 10% inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (HyClone), na 22 °C. Za ispitivanje antilajšmanijske aktivnosti korišćen je medijum RPMI (EuroClone) koji sadrži 10% inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (EuroClone), 20 mM HEPES i 2mM L-glutamina. Za određivanje koncentracije jedinjenja koja je potrebna za 50% inhibicije (IC<sub>50</sub>) korišćen je modifikovani MTT esej.<sup>228</sup> Ispitivana jedinjenja su rastvorena u DMSO i razblažena medijumom do finalnih koncentracija. Serija rastvora jedinjenja u sedam koncentracija stavljena je u bunarčice mikrotitar pločice sa 96 oglednih mesta okruglog dna. Kao referentno jedinjenje upotrebljen je amfotericin B. Paraziti su suspendovani u kompletnom medijumu u koncentraciji  $5 \times 10^6$  i po 100 µM suspenzije je zasejano u bunarčićima. Posle inkubacije 72 sata na 22 °C, u svaki bunarčić je dodato 20 µL MTT rastvora (5 mg/mL). Posle tri sata inkubacije parazita sa bojom, mikrotitar pločice su centrifugirane i supernatanti su odbačeni. Zaostali pelet je rastvoren u 100 µL lizirajućeg pufera koji se sastoji od 20% (w/v) SDS (Sigma) i 40% DMF (Merck) rastvorenih u vodi. Apsorbancija je izmerena spektrofotometrijski na talasnoj dužini 550 nm, sa referentnom talasno dužinom 650 nm. Rezultati eksperimenta su prikazani kao IC<sub>50</sub> vrednosti. Svaka IC<sub>50</sub> vrednost je srednja vrednost nezavisnih eksperimenata izvedenih u duplikatu.

## **Esej za ispitivanje susceptibilnosti unutarćelijskih amastigota**

Sposobnost jedinjenja da inhibiraju rast parazita lajšmanije u formi amastigota ispitana je na Univerzitetu u Milanu pod rukovodstvom prof. dr Taramelli. THP-1 ćelije (ćelijska linija humanih monocita dobijena iz pacijenta sa akutnom monocitnom leukemijom) su kultivisane u RPMI medijumu, koji sadrži 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, EuroClone), 50 µL merkaptotetanol, 20 mM HEPES i 2mM glutamina, na 37 °C u atmosferi sa kontrolisanim sadržajem CO<sub>2</sub> (5%). Za infekciju sa lajšmanijom,  $5 \times 10^5$  ćelija/mL je zasejano na ploči sa 16 oglednih komora (16-chamber Lab-Tek culture slides, Nunc) i tretirano sa 0,1 µM forbol-12-miristat-13-acetata (PMA, Sigma) tokom 48 sati,

da bi se postigla diferencijacija THP-1 ćelija u makrofage. Ćelije su isprane i inficirane metacikličnim promastigotima soja *L. infantum* u odnosu makrofage/promastigoti = 1/10 tokom 24 sata. Ćelijski monosloj je zatim ispran i inkubiran sa ispitivanim jedinjenjima 72 sata. Ćelije su fiksirane metanolom i obojene Giemsa bojom. Rezultati su prikazani kao procenti inficiranih makrofaga u uzorcima tretiranim ispitivanim jedinjenjima u poređenju sa netretiranim kontrolnim uzorkom. Korišćen je svetlosni mikroskop.

### **Ispitivanje citotoksičnosti jedinjenja prema diferenciranim THP-1 ćelijama**

THP-1 ćelije su zasejane u koncentraciji  $5 \times 10^5$  ćelija/mL u mikrotitar pločici sa 96 ogleđnih mesta sa ravnim dnom. Ćelije su tretirane sa 0,1  $\mu$ M PMA 48 sati, kako bi postigle diferencijaciju u makrofage. Zatim su ćelije tretirane serijom rastvora ispitivanih jedinjenja 72 sata. Vijabilnost ćelija je izmerena korišćenjem MTT eseja na način opisan u literaturi.<sup>229</sup> Rezultati su prikazani kao IC<sub>50</sub> vrednosti.

### **Ispitivanje antiproliferativnog efekta jedinjenja prema ćelijskim linijama humanog kancera *in vitro* (SRB esej, NCI)**

Određivanje dozne zavisnosti antiproliferativne aktivnosti odabranih jedinjenja na pet koncentracija prema panelu od 60 ćelijskih linija humanog kancera izvedeno je u Nacionalnom institutu za rak u Sjedinjenim Američkim Državama (National Cancer Institute, NCI, USA) u okviru Programa za razvoj lekova (*Developmental Therapeutics Program, DTP*) po standardom protokolu.<sup>184</sup> Ćelijske linije humanog kancera gajene su u RPMI 1640 hranljivom medijumu, koji sadrži 5% fetalnog goveđeg seruma (FBS) i 2 mM L-glutamina. Ćelije, inokulisane u mikrotitar pločici, inkubirane su u kontrolisanim uslovima koji podrazumevaju 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> i relativnu vlažnost vazduha 100%, 24 sata pre dodatka eksperimentalnih jedinjenja. Rastvori jedinjenja u DMSO i potpunom medijumu, koji sadrži gentamicin, dodati su u bunarčice sa ćelijama u pet različitim koncentracija, polazeći od 10<sup>-4</sup> M. Netretirane ćelije predstavljaju kontrolni uzorak. Ćelije tretirane jedinjenjima su inkubirane još 48 sati pod pomenutim kontrolisanim uslovima. Posle inkubacije, stepen rasta i vijabilnosti ćelija određen je korišćenjem SRB eseja (sulforamid B). U slučaju adherentnih ćelija, esej se prekida dodatkom hladne TCA (trihlorsirćetne kiseline). Nakon fiksiranja ćelija pažljivim dodavanjem TCA, ćelije su inkubirane 60 minuta na 4 °C. Supernatant je odbačen, ćelije su isprane vodom i osušene na vazduhu. Rastvor SRB B (0,4%) u 1% AcOH dodat je u svaki bunarčić. Inkubirano je

na sobnoj temperaturi 10 minuta. Posle bojenja, nevezana boja je uklonjena ispiranjem 1% AcOH. Posle sušenja, vezana boja je rastvorena dodatkom 10mM Tris pufera. Apsorbancija je izmerena na automatskom čitaču na talasnoj dužini 515 nm. U slučaju ćelijske linije u suspenziji primenjuje se ista metodologija, osim što se ćelije fiksiraju većom koncentracijom TCA. Za svako jedinjenje izračunata su tri parametra: inhibicija rasta 50% (GI<sub>50</sub>), totalna inhibicija rasta (TGI) i koncentracija jedinjenja koja dovodi do 50% redukcije količine merenog proteina na kraju tretmana u poređenju sa količinom na početku eksperimenta (LC<sub>50</sub>).

### **Ispitivanje akutne toksičnosti jedinjenja u *in vivo* uslovima (NCI)**

Ispitivanje akutne toksičnosti u *in vivo* uslovima izvedeno je u Nacionalnom institutu za rak u Sjedinjenim Američkim Državama (National Cancer Institute, NCI, USA) u okviru Programa za razvoj lekova (*Developmental Therapeutics Program*, DTP) po standardnom protokolu.<sup>185</sup> Korišćene su ženke golih miševa bez timusa. U miševu su administrirana jedinjenja intraperitonealno u različitim koncentracijama počevši od maksimalne od 400 mg/kg telesne mase miša, u svrhu utvrđivanja maksimalne tolerisane doze. Jedinjenja su prethodno rastvorena u fiziološkom rastvoru sa 10% DMSO i 0,05% Tween 80. Period opservacije je trajao dve nedelje. Miševi su uzimali hranu i vodu *ad libitum*. Životinje su žrtvovane ukoliko izgube više od 20% svoje telesne mase ili pokažu druge znake toksičnosti jedinjenja. Ukoliko je miš žrtvovan, eksperiment se izvodi sa manjom koncentracijom jedinjenja na isti način. Proces se ponavlja do utvrđivanja maksimalne tolerisane doze.

### **Kolhicin/tubulinski test**

Kompetitivna inhibicija vezivanja kolhicina za tubulin od strane novosintetisanih jedinjenja ispitana je korišćenjem kolhicin/tubulinskog eseja. Step en inhibicije upoređen je sa kombretastatinom A-4, koji već pri koncentraciji 1 μM iskazuje oko 85% inhibicije. Kolhicin/tubulinski test izveden je po protokolu opisanom u literaturi.<sup>186,187</sup> Reakciona smeša sadržala je 1 μM tubulina, 5 μM [3H]kolhicina i ispitivano jedinjenje. Jedinjenja su ispitana u koncentracijama 5 μM i 50 μM. Smeša je inkubirana 10 minuta na 37 °C. Vezivanje [3H]kolhicina za tubulin izmereno je korišćenjem DEAE *cellulose filter* tehnikom.<sup>188</sup> Merenja su izvođenja u triplikatu za svako jedinjenje.

## Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti jedinjenja primenom MTT eseja

U ovoj studiji korišćene su ćelijske linije iz American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) ukoliko nije drugačije navedeno. MCF-7 i MDA-MB-231, ćelijske linije humanog adenokarcinoma dojke, A375 ćelijska linija humanog melanoma, MRC-5 ćelije humanih fibroblasta pluća i endotelna ćelijska linija EA.hy926, hibrid ljudskih somatskih ćelija, uzgajane su kao monosloj na hranljivoj podlozi. A375 i MRC-5 su odgajane u RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) medijumu, dok su MCF-7, MDA-MB-231 i EA.hy926 ćelijske linije uzgajane u DMEM medijumu (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). Ćelijska linija humane leukemije, K562, uzgajana je u suspenziji u RPMI medijumu. Praškast RPMI 1640 medijum i DMEM modifikovani medijum naručeni su od Sigma Chemicals Co, USA. Hranljivi medijum RPMI 1640 je rastvoren u sterilnoj dejonizovanoj vodi i obogaćen penicilinom (192 U/mL), streptomycinom (200 µg/mL), 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonskom kiselinom (HEPES, 25mM), L-glutaminom (3 mM) i sa 10% inaktiviranog fetalnog govedeg seruma (FCS, pH = 7,2). DMEM je korišćen kao rastvor u sterilnoj dejonizovanoj vodi, obogaćen penicilinom (192 U/mL), streptomycinom (200 µg/mL) i 10% inaktiviranog FCS. Ćelije su uzgajane na 37 °C, u atmosferi kontrolisane vlažnosti sa 5% CO<sub>2</sub>. Permanentna ćelijska linija poreklom od humanog embrionalnog teratokarcinoma NTera2/D1 (dobijena ljubaznošću prof. dr Paul-a Andrews-a, Univerzitet u Šefildu, Velika Britanija) uzgajana je u DMEM medijumu sa visokim sadržajem glukoze (4500 mg/L glukoze), obogaćenom sa 10% fetalnog govedeg seruma (FBS), glutaminom (2 mM), penicilinom (100 U/mL) i streptomycinom (100 µg/mL). Sve hemikalije potiču iz Invitrogen™, NY, USA. Ćelije su uzgajane na 37 °C u atmosferi visoke vlažnosti, koja sadrži 10% CO<sub>2</sub>, po opisanom postupku.<sup>230</sup> Citotoksična aktivnost novosintetisanih jedinjenja na MCF-7, MDA-MB-231, A375, K562, MRC-5, NTera2/D1 i EA.hy926 ćelijske linije ispitana je primenom MTT eseja.<sup>189,190</sup> Posle 48 sati inkubacije ćelija sa jedinjenjima u mikrotitar pločama sa 96 bunarčića, u svaki bunarčić je dodato 20 µL rastvora MTT, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromida, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Posle četiri sata inkubacije tretiranih ćelija sa bojom, dodato je 100 µL 10% SDS. Apsorbancija je merena sledećeg dana. Ćelijsko preživljavanje je izračunato kao odnos apsorbancija (A570 nm) tretiranih i kontrolnih ćelija uvećanim 100 puta. IC<sub>50</sub> vrednosti predstavljaju



koncentraciju jedinjenja koja inhibira preživljavanje ćelija 50% u poređenju sa kontrolom.

### **Ispitivanje ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom**

Raspodela ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana jedinjenjima ispitana je korišćenjem protočnog citometra. Ukratko, ćelije uzgajane u Petrijevim šoljama ( $2 \times 10^5$  ćelija po Petrijevoj šolji dimenzija  $60 \times 15$  mm, NUNC), kontinuirano su tretirane jedinjenjima u odgovarajućim  $IC_{50}$  koncentracijama 24 sata ili 48 sati. Ćelije su sakupljene tripsinizacijom, isprane dva puta hladnim fosfatnim puferom i fiksirane 30 minuta u 70% etanolu. Fiksirane ćelije su ponovo isprane fosfatnim puferom i inkubirane na  $37^\circ\text{C}$  sa RNazom A (1 mg/mL) 30 minuta. Neposredno pre analize na protočnom citometru, ćelije su obojene propidijum-jodidom (PI, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) u koncentraciji 400  $\mu\text{g/mL}$ . PI se vezuje za molekule DNK. Raspodela ćelija po fazama ćelijskog ciklusa na osnovu količine DNK analizirana je na protočnom citometru FACS Calibur Becton Dickinson korišćenjem kompjuterskog programa Cell Quest (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

### **Ispitivanje uticaja jedinjenja na ekspresiju ciklina B1**

Za potrebe analiza na protočnom citometru ćelije su uzgajane i tretirane jedinjenjima kako je već navedeno. Za intraćelijsko bojenje ciklina korišćena su sledeća antitela: FITC-konjugovani mišji antihumani ciklin B1 (BD Pharmingen, San Diego, USA) i IgG2a (izotipska kontrola, BD Pharmingen, San Diego, USA). Ćelije su inkubirane sa antitelima tokom noći na  $4^\circ\text{C}$  i dva puta isprane sa PBS-om koji sadrži 1% BSA. Ćelije su resuspendovane u smeši PBS/PI/Dnase-free Rnase A i inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku pre analize. Uzorci su analizirani na protočnom citometru FACS Calibur Becton Dickinson korišćenjem kompjuterskog programa Cell Quest (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

### **Detekcija apoptoze testom dvostrukog bojenja ćelija (Annexin V-FITC/PI)**

Ispitivanje apoptoze u ćelijama tretiranim eksperimentalnim jedinjenjima izvedeno je korišćenjem Aneksin V – fluorescein-izotiocijanat/propidijum-jodid kita (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Uzorci su pripremljeni sledeći uputstva proizvođača. Udeo ćelija u apoptozi određen je na protočnom citometru FACS Calibur Becton

Dickinson korišćenjem kompjuterskog programa Cell Quest (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Aneksin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> ćelije su definisane kao ćelije u ranoj apoptozi, a dvostruko pozitivne ćelije (Aneksin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>), kao ćelije u kasnoj apoptozi ili nekrozi.

### **Određivanje promene mitohondrijskog membranskog potencijala ( $\Delta\Psi_m$ )**

Promena potencijala mitohondrijske membrane ( $\Delta\Psi_m$ ), kao pokazatelja njenog integriteta pod uticajem ispitivanih jedinjenja, izmerena je korišćenjem Rodamina 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) po postupku opisanom u literaturi.<sup>195</sup> Ukratko,  $1 \times 10^6$  ćelija tretiranih jedinjenjima u odgovarajućoj koncentraciji resuspendovano je u 200  $\mu$ L fosfatnog pufera i obojeno Rodaminom 123 (2,5  $\mu$ g/mL) u toku 30 minuta na 37 °C. Posle ispiranja, uzorci ćelija analizirani su na protočnom citometru FACS Calibur Becton Dickinson korišćenjem kompjuterskog programa Cell Quest (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

### **Analiza nivoa regulatornih proteina apoptoze**

Ćelije su kontinuirano tretirane jedinjenjima u odgovarajućim koncentracijama 24 sata i 48 sati. Za analizu nivoa Bax i Bcl-2 proteina regulatora apoptoze korišćena su sledeća antitela: mišji anti-Bax (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) i FITC-konjugovano monoklonsko Bcl-2 antitelo (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Ukratko, tretirane ćelije su inkubirane sa antitelima na sobnoj temperaturi 30 minuta i dva puta isprane PBS-om koji sadrži 1% BSA. Ćelije su resuspendovane u PBS i analizirane na protočnom citometru FACS Calibur Becton Dickinson korišćenjem kompjuterskog programa Cell Quest (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

### **Analiza transkripcionih faktora p53 i p73**

Za intraćelijsko bojenje ćelija s ciljem ispitivanja nivoa p53 i p73 korišćena su sledeća antitela: mišje anti-p53 (razblaženje 1 : 100, Dako, Glostrup, Denmark) i mišje anti-p73 (5  $\mu$ g/mL, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Ukratko, ćelije su gajene 24 sata u standardnim uslovima i zatim kontinuirano tretirane ispitivanim jedinjenjima u IC<sub>50</sub> koncentracijama 24 sata i 48 sati. Posle stimulacionog perioda, ćelije su fiksirane zagrejanim Cytotfix (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) puferom 10–12 minuta na 37 °C, isprane dva puta fosfatnim puferom (PBS) koji sadrži 1% BSA. Ćelije su permeabilizovane korišćenjem Perm (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) pufera 20

minuta na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja, ćelije su inkubirane sa antitelima na sobnoj temperaturi u mraku 60 minuta i isprane dva puta fosfatnim puferom koji sadrži 1% BSA. Ćelije su zatim inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom za koje je vezana boja FITC (razblaženje 1 : 100, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Ćelije su analizirane na protočnom citometru FACS Calibur Becton Dickinson korišćenjem kompjuterskog programa Cell Quest (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

### **Ispitivanje nivoa ukupnih intraćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta**

Generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, *Reactive Oxygen Species*) u ćelijama pod uticajem eksperimentalnih jedinjenja ispitano je korišćenjem ROS osetljive fluorescentne probe 2',7'-dihlordihidrofluorescein-diacetata (DCFH-DA). Sam DCFH-DA nije fluorescentan. Unutarćelijskim esterazama najpre dolazi do hidrolize acetata, a zatim se DCFH oksiduje prisutnim reaktivnim kiseoničnim vrstama do fluorescentnog dihlorfluoresceina (DCF). Ukratko, ćelije su kultivisane i tretirane ispitivanim jedinjenjima. Netretirane ćelije su predstavljale kontrolni uzorak. Posle perioda inkubacije u trajanju 24 sata i 48 sati, ćelije su sakupljene, isprane dva puta fosfatnim puferom (PBS), resuspendovane u 10 mM DCFH-DA i inkubirane na 37 °C 30 minuta u mraku. Nivo unutarćelijskih ROS je ispitan na protočnom citometru (FACS Calibur Becton Dickinson). Ekscitaciona talasna dužina bila je 485 nm, a fluorescencija je izmerena na 530 nm. Rezultati su analizirani korišćenjem kompjuterskog programa Cell Quest (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

### **Ispitivanje vijabilnosti ćelija korišćenjem boje Tripan plavo (*Trypan Blue Exclusion Test*)**

Bojenje Tripan plavom bojom korišćeno je za određivanje broja živih NT2/D1 ćelija u populaciji adherentnih i odlepljenih ćelija nakon 24 sata i 48 sati tretmana ispitivanim jedinjenjima u koncentraciji 1  $\mu$ M. Ćelije odlepljene sa podloge suda resuspendovane su u medijumu u kom su gajene adherentne ćelije su odvojene od površine suda tretmanom tripsinom i potom resuspendovane u medijumu za gajenje ćelija. U 50  $\mu$ L medijuma sa ćelijama dodata je 0,4% Tripan plava boja u odnosu 1 : 1 (v/v). Posle 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, ćelije su brojane u Bürker komorici za brojanje ćelija na invertnom mikroskopu. Broj živih ćelija izračunat je

primenom formule:  $N = \text{broj živih ćelija} / \text{broj kvadrata u kojima su izbrojane ćelije} \times 2$   
(razblaženje ćelija)  $\times 10000/\text{mL medijuma}$ .

### **Ispitivanje uticaja jedinjenja na migraciju ćelija - *wound-healing* esej**

„*Wound-healing*“ esej je korišćen za ispitivanje sposobnosti jedinjenja da inhibiraju migraciju NT2/D1 ćelija *in vitro*. NT2/D1 ćelije su uzgajane do formiranja konfluentnog monosloja adherentnih ćelija, nakon čega je plastičnim nastavkom načinjena povreda monosloja mehaničkim uklanjanjem ćelija sa dna suda. Ćelije su isprane fosfatnim puferom (PBS) i tretirane ispitivanim jedinjenjima ili DMSO (kontrola). Migracija ćelija praćena je narednih 20 sati, fotografisanjem ćelija oko mesta povrede u trenutku  $t = 0 \text{ h}$  i  $t = 20 \text{ h}$  digitalnom kamerom (Leica MC170 HD) povezanom sa DM IL LED invertnim mikroskopom (Leica). Ćelije koje su migracijom dospele u prazan prostor povrede su prebrojane. Rezultati su prikazani kao procentni udeo ćelija tretiranih jedinjenjima u odnosu na broj migrirajućih ćelija u kontrolnom uzorku.

### **Ispitivanje uticaja jedinjenja na formiranje i rast kolonija**

Za ispitivanje uticaja jedinjenja na formiranje kolonija 600 NT2/D1 ćelija zasejano je u Petrijeve šolje ( $R = 6 \text{ cm}$ ) i odmah po zasejavanju tretirano ispitivanim jedinjenjima ili DMSO (ispitivana jedinjenja su rastvorena u DMSO). Medijum je menjan svakih 48 sati. Ćelije su obojene rastvorom boje crystal violet sedmog dana tretmana i brojane korišćenjem invertnog mikroskopa.

Za ispitivanje uticaja jedinjenja na rast kolonija, 750 NT2/D1 ćelija je zasejano u Petrijeve šolje ( $R = 6 \text{ cm}$ ) i gajeno do formiranja kolonija veličine oko 10 ćelija. U ovoj fazi, ćelije su tretirane ispitivanim jedinjenjima ili DMSO, kao kontrolom, i dalje gajene do formiranja kolonija sa približno 50 ćelija. Ćelije su zatim obojene rastvorom boje crystal violet i izbrojane su kolonije koje sadrže više od 15 ćelija korišćenjem invertnog mikroskopa.

### **Ispitivanje uticaja jedinjenja na invazivnost ćelija (*Transwell assay*)**

Test invazivnosti (*Transwell assay*) korišćen je za analizu uticaja ispitivanih jedinjenja na invazivni potencijal NT2/D1 ćelija. Za analizu su korišćeni inserti/komorice na čijem dnu se nalazi polikarbonatna membrana sa porama veličine  $8,0 \mu\text{m}$  (engl. Transwell polycarbonate membrane, Thermo Fisher Scientific) kroz koju ćelije mogu da

prolaze. Gornja strana membrane inserta/komorice obložena je podlogom koja po sastavu odgovara ćelijskom matriksu (Matrigel Basement Membrane Matrix, Corning). Inserti su stavljeni u bunarčiće mikrotitar ploče sa 24 oglednih mesta. Netretirane i NT2/D1 ćelije tretirane 24 sata ispitivanim jedinjenjima, resuspendovane su u medijumu bez FBS hranljivog seruma u koncentraciji  $1 \times 10^5$  ćelija i nanete na inserte obložene Matrigelom. Medijum sa 10% fetalnog govedeg seruma (FBS) dodat je u bunarčiće mikrotitar ploče ispod inserta kao hemoatraktant. Posle 48 sati inkubacije gornja površina membrane je obrisana štapićem obloženim vatom blagim trljanjem, kako bi se uklonile ćelije koje nisu prošle kroz membranu. Ćelije koje su prošle kroz membranu ka donjoj komori obojene su bojom crystal violet. Inserti su zatim osušeni i prebačeni na mikroskopske staklene pločice, ćelije su prebrojane i fotografisane digitalnom kamerom (Leica MC170 HD) povezanom sa invertnim mikroskopom.

### **Ispitivanje inhibicije formiranja tubularnih struktura endotelnih ćelija u *in vitro* uslovima – *tube formation* esej**

Antiangiogenezni potencijal eksperimentalnog jedinjenja u *in vitro* uslovima ispitan je na modelu EA.hy926 ćelijske linije primenom eseja kojim se prati inhibitorna sposobnost jedinjenja prema formiranju tubularnih struktura u Matrigelu.<sup>231</sup> Matrigel (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) je postavljen u 24 bunarčića mikrotitar ploče. Ploča sa Matrigelom inkubirana je 30 minuta na 37 °C. EA.hy926 ćelije su tretirane 12 sati ispitivanim jedinjenjem u koncentracijama 1; 2,5 i 5  $\mu\text{M}$ , a zatim zasejane u koncentraciji  $10^5$  ćelija/mL medijuma u bunarčiće sa očvrslim Matrigelom. Formiranje mreže tubularnih struktura fotografisano je digitalnom kamerom (Leica MC170 HD) povezanom sa invertnim mikroskopom posle 6 sati i 24 sata inkubacije.

### **Ispitivanje toksičnosti jedinjenja u *in vivo* uslovima (model embriona zebra-ribica)**

Procenjena je toksičnost jedinjenja **38 (MVNP001)** prema embrionima zebra-ribica (*Danio rerio*) kao animalnom modelu prema opštim pravilima OECD Smernica za testiranje hemikalija.<sup>232</sup> Ogledi su izvedeni 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. Divlji soj zebra-ribica *Danio rerio* čuvan je u kontrolisanim laboratorijskim uslovima u ribljem medijumu na 28 °C, primenjujući ciklus svetla i tame 14h/10h. Zebra-ribice su

hranjenje dva puta dnevno komercijalnom suvom hranom (TetraMin™ flakes, Tetra, Melle, Nemačka) i jednom dnevno sa *Artemia nauplii*. Nakon mrešćenja, embrioni su sakupljeni, smešteni u ploče sa 24 bunarčića (10 embriona i 1 mL vode po bunarčiću, 0,2 g/mL Instant Ocean® Salt u destilovanoj vodi) i inkubirani na 28 °C. Embrioni zebra-ribica su 6 sati nakon fertilizacije tretirani ispitivanim jedinjenjem (6, 8, 10, 15, 20 i 30 μM) ili meflokinom (pozitivnom kontrolom, 10, 20, 40, 60, 80 i 100 μM). Negativnu kontrolu predstavljali su embrioni tretirani 0,1% DMSO. Za svaku koncentraciju jedinjenja eksperiment je ponovljen tri puta na 40 embriona. Ishod eksperimenta beležen je posle 24, 48, 72, 96 i 120 sati korišćenjem invertnog mikroskopa (CKX41, Olympus, Tokio, Japan). Embrioni su anestetizirani posle 120 sati dodatkom 0,1% (w/v) rastvora trikaina (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA), fotografisani i uništeni zamrzavanjem 24 sata na – 20 °C. Rezultati su predstavljeni kao LC<sub>50</sub> vrednosti koje su izračunate korišćenjem programa ToxRatPro (Software for the Statistical Analysis of Biotests, ToxRat Solution GmbH, Aldorf, Germany, Version 2.10.05).

### **Ispitivanje antiangiogenoznog potencijala na modelu zebra-ribica**

Antiangiogenozni potencijal ispitivanog jedinjenja procenjen je na transgenim *Tg(fli1:EGFP)* embrionima zebra-ribica sa prekomerno eksprimiranim fluorescentnim EGFP proteinom u endotelnim ćelijama po postupku opisanom u literaturi.<sup>233</sup> Ukratko, *Tg(fli1:EGFP)* embrioni su uzgajani u ribljem medijumu na 28 °C. Embrioni stari 6 hpf su neposredno pre tretmana jedinjenjem smešteni u ploče sa 24 bunarčića (10 embriona po bunarčiću) i inkubirani sa 1 mL ribljeg medijuma koji sadrži različite koncentracije ispitivanog jedinjenja (1 μM i 5 μM) na 28 °C. Negativnu kontrolu predstavljali su embrioni tretirani 0,1% DMSO. Posle tretmana 48 hpf embrioni su anestetizirani 0,003% trikainom (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) i fotografisani pod fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Applied Imaging Corp., San Jose, CA, USA). Antiangiogenozni fenotip je definisan kao smanjen broj/dužina intersegmentalnih krvnih sudova. Nakon fotografisanja, embrioni su uništeni zamrzavanjem 24 sata na – 20 °C.

## **Ispitivanje antitumorske aktivnosti u *in vivo* uslovima - ksenograft model tumora na embrionima zebra-ribica**

Antitumorska aktivnost eksperimentalnog jedinjenja u *in vivo* uslovima ispitana je na ksenograft modelu na transgenim *Tg(fill:EGFP)* embrionima zebra-ribica. Korišćene su ćelijske linije MCF-7 i MDA-MB-231 humanog karcinoma dojke. Ćelije su uzgajane u DMEM medijumu (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) koji sadrži 10% FBS, 100 µg/mL streptomicina i 100 U/mL penicilina u atmosferi kontrolisane vlažnosti sa 5% CO<sub>2</sub> na 37 °C. Pre mikroinjektovanja, ćelije su isprane sa PBS, tripsinizirane (0,25% tripsin / 0,53 mM EDTA) kako bi se dobila suspenzija ćelija. Posle 5 minuta centrifugiranja na 1200 rpm, ćelije su resuspendovane u medijumu bez seruma i obeležene sa 2 µM CellTracker<sup>TM</sup> RedCMTPX (Termofisher Scientific) prema uputstvima proizvođača. Ksenotransplantacija ćelija izvedena je prema postupku opisanom u literaturi.<sup>234</sup> Ćelije su presađene u embrione direktnom injekcijom u žumančanu kesu. Embrioni zebra-ribica su uzgajani na 28 °C i manuelno razdeljeni nekoliko sati pre mikroinjektovanja. Embrioni su 48–50 hpf anestetizirani dodatkom 0,02% rastvora trikaina. U žumančanu kesu anestetiziranih embriona mikroinjektovano je 5 nL suspenzije ćelija koja sadrži 150 ćelija (MCF-7 ili MDA-MB-231) korišćenjem pneumatske pikopumpe (PV820, World Precision Instruments, USA). Tačan broj ćelija u suspenziji potvrđen je smeštanjem odgovarajuće zapremine injektovane suspenzije na mikroskopsko staklo i brojanjem ćelija pod mikroskopom. Nakon injektiranja, embrioni su inkubirani najmanje jedan sat na 28 °C, odbačeni su uginuli embrioni, a živi su premešteni na mikrotitar ploču sa 24 bunarčića (1 mL ribljeg medijuma i 10 embriona po ogleđnom mestu). Embrioni su tretirani različitim koncentracijama ispitivanog jedinjenja i inkubirani na 33 °C 120 hpf. Negativnu kontrolu predstavljali su embrioni tretirani sa DMSO (0,25%). Preživljavanje i razvoj embriona sa ksenograftom, veličina tumora, razvoj metastaze i angiogeneze posmatrani su pod fluorescentnim mikroskopom 120 hpf.

## 5. ZAKLJUČAK

Istraživanje predstavljeno u ovoj doktorskoj disertaciji obuhvata sintezu 12 novih derivata 4-aminohinolina i ispitivanje njihove antimalarijske aktivnosti u različitim fazama životnog ciklusa parazita malarije u *in vitro* i *in vivo* uslovima, kao i sintezu 25 novih derivata benzotiazola i ispitivanje njihove antiproliferativne aktivnosti prema malignim ćelijama u *in vitro* uslovima. Ispitana je i antitumorska aktivnost derivata aminohinolina **38 (MVNP001)**, koji je ispoljio najveću aktivnost prema parazitu malarije. Takođe, ispitano je i dejstvo odabranih derivata aminohinolina prema parazitu lajšmanije *in vitro*.

S ciljem unapređenja biološke aktivnosti ranije sintetisanih tiofenskih derivata 4-aminohinolina, sintetisani su novi derivati sa nizom od osam metilenskih grupa. Pokazan je povoljan uticaj cijano-grupe na benzenovom prstenu nosača aminohinolinske farmakofore i metilovanja benzilnog amina alkil-niza na antimalarijsku aktivnost. Cijano-derivati aktivniji su od CQ prema svim CQ-rezistentnim sojevima *P. falciparum* u eritrocitnoj fazi. Takođe, iskazuju veću inhibitornu aktivnost prema CQ-rezistentnim sojevima u poređenju sa CQ-susceptibilnim sojevima parazita. Na osnovu rezultata dobijenih BHIA testom, zaključujemo da naša jedinjenja verovatno deluju u hranljivoj vakuoli parazita inhibirajući nastajanje hemozoina. Pored aktivnosti jedinjenja u eritrocitnoj fazi, cijano-derivati ispoljavaju značajnu aktivnost prema sporozoitima *P. berghei in vitro*, dok iskazuju umerenu gametocitocidnu aktivnost. Jedinjenja ne pokazuju znake toksičnosti prema zdravim miševima, a u modelu eksperimentalne malarije *in vivo* najaktivniji derivati produžavaju preživljavanje miševa inficiranih sojem *P. berghei* više od dva puta. Delimična redukcija hinolinskog prstena nije doprinela unapređenju antiplazmodijalne aktivnosti u *in vitro* uslovima. Primenjen je i princip multifunkcionalnih molekula u sintezi imidazopiperazinskih derivata 4-aminohinolina, međutim, novi derivati nisu ispoljili antimalarijsku aktivnost, uprkos pokazanoj inhibiciji nastajanja  $\beta$ -hematina *in vitro*. Dodatno, tiofenski derivati 4-aminohinolina i 5,6,7,8-tetrahidrohinolina umereno su aktivni prema promastigotima parazita lajšmanije *L. infantum* i *L. tropica in vitro*.

Derivati benzotiazola pokazuju inhibitorne sposobnosti prema proliferaciji malignih ćelija *in vitro*. Ispitivanje mogućeg mehanizma antitumorskog dejstva derivata benzotiazola izvedeno je na MCF-7 ćelijskoj liniji humanog karcinoma dojke i NT2/D1



ćelijskoj liniji humanog teratokarcinoma sa patofiziološkim karakteristikama testikularnog tumora. Na MCF-7 ćelijskoj liniji pokazano je da najaktivniji karbamat **100** i amid **110** dovode do zastoja ćelijskog ciklusa u G2/M fazi, što indukuje specifičnu apoptozu koja se odvija preko mitohondrija. Paralelno sa indukcijom apoptoze, jedinjenja utiču na proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta smanjujući njihov nivo. Izuzev različitog afiniteta amidnog i karbamatnog derivata ka vezivanju za kolhicinsko mesto na tubulinu, ova dva strukturno različita derivata iskazuju u velikoj meri dejstvo na MCF-7 ćelije na isti način. Analizom antiproliferativne aktivnosti najefikasnijih karbamata **100** i **102** prema NT2/D1 ćelijskoj liniji u *in vitro* uslovima, pokazano je da jedinjenja dovode do gubitka adhezivne sposobnosti ćelija, konsekvntno indukujući masovnu apoptozu. Karbamati 2-aminobenzotiazola inhibiraju formiranje kolonija, migratornu i invazivnu sposobnost NT2/D1 ćelija, što ukazuje na moguće antimetastazne osobine ispitivanih novosintetisanih derivata. Imajući u vidu izuzetnu selektivnost prema malignim ćelijama u odnosu na zdrave ćelije u smislu antiproliferativne aktivnosti *in vitro* i netoksičnost derivata u *in vivo* uslovima, novi aminobenzotiazoli predstavljaju potencijalne kandidate za detaljniju dalju analizu njihovog antitumorskog dejstva.

U okviru ispitivanja antitumorske aktivnosti novosintetisanih jedinjenja, pokazano je da derivat aminohinolina **38 (MVNP001)** inhibira proliferaciju MCF-7 i MDA-MB-231 ćelijskih linija humanog kancera u *in vitro* uslovima. Takođe, u eksperimentu sa endotelnim ćelijama Ea.hy926, inhibira formiranje mreže tubularne strukture u Matrigelu, što ukazuje na moguće antiangiogenozno dejstvo *in vitro*. Jedinjenje **38 (MVNP001)** nije ispoljilo toksične efekte na embrionima zebra-ribica pri koncentraciji 10 µM. Rezultati ispitivanja njegove antiangiogenozne aktivnosti na dve koncentracije na embrionima zebra-ribica pokazali su da derivat aminohinolina inhibira angiogenezu. U ksenograft modelu razvoja humanog adenokarcinoma dojke na zebra-ribicama, jedinjenje **38 (MVNP001)** iskazuje značajan stepen inhibicije rasta i razvoja tumora. Imajući u vidu rezultate ispitivanja biološke aktivnosti jedinjenja **38 (MVNP001)**, iskazani antimalarijski i antitumorski potencijal, selektivnost prema rezistentnim sojevima parazita, odnosno ćelijama tumora i izostanak toksičnosti prema zdravim organizmima, može se zaključiti da je vrlo važno još detaljnije ispitati terapeutske osobine ovog aminohinolinskog derivata.

## 6. CONCLUSION

The research presented with this doctoral dissertation includes synthesis of 12 novel 4-aminoquinoline derivatives and evaluation of their antimalarial activity against various malaria parasite life cycle stages *in vitro* and *in vivo*, together with the synthesis of 25 new benzothiazole derivatives and evaluation of their antiproliferative action against malignant cell lines *in vitro*. In addition, the most potent and non-toxic antimalarial aminoquinoline **38 (MVNP001)** was also examined for its antitumor activity. Additionally, selected aminoquinolines were tested against leishmania parasite *in vitro*.

In order to improve biological activities of previously synthesized thiophene-based 4-aminoquinolines, new derivatives bearing eight methylene groups chain linker were synthesized. The contribution of cyano group attached to aromatic carrier of aminoquinoline pharmacophore to antiplasmodial activity was shown, as well as benzyl amino group methylation. Cyano derivatives were more potent than **CQ** against erythrocytic forms of all CQ-resistant *P. falciparum* strains examined. Moreover, these compounds proved to be better inhibitors of CQ-resistant parasite strains in comparison to CQ-susceptible strains. According to results obtained in BHIA assay, these compounds exhibit their antimalarial activity by inhibiting hemozoin formation in food vacuole. In addition to erythrocytic stage activity, cyano derivatives showed significant activity against *P. berghei* sporozoites *in vitro*, while exhibited moderate gametocytocidal activity. No toxic effects were observed after treatment with selected compounds in host toxicity study in mice. The compounds subjected to evaluation of antimalarial activity *in vivo* prolonged *P. berghei* infected mice survival more than twice compared to control. Selective reduction of benzene core of quinoline did not improve antiplasmodial activity *in vitro*. A new approach based on combination of pharmacophoric moieties has been used for design of potential multifunctional molecules. In spite of pronounced inhibitory activity shown in BHIA experiment, new imidazolopyperazine derivatives of 4-aminoquinolines did not afford antiplasmodial activity. Investigating antileishmanial potency of novel aminoquinolines, we have shown that thiophene-based 4-aminoquinoline and 5,6,7,8-tetrahydroquinoline derivatives shown moderate activity against leishmania parasite *L. infantum* and *L. tropica* promastigotes *in vitro*.

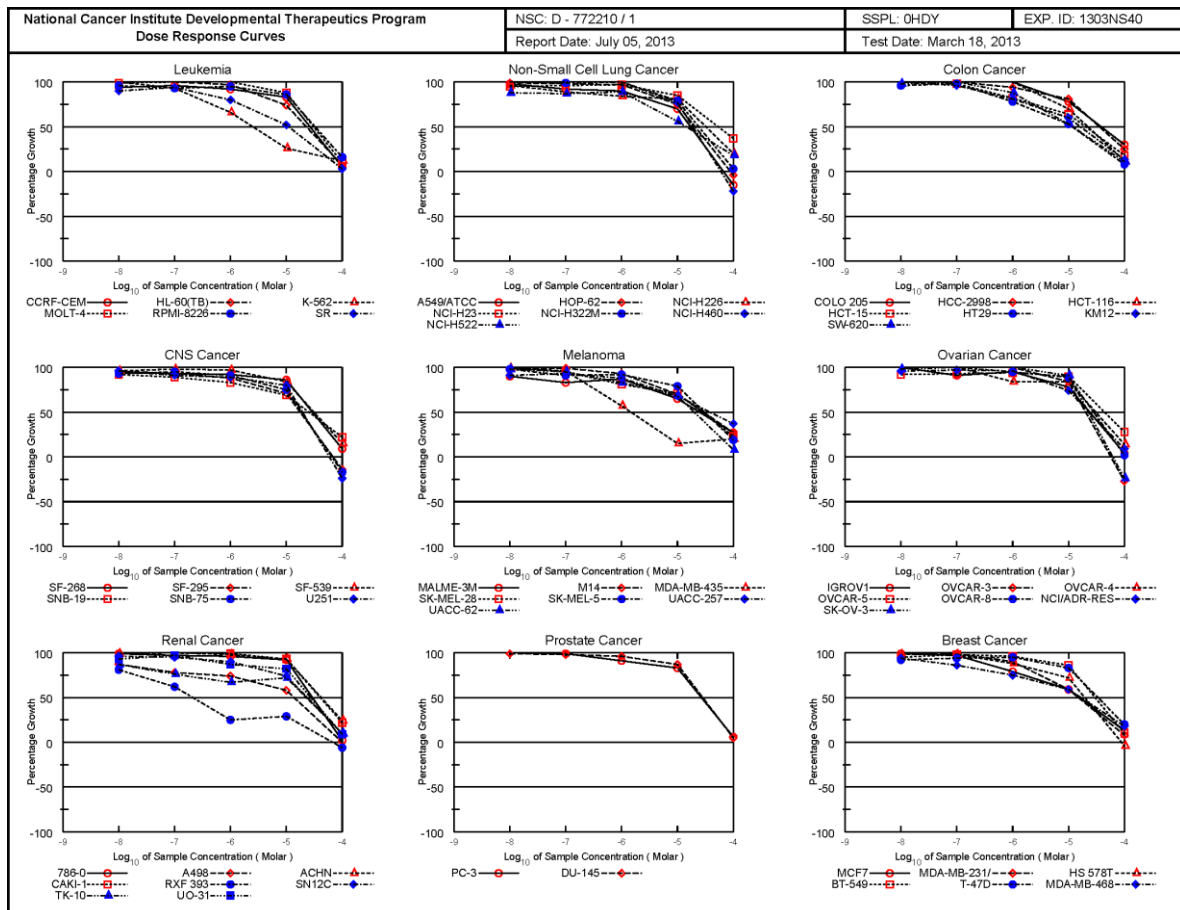
Our benzothiazole derivatives have shown inhibitory activity against malignant cells proliferation *in vitro*. Further investigation in mechanism of action was performed

using derivatives with pronounced activity against MCF-7 human breast cancer cell line and NT2/D1 human teratocarcinoma cell line possessing pathophysiological features of testicular cancer. It was shown that carbamate **100** and amide **110** arrested MCF-7 cell cycle in the G2/M phase that led to specific apoptosis with mitochondria involvement. At the same time, the reduction of reactive oxygen species level was observed. When comparing carbamate **100** and amide **110**, it is clear that with the exception of differences in affinity for colchicine binding site of tubulin, these two benzothiazole derivatives act mostly the same way. When it comes to antiproliferative activity of the most efficient carbamates **100** and **102** against NT2/D1 cell line *in vitro*, it was shown that compounds triggered cell detachment from the surface accompanied with massive apoptosis. Aminobenzothiazole carbamates showed inhibition of NT2/D1 cells' colony forming, migration and invasion ability, the indication of antimetastatic properties of novel benzothiazole derivatives. Considering excellent selectivity of benzothiazole derivatives for tumor cells over normal cells *in vitro*, and lack of toxicity *in vivo*, these new compounds are good candidates for further investigation of their antitumor potential.

Investigating antitumor properties of aminoquinoline derivative **38 (MVNP001)** has shown very good inhibitory activity against proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines *in vitro*. Endothelial capillary-like tube formation assay in Matrigel indicated possible anti-angiogenic properties of compound **38 (MVNP001)** *in vitro*. Along with the lack of toxicity of compound **38 (MVNP001)** in mice, no toxic effects were observed in zebrafish embryos, neither after treatment with 10  $\mu$ M concentration of the compound. Evaluation of antitumor properties *in vivo* was performed on zebrafish embryos. It was shown that compound **38 (MVNP001)** inhibited angiogenesis. For assessing antitumor activity of compound **38 (MVNP001)** *in vivo*, embryonic zebrafish xenograft assay of human breast adenocarcinoma development was used. The results indicated good inhibitory potency of derivative **38 (MVNP001)** against tumor growth *in vivo*. Considering the results obtained during evaluation of compound **38 (MVNP001)**, biological activity, antimalarial and antitumor potential, selectivity for resistant parasite strains, or tumor cells, and observed non-toxicity against healthy animals, further investigation of its potential therapeutic properties is of great importance.

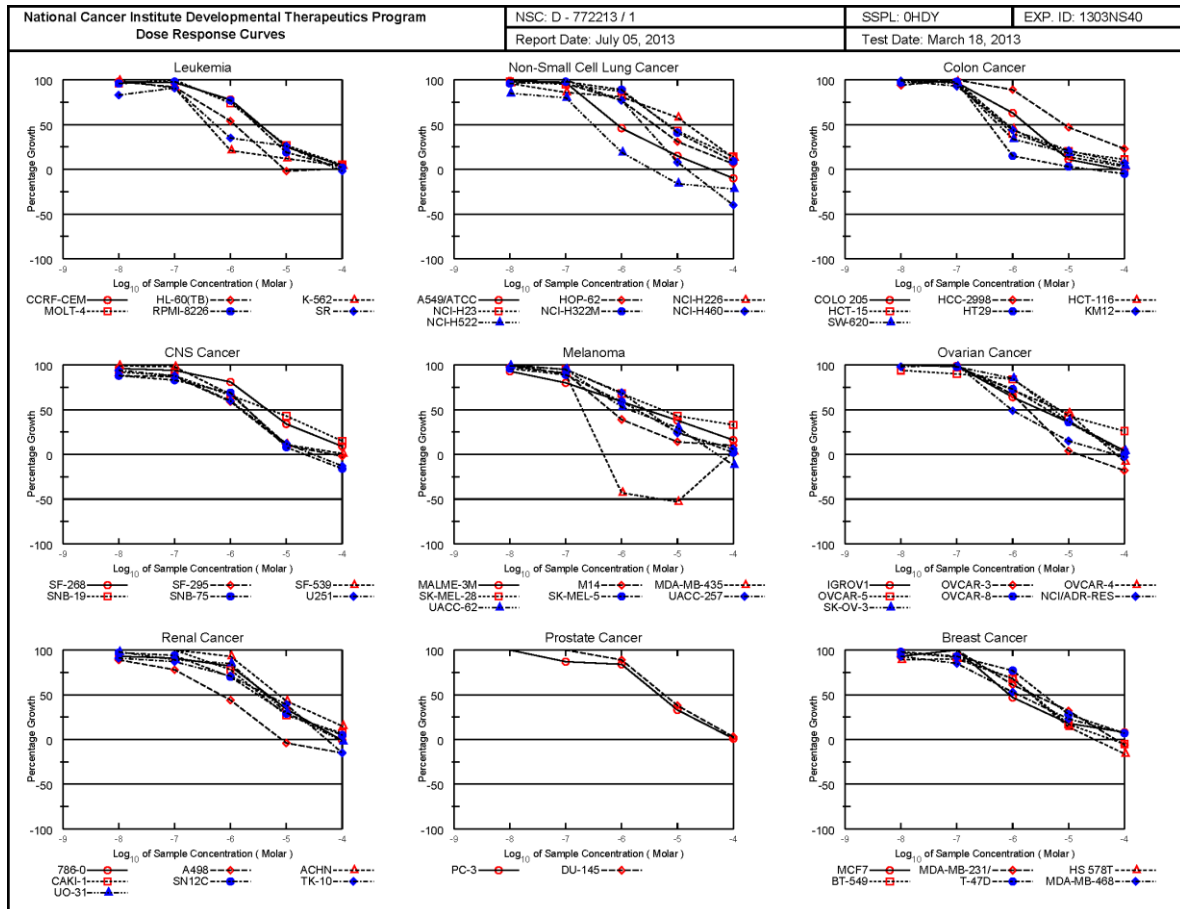
## 7. PRILOG

**Slika P1a.** Krive zavisnosti antiproliferativne aktivnosti od koncentracije jedinjenja 97 na 60 ćelijskih linija humanog kancera (SRB esej, NCI)

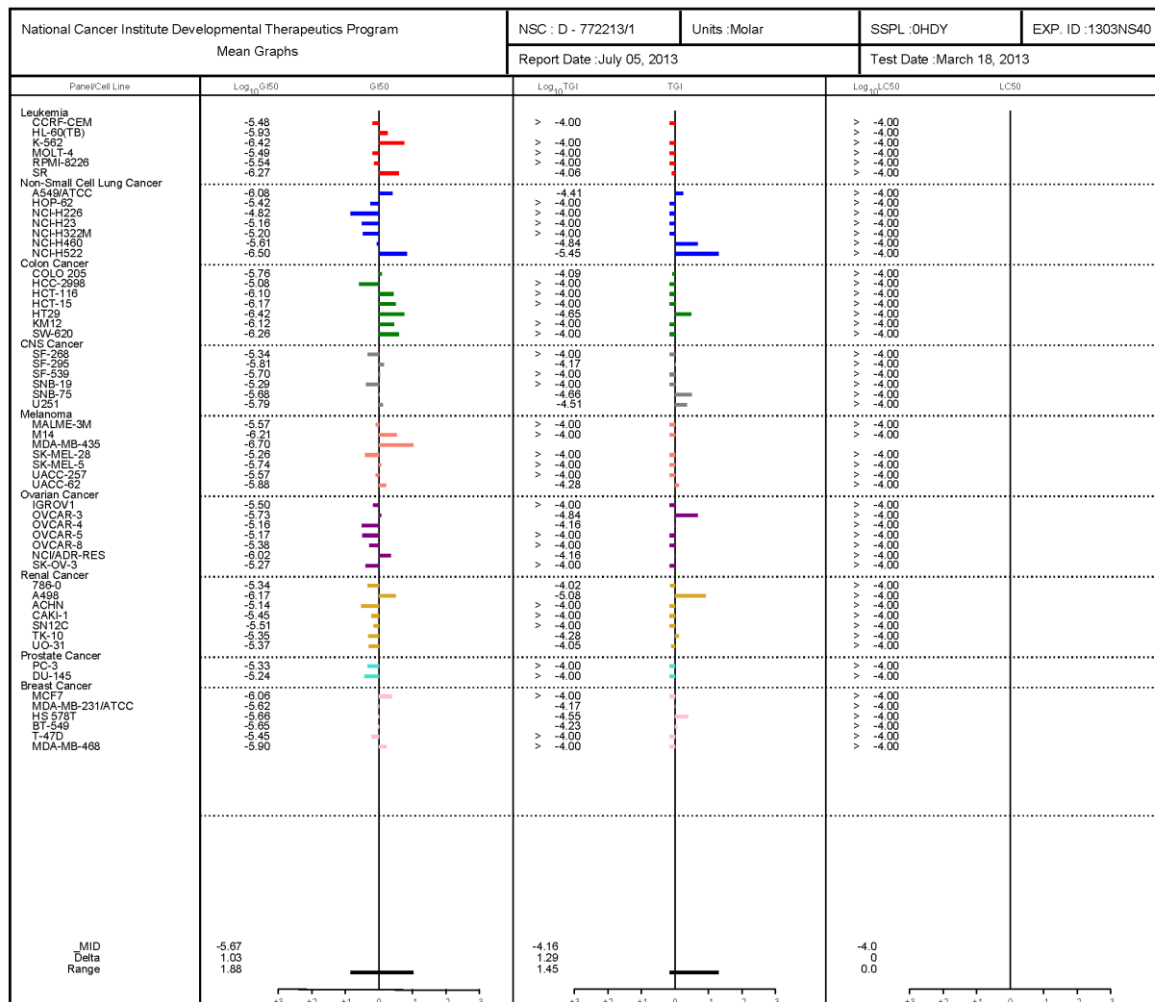




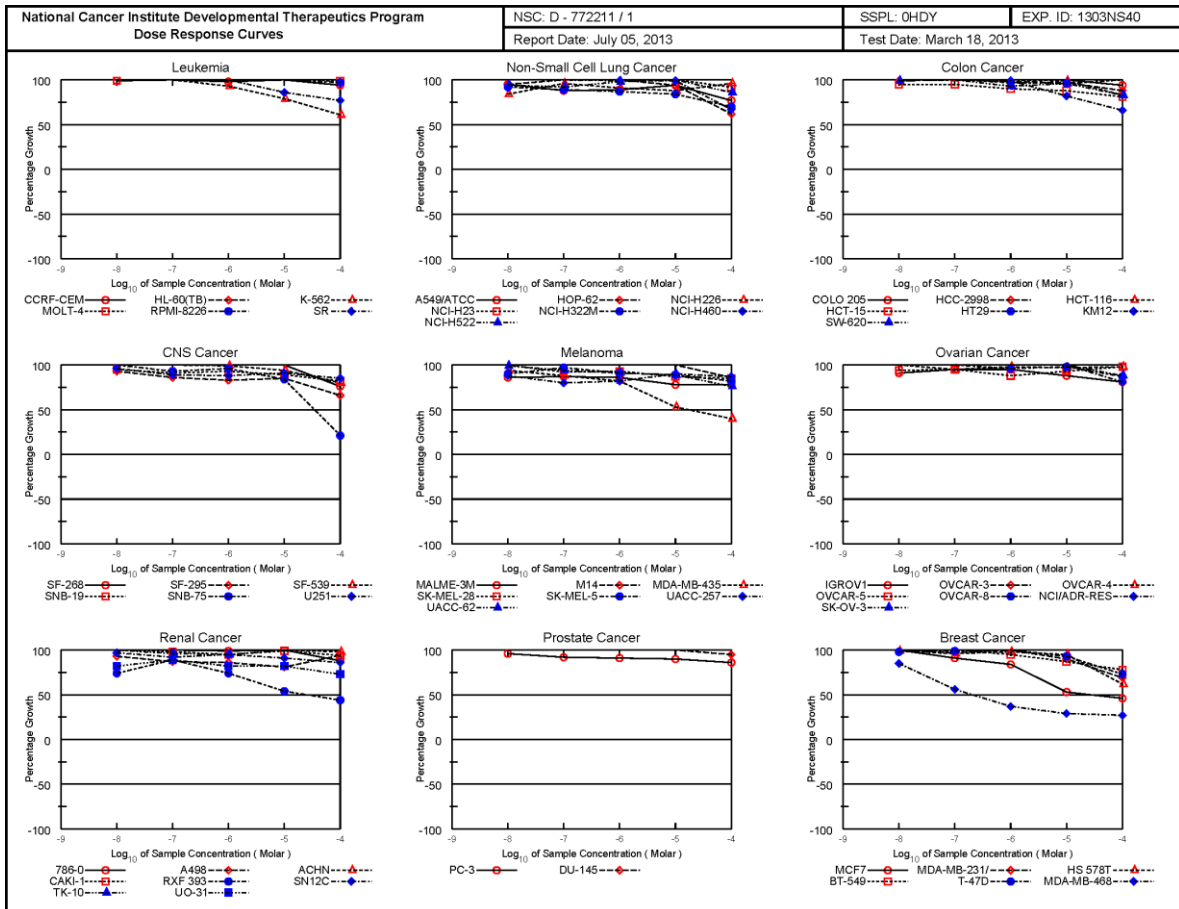
**Slika P2a.** Krive zavisnosti antiproliferativne aktivnosti od koncentracije jedinjenja 98 na 60 ćelijskih linija humanog kancera (SRB esej, NCI)



**Slika P2b.** Parametri dobijeni ispitivanjem zavisnosti antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **98** od koncentracije na 60 ćelijskih linija humanog kancera:  $GI_{50}$ , TGI,  $LC_{50}$  (SRB esej, NCI)

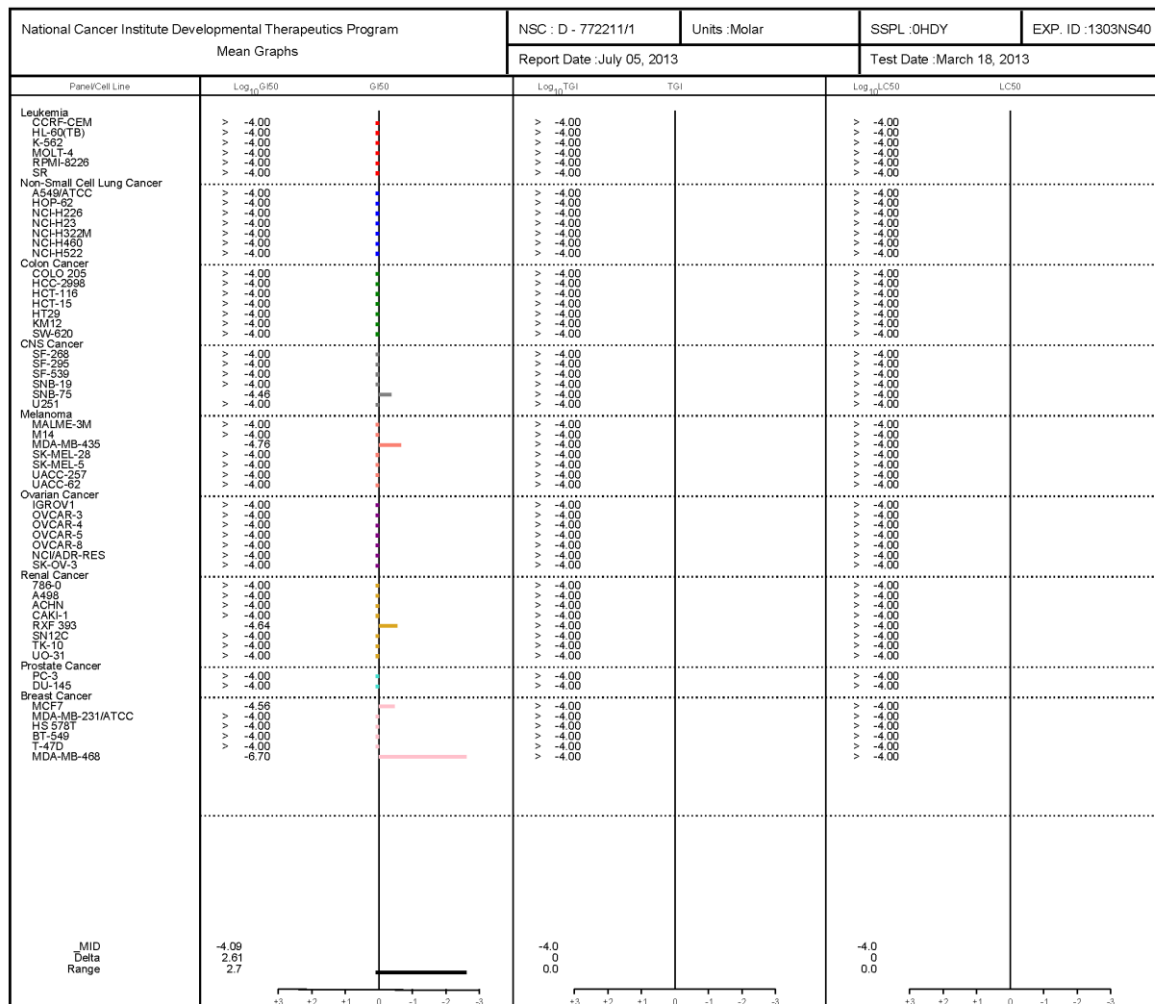


**Slika P3a.** Krive zavisnosti antiproliferativne aktivnosti od koncentracije jedinjenja **99** na 60 ćelijskih linija humanog kancera (SRB esej, NCI)

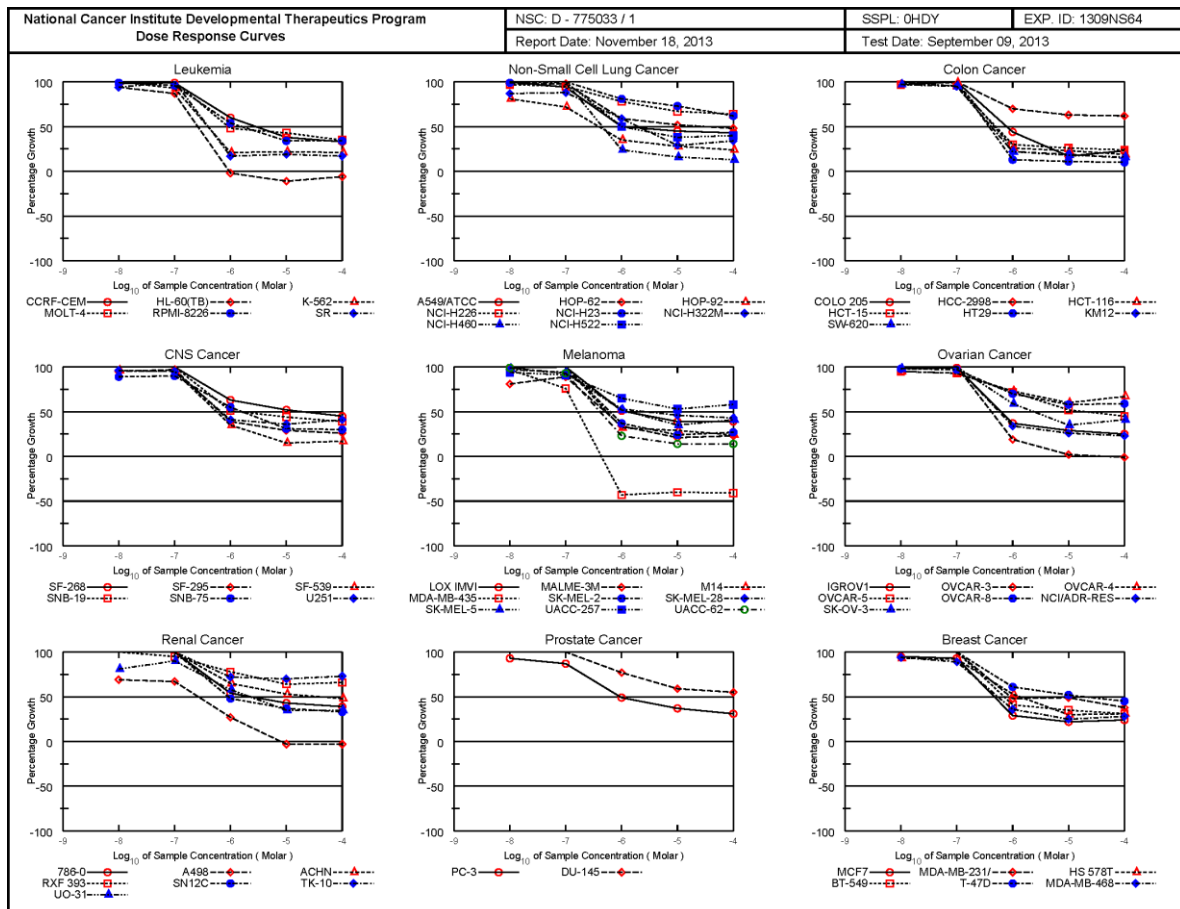




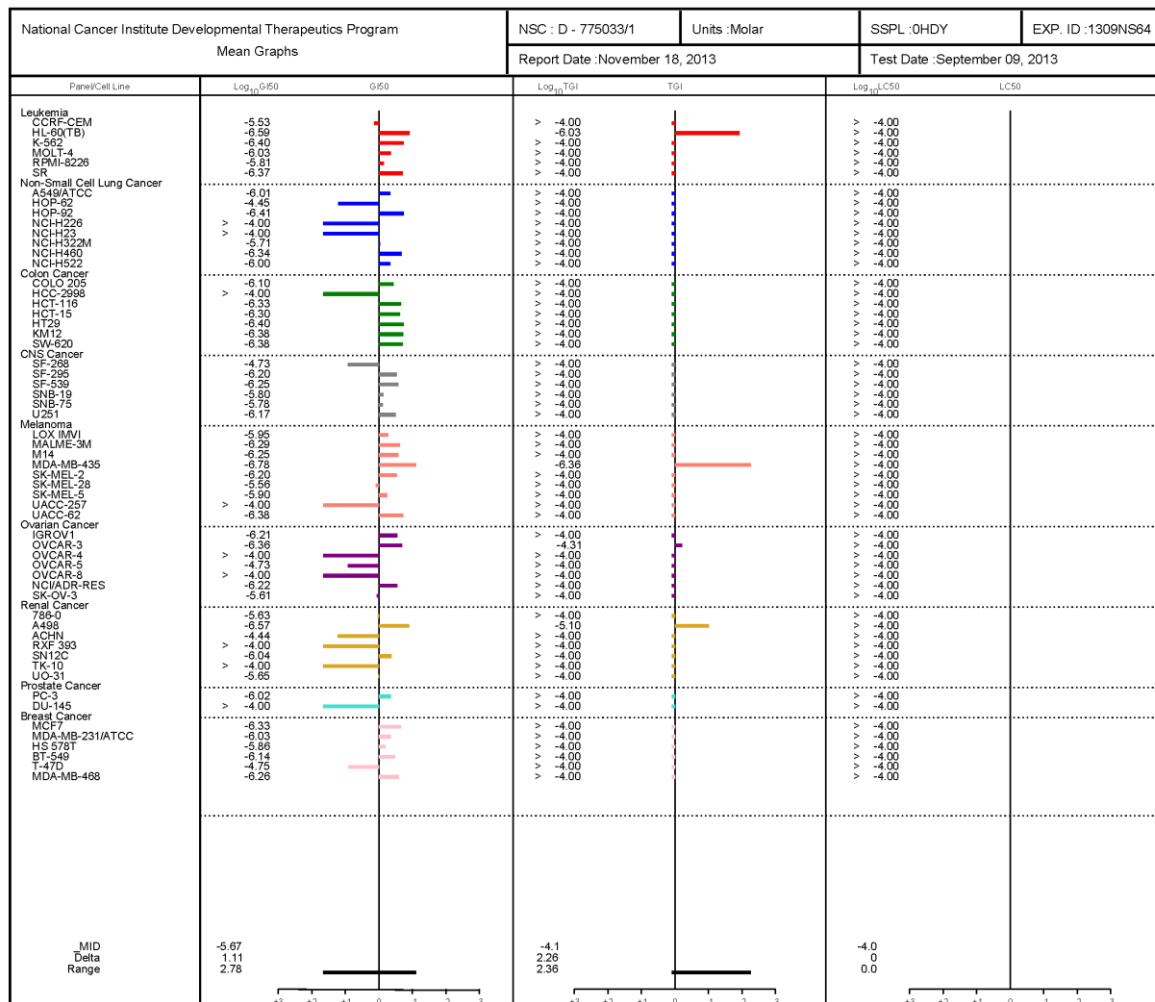
**Slika P3b.** Parametri dobijeni ispitivanjem zavisnosti antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **99** od koncentracije na 60 ćelijskih linija humanog kancera: GI<sub>50</sub>, TGI, LC<sub>50</sub> (SRB esej, NCI)



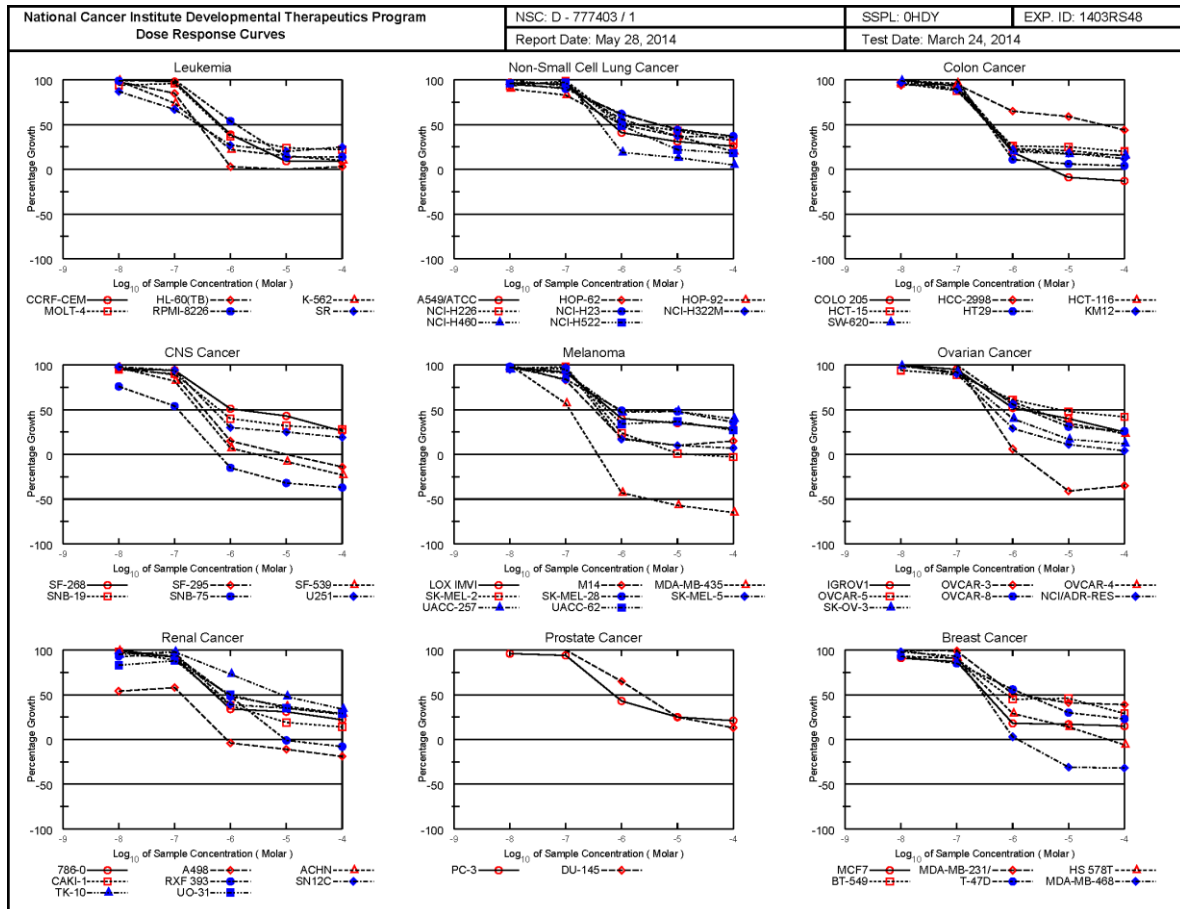
**Slika P4a.** Krive zavisnosti antiproliferativne aktivnosti od koncentracije jedinjenja **100** na 60 ćelijskih linija humanog kancera (SRB esej, NCI)



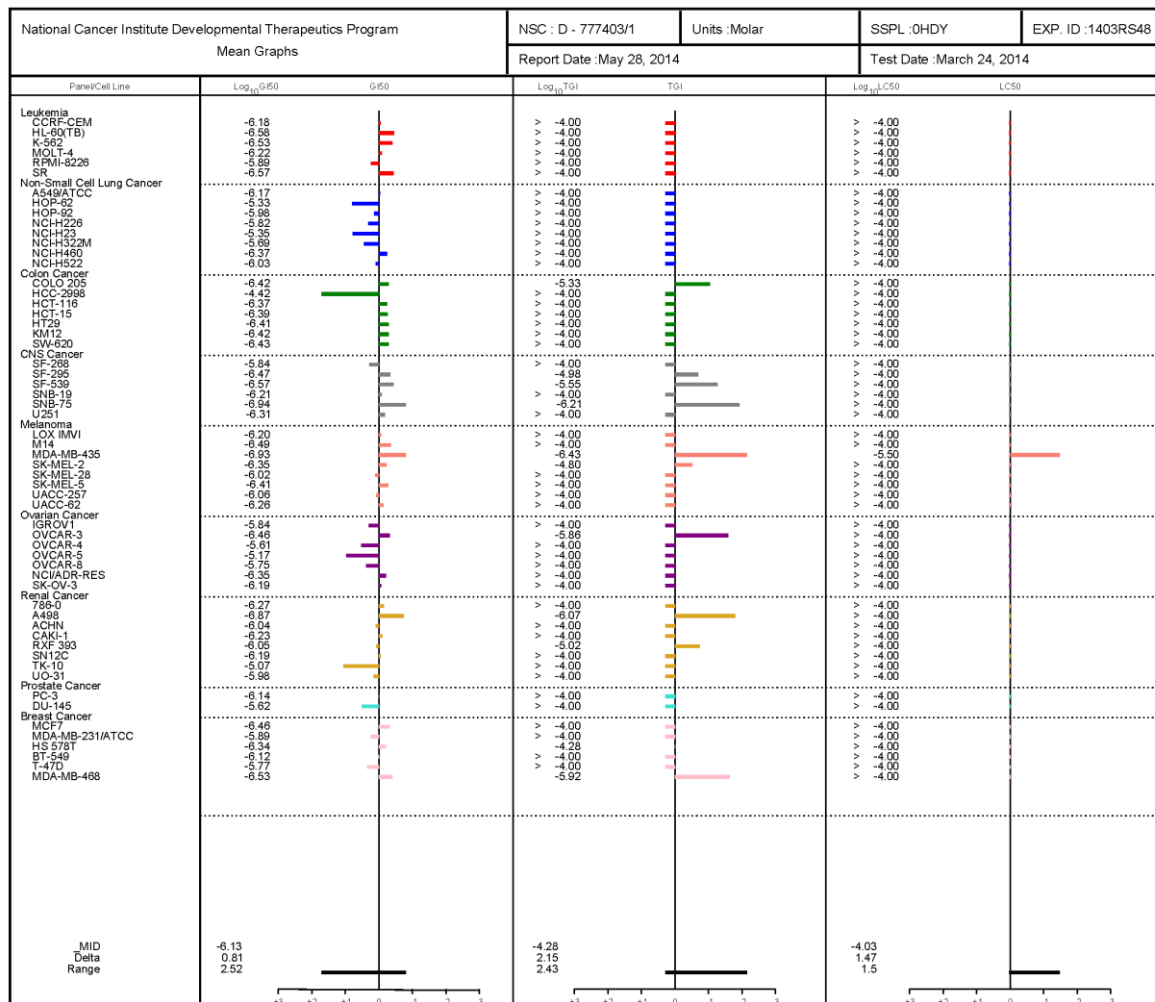
**Slika P4b.** Parametri dobijeni ispitivanjem zavisnosti antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **100** od koncentracije na 60 ćelijskih linija humanog kancera: GI<sub>50</sub>, TGI, LC<sub>50</sub> (SRB esej, NCI)



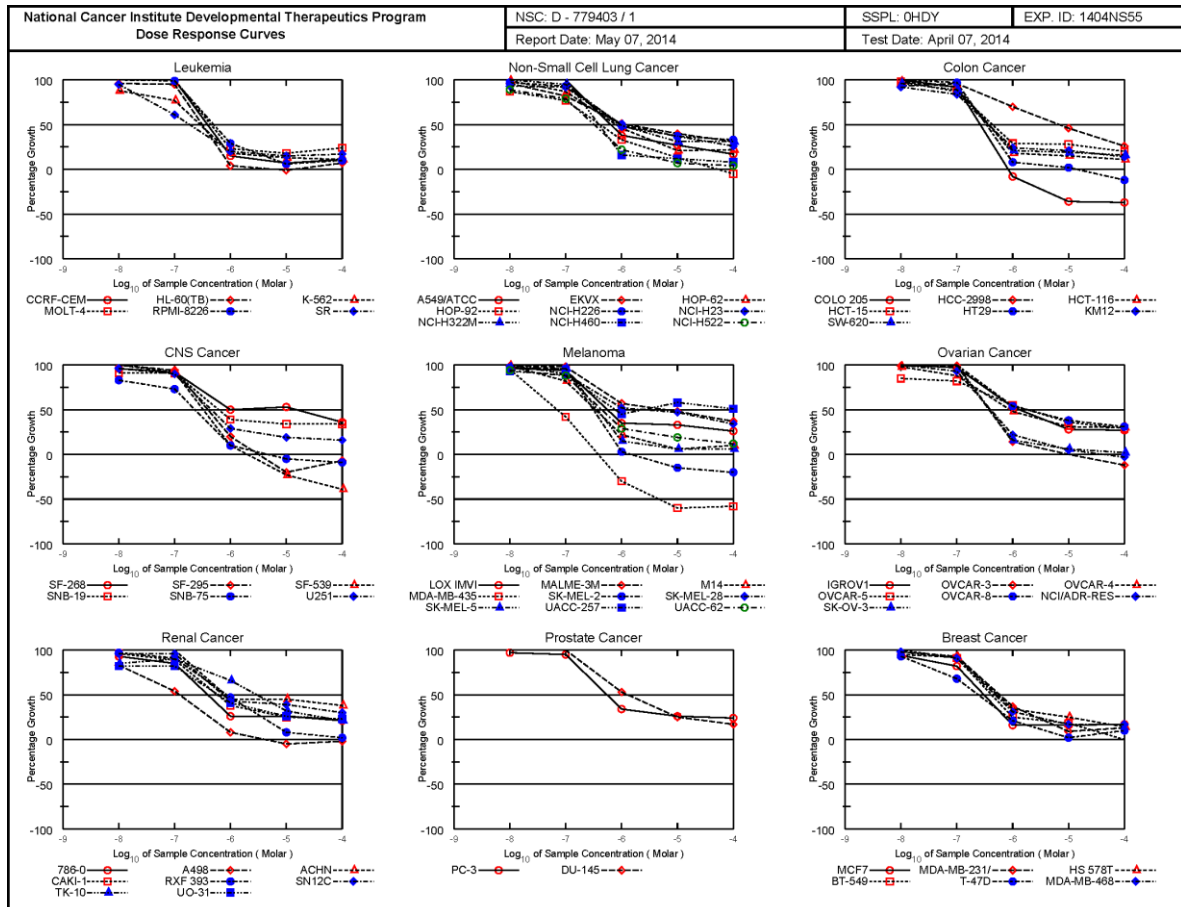
**Slika P5a.** Krive zavisnosti antiproliferativne aktivnosti od koncentracije jedinjenja **101** na 60 ćelijskih linija humanog kancera (SRB esej, NCI)



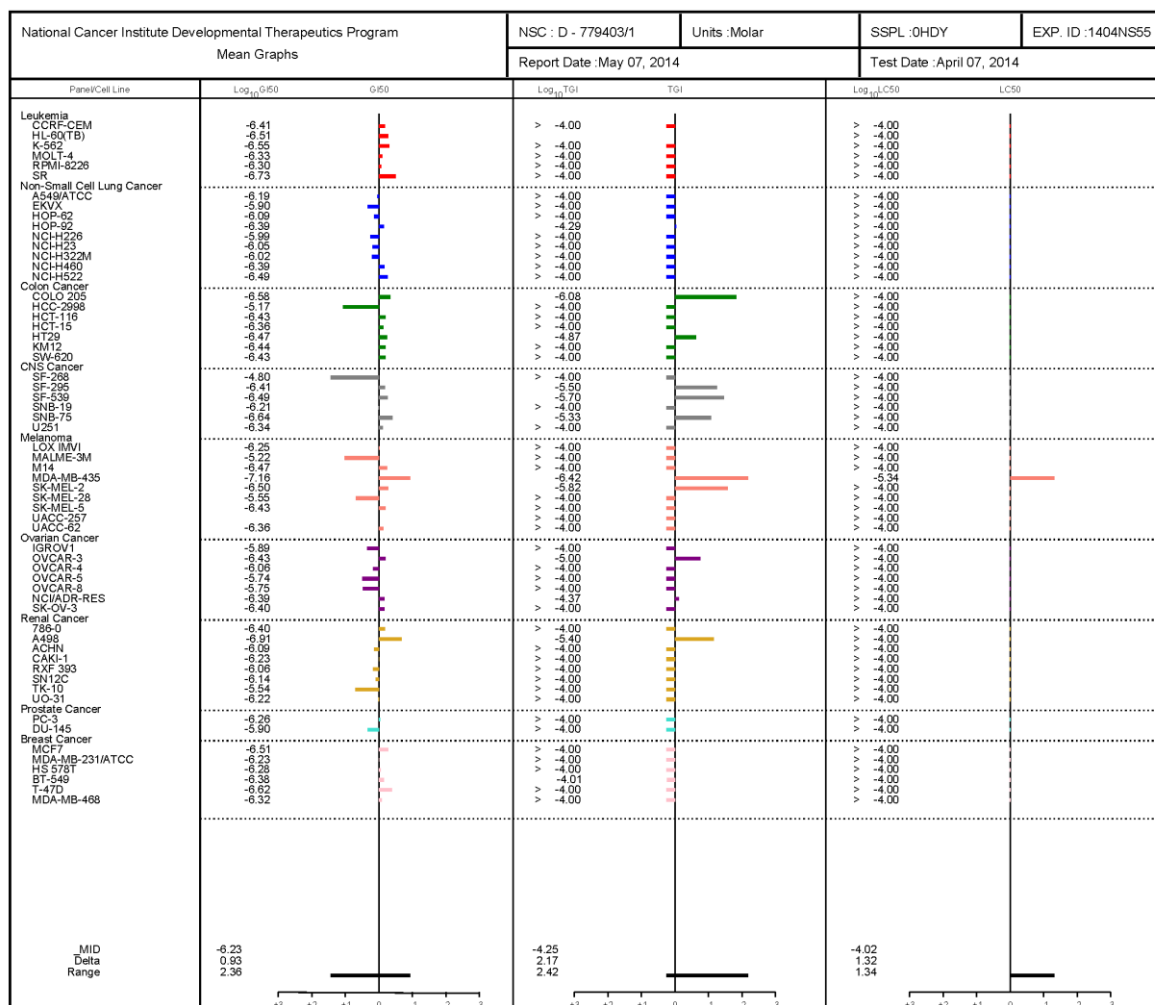
**Slika P5b.** Parametri dobijeni ispitivanjem zavisnosti antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **101** od koncentracije na 60 ćelijskih linija humanog kancera: GI<sub>50</sub>, TGI, LC<sub>50</sub> (SRB esej, NCI)



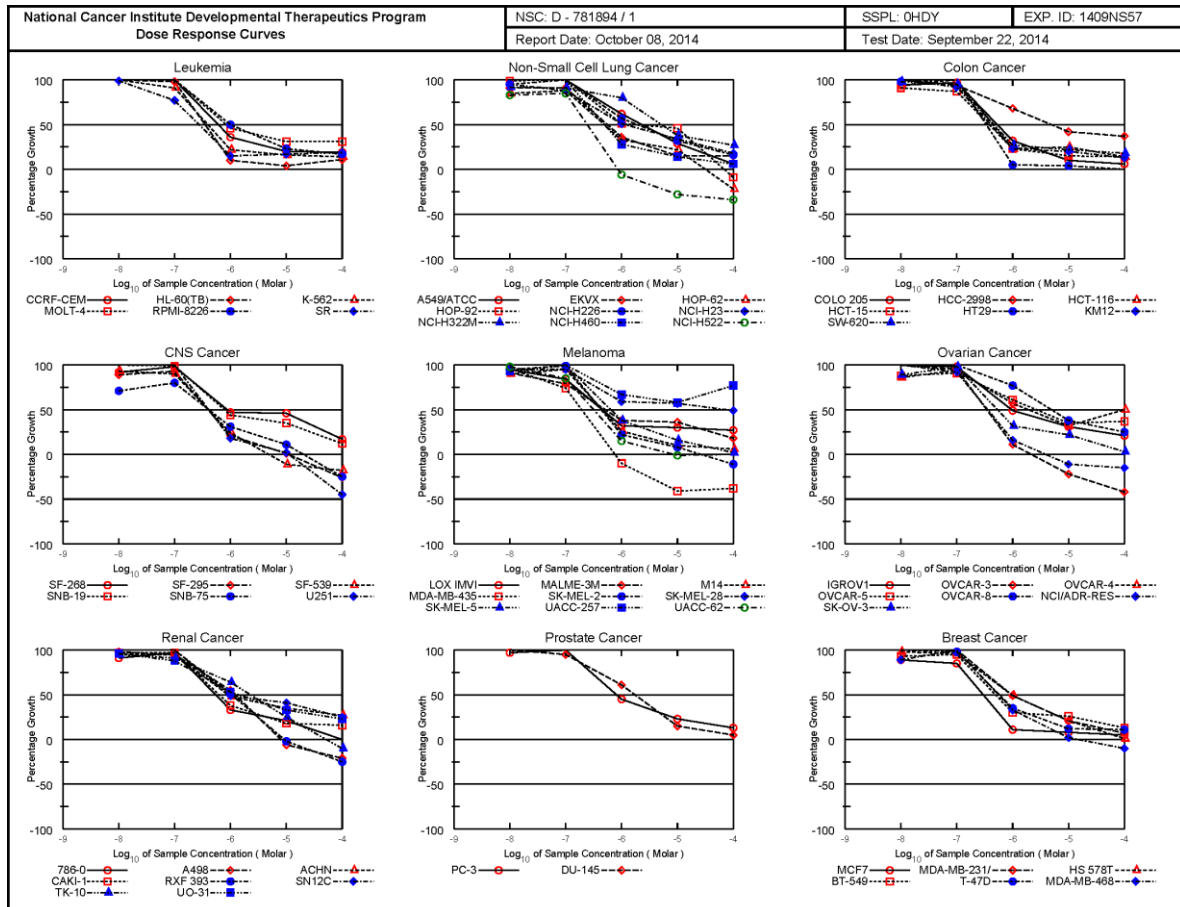
**Slika P6a.** Krive zavisnosti antiproliferativne aktivnosti od koncentracije jedinjenja **102** na 60 ćelijskih linija humanog kancera (SRB esej, NCI)



**Slika P6b.** Parametri dobijeni ispitivanjem zavisnosti antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **102** od koncentracije na 60 ćelijskih linija humanog kancera: GI<sub>50</sub>, TGI, LC<sub>50</sub> (SRB esej, NCI)

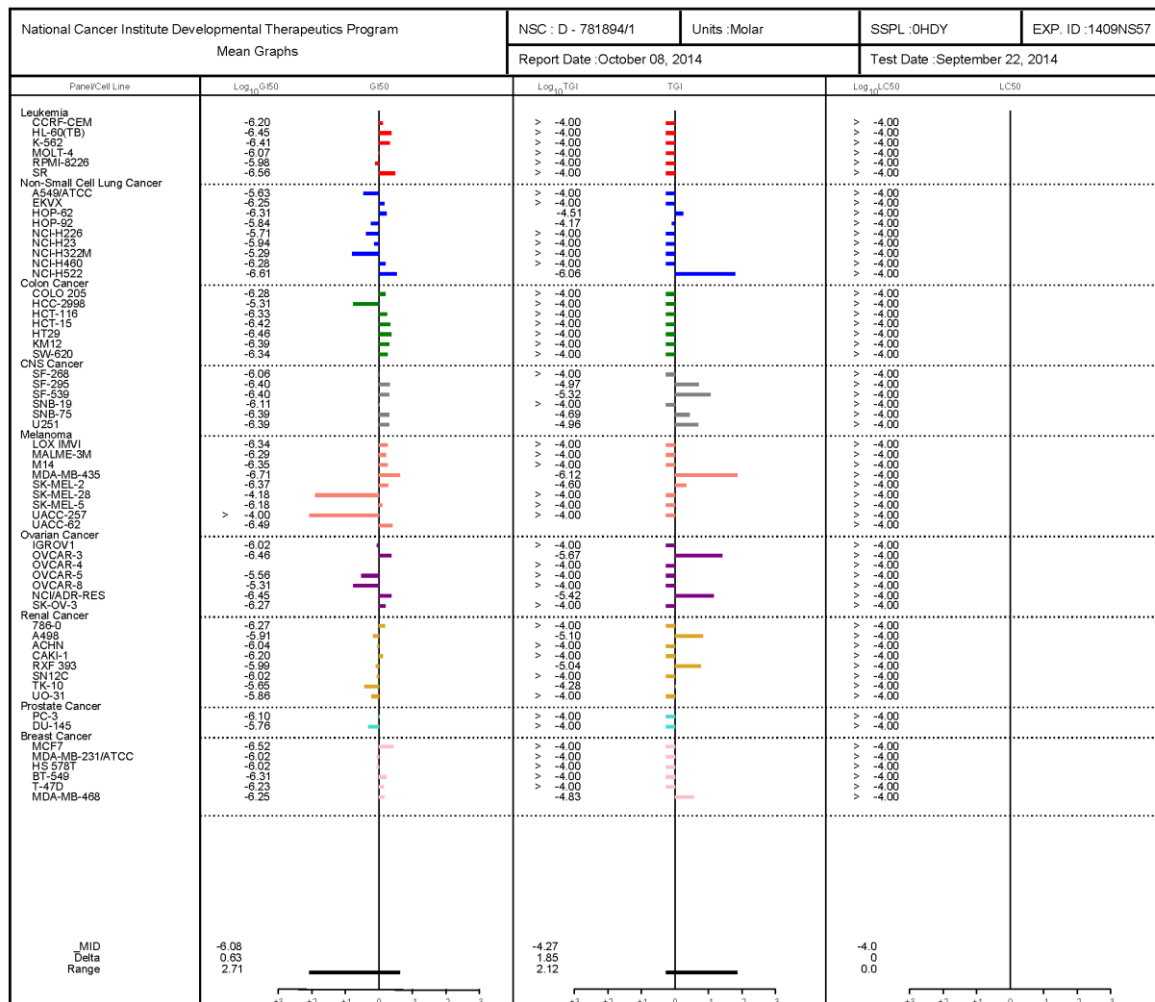


**Slika P7a.** Krive zavisnosti antiproliferativne aktivnosti od koncentracije jedinjenja **105** na 60 ćelijskih linija humanog kancera (SRB esej, NCI)





**Slika P7b.** Parametri dobijeni ispitivanjem zavisnosti antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **105** od koncentracije na 60 ćelijskih linija humanog kancera: GI<sub>50</sub>, TGI, LC<sub>50</sub> (SRB esej, NCI)



## 8. LITERATURA

- 
- <sup>1</sup> Salcedo-Sora, J. E.; Caamano-Gutierrez, E.; Ward, S. A.; Biagini, G. A. The proliferating cell hypothesis: a metabolic framework for *Plasmodium* growth and development. *Trends Parasitol.*, **2014**, *30*, 170–175.
- <sup>2</sup> Salanti, A.; Clausen, T. M.; Agerbæk, M. Ø.; Nakouzi, N. A.; Dahlbäck, M.; Oo, H. Z.; Lee, S.; Gustavsson, T.; Rich, J. R.; Hedberg, B. J.; Mao, Y.; Barington, L.; Pereira, M. A.; LoBello, J.; Endo, M.; Fazli, L.; Soden, J.; Wang, C. K.; Sander, A. F.; Dagil, R.; Thrane, S.; Holst, P. J.; Meng, L.; Favero, F.; Weiss, G. J.; Nielsen, M. A.; Freeth, J.; Nielsen, T. O.; Zaia, J.; Tran, N. L.; Trent, J.; Babcook, J. S.; Theander, T. G.; Sorensen, P. H.; Daugaard, M. Targeting Human Cancer by a Glycosaminoglycan Binding Malaria Protein. *Cancer Cell.* **2015**, *28*, 500–514.
- <sup>3</sup> Qin, L.; Chen, C.; Chen, L.; Xue, R.; Ou-Yang, M.; Zhou, C.; Zhao, S.; He, Z.; Xia, Y.; He, J.; Liu, P.; Zhong, N.; Chen, X. Worldwide malaria incidence and cancer mortality are inversely associated. *Infect. Agents Cancer*, **2017**, *12*:14.
- <sup>4</sup> Hooft van Huijsduijnen, R.; Guy, R. K.; Chibale, K.; Haynes, R. K.; Peitz, I.; Kelter, G.; Phillips, M. A.; Vennerstrom, J. L.; Yuthavong, Y.; Wells, T. N. C. Anticancer Properties of Distinct Antimalarial Drug Classes. *PLoS ONE*, **2013**, *8*(12):e82962.
- <sup>5</sup> Gurevin, E. G.; Kiyani, H. T.; Esener, O. B. B.; Aydinlik, S.; Uvez, A.; Ulukaya, E.; Dimas, K.; Armutak, E. I. Chloroquine Used in Combination with Chemotherapy Synergistically Suppresses Growth and Angiogenesis *In Vitro* and *In Vivo*. *Anticancer Res.*, **2018**, *38*, 4011–4020.
- <sup>6</sup> Cox-Singh, J.; Singh, B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends Parasitol.*, **2008**, *24*, 406–410.
- <sup>7</sup> Geleta, G.; Ketema, T. Severe Malaria Associated with *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* among Children in Pawe Hospital, Northwest Ethiopia, *Malar. Res. Treat.*, **2016**, *2016*, 1–7.
- <sup>8</sup> World Health Organization <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/> Pristupljeno je 5. februara 2019.
- <sup>9</sup> Centers for Disease Control and Prevention, <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html> Pristupljeno je 6. februara 2019.
- <sup>10</sup> World Health Organization <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/en/> Pristupljeno je 6. februara 2019.
- <sup>11</sup> Rossati, A.; Bargiacchi, O.; Kroumova, V.; Zaramella, M.; Caputo, A.; Garavelli, P. L. Climate, environment and transmission of malaria. *Infez. Med.*, **2016**, *24*, 93–104.
- <sup>12</sup> Tatem, A. J.; Jia, P.; Ordanovich, D.; Falkner, M.; Huang, Z.; Howes, R.; Hay, S. I.; Gething, P. W.; Smith, D. L. The geography of imported malaria to non-endemic countries: a meta-analysis of nationally reported statistics. *Lancet Infect. Dis.*, **2017**, *17*, 98–107.
- <sup>13</sup> Pierrotti, L. C.; Levi, M. E.; Di Santi, S. M.; Segurado, A. C.; Petersen, E. Malaria Disease Recommendations for Solid Organ Transplant Recipients and Donors. *Transplantation*, **2018**, *102*, 16–26.
- <sup>14</sup> Rai, P.; Majumdar, K.; Sharma, S.; Chauhan, R.; Chandra, J. Congenital malaria in a neonate: case report with a comprehensive review on differential diagnosis, treatment and prevention in Indian perspective. *J. Parasit. Dis.*, **2015**, *39*, 345–348

- 
- <sup>15</sup> Siciliano, G.; Alano, P. Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent *Plasmodium* in fundamental and applied research. *Front. Microbiol.*, **2015**, *6*:391.
- <sup>16</sup> Phillips, M. A.; Burrows, J. N.; Manyando, C.; van Huijsduijnen, R. H.; Van Voorhis, W. C.; Wells, T. N. C. Malaria. *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2017**, *3*:17050
- <sup>17</sup> Wunderlich, J.; Rohrbach, P.; Dalton, J. P. The malaria digestive vacuole. *Front. Biosci.*, **2012**, *S4*, 1424–1448.
- <sup>18</sup> Egan, T. J. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102*, 1288–1299.
- <sup>19</sup> World Health Organization. Severe malaria. *Trop. Med. Int. Health*, **2014**, *19*, Suppl. 1, 7–131.
- <sup>20</sup> White, N. J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar. J.*, **2011**, *10*:297.
- <sup>21</sup> Hosseini, S. M.; Feng, J. J. How Malaria Parasites Reduce the Deformability of Infected Red Blood Cells. *Biophys. J.*, **2012**, *103*, 1–10.
- <sup>22</sup> Cohen, C.; Karstaedt, A.; Frean, J.; Thomas, J.; Govender, N.; Prentice, E.; Dini, L.; Galpin, J.; Crewe-Brown, H. Increased Prevalence of Severe Malaria in HIV-Infected Adults in South Africa. *Clin. Infect. Dis.*, **2005**, *41*, 1631–1637.
- <sup>23</sup> Pace, D. Leishmaniasis, *J. Infect.*, **2014**, *69*, 10–18.
- <sup>24</sup> World Health Organization  
[https://www.who.int/neglected\\_diseases/news/Leishmaniasis-timeline-of-facts-and-the-quest-disease-control/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/news/Leishmaniasis-timeline-of-facts-and-the-quest-disease-control/en/) Pristupljeno je 8. februara 2019.
- <sup>25</sup> a) Ab Rahman, A. K.; Abdullah, F. H. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and malaria coinfection in an immigrant in the state of Terengganu, Malaysia: A case report. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **2011**, *44*, 72–76; b) Ferede, G.; Diro, E.; Getie, S.; Getnet, G.; Takele, Y.; Amsalu, A.; Wondimeneh, Y. Visceral Leishmaniasis-Malaria Coinfection and Their Associated Factors in Patients Attending Metema Hospital, Northwest Ethiopia: Suggestion for Integrated Vector Management. *Malaria Research and Treatment*, **2017**, *2017*, Article ID 6816913; c) Mohanna, M. A. B. Leishmaniasis, malaria, and schistosomiasis concurrently in an 8-year-old boy. *Saudi Med. J.*, **2015**, *36*, 494–496.
- <sup>26</sup> Pinna, R. A.; Silva-dos-Santos, D.; Perce-da-Silva, D. S.; Oliveira-Ferreira, J.; Villa-Verde, Dea M. S.; De Luca, P. M.; Banic, D. M. Malaria-Cutaneous Leishmaniasis Co-infection: Influence on Disease Outcomes and Immune Response. *Front. Microbiol.*, **2016**, *7*:982.
- <sup>27</sup> Maiga, H.; Lasry, E.; Diarra, M.; Sagara, I.; Bamadio, A.; Traore, A.; Coumare, S.; Bahonan, S.; Sangare, B.; Dicko, Y.; Diallo, N.; Tembely, A.; Traore, D.; Niangaly, H.; Dao, F.; Haidara, A.; Dicko, A.; Doumbo, O. K.; Djimde, A. A. Seasonal Malaria Chemoprevention with Sulphadoxine-Pyrimethamine and Amodiaquine Selects Pfdhfr-dhps Quintuple Mutant Genotype in Mali. *PLoS ONE*, **2016**, *11*:e0162718.
- <sup>28</sup> Chotsiri, P.; Zongo, I.; Milligan, P.; Compaore, Y. D.; Somé, A. F.; Chandramohan, D.; Hanpithakpong, W.; Nosten, F.; Greenwood, B.; Rosenthal, P. J.; White, N. J.; Ouédraogo, J-B.; Tarning, J. Optimal dosing of dihydroartemisinin-piperazine for seasonal malaria chemoprevention in young children. *Nat. Commun.*, **2019**, *10*:480.
- <sup>29</sup> Tangpukdee, N.; Duangdee, C.; Wilairatana, P.; Krudsood, S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J. Parasitol.*, **2009**, *47*, 93–102.
- <sup>30</sup> A-Elgayoum, S. M. E.; El-Rayah, E-A.; Giha, H. A. Towards a Noninvasive Approach to Malaria Diagnosis: Detection of Parasite DNA in Body Secretions and Surface Mucosa. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, *18*, 148–155.

- <sup>31</sup> Rao, P. N.; Uplekar, S.; Kayal, S.; Mallick, P. K.; Bandyopadhyay, N.; Kale, S.; Singh, O. P.; Mohanty, A.; Mohanty, S.; Wassmer, S. C.; Carltona, J. M. A Method for Amplicon Deep Sequencing of Drug Resistance Genes in *Plasmodium falciparum* Clinical Isolates from India. *J. Clin. Microbiol.*, **2016**, *54*, 1500–1511.
- <sup>32</sup> Wells, T. N. C.; van Huijsduijnen, R. H.; Van Voorhis, W. C. Malaria medicines: a glass half full? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2015**, *14*, 424–442.
- <sup>33</sup> Achan, J.; Talisuna, A. O.; Erhart, A.; Yeka, A.; Tibenderana, J. K.; Baliraine, F. N.; Rosenthal, P. J.; D'Alessandro, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria J.*, **2011**, *10*:144.
- <sup>34</sup> Deshpande, S.; Kuppast, B. 4-aminoquinolines: An Overview of Antimalarial Chemotherapy. *Med. Chem.*, **2016**, *6*, 1–11.
- <sup>35</sup> Sutanto, I.; Suprijanto, S.; Kosasih, A.; Dahlan, M. S.; Syafruddin, D.; Kusriastuti, R.; Hawley, W. A.; Lobo, N. F.; Ter Kuile, F. O. The Effect of Primaquine on Gametocyte Development and Clearance in the Treatment of Uncomplicated Falciparum Malaria With Dihydroartemisinin-Piperaquine in South Sumatra, Western Indonesia: An Open-Label, Randomized, Controlled Trial. *Clin. Infect. Dis.*, **2013**, *56*, 685–693.
- <sup>36</sup> Mushtaque, M.; Shahjahan. Reemergence of chloroquine (CQ) analogs as multi-targeting antimalarial agents: A review. *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, *90*, 280–295.
- <sup>37</sup> Chloroquine in WHO Model Prescribing Information – Drugs used in Parasitic Diseases, 2<sup>nd</sup> edition, World Health Organization, Geneva, 1995, 34–38.
- <sup>38</sup> Olliaro, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol. Ther.*, **2001**, *89*, 207–219.
- <sup>39</sup> O'Neill, P. M.; Barton, V. E.; Ward, S. A.; Chadwick, J. 4-Aminoquinolines: Chloroquine, Amodiaquine and Next-Generation Analogues in *Treatment and Prevention of Malaria: Antimalarial Drug Chemistry, Action and Use*. Staines, H. M.; Krishna, S., Eds., Springer: Bazel, Switzerland, 2012, pp 19–44.
- <sup>40</sup> Veignie, E.; Moreau, S. The mode of action of chloroquine. Non-weak base properties of 4-aminoquinolines and antimalarial effects on strains of *Plasmodium*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **1991**, *85*, 229–237.
- <sup>41</sup> Sidhu, A. B. S.; Verdier-Pinard, D.; Fidock, D. A. Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria Parasites Conferred by *pfcr* Mutations. *Science*, **2002**, *298*, 210–213.
- <sup>42</sup> Kuhlmann, F. M.; Fleckenstein, J. M. Antiparasitic Agents in *Infectious Diseases*. 4<sup>th</sup> edition, Cohen, J.; Powderly, W. G; Opal, S. M., Eds., Elsevier, 2017, pp1345–1372.
- <sup>43</sup> Price, R. N.; Nosten, F.; Luxemburger, C.; Ter Kuile, F. O.; Paiphun, L.; Chongsuphajaisiddhi, T.; White, N. J. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *The Lancet*, **1996**, *347*, 1654–1658.
- <sup>44</sup> Nosten, F.; White, N. J. Artemisinin-Based Combination Treatment of Falciparum Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2007**, *77*, 181–192.
- <sup>45</sup> Cui, L.; Su, X. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, **2009**, *7*, 999–1013.
- <sup>46</sup> Dondorp, A. M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyto, A. P.; Tarning, J.; Lwin, K. M.; Arie, 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.
- <sup>47</sup> Das, S.; Saha, B.; Hati, A. K.; Roy, S. Evidence of Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria in Eastern India. *N. Engl. J. Med.*, **2018**, *379*, 1962–1964.

- <sup>48</sup> Wells, T. N. C. Is the Tide Turning for New Malaria Medicines? *Science*, **2010**, *329*, 1153–1154.
- <sup>49</sup> Poonam, Gupta, Y.; Gupta, N.; Singh, S.; Wu, L.; Chhikara, B. S.; Rawat, M.; Rathi, B. Multistage inhibitors of the malaria parasite: Emerging hope for chemoprotection and malaria eradication. *Med. Res. Rev.*, **2018**, *38*, 1511–1535.
- <sup>50</sup> Phillips, M. A.; Lotharius, J.; Marsh, K.; White, J.; Dayan, A.; White, K. L.; Njoroge, J. W.; Mazouni, F. E.; Lao, Y.; Kokkonda, S.; Tomchick, D. R.; Deng, X.; Laird, T.; Bhatia, S. N.; March, S.; Ng, C. L.; Fidock, D. A.; Wittlin, S.; Lafuente-Monasterio, M.; Benito, F. J. G. Alonso, L. M. S.; Martinez, M. S.; Jimenez-Diaz, M. B.; Bazaga, S. F.; Angulo-Barturen, I.; Haselden, J. N.; Louttit, J.; Cui, Y.; Sridhar, A.; Zeeman, A-M.; Kocken, C.; Sauerwein, R.; Dechering, K.; Avery, V. M.; Duffy, S.; Delves, M.; Sinden, R.; Ruecker, A.; Wickham, K. S.; Rochford, R.; Gahagen, J.; Iyer, L.; Riccio, E.; Mirsalis, J.; Bathhurst, I.; Rueckle, T.; Ding, X.; Campo, B.; Leroy, D.; Rogers, M. J.; Rathod, P. K.; Burrows, J. N.; Charman, S. A. A long-duration dihydroorotate dehydrogenase inhibitor (DSM265) for prevention and treatment of malaria. *Sci. Transl. Med.*, **2015**, *7*:296ra111.
- <sup>51</sup> Llanos-Cuentas, A.; Casapia, M.; Chuquiyauri, R.; Hinojosa, J-C.; Kerr, N.; Rosario, M.; Toovey, S.; Arch, R. H.; Phillips, M. A.; Rozenberg, F.D.; Bath, J.; Ng, C. L.; Cowell, A. N.; Winzeler, E. A.; Fidock, D. A.; Baker, M.; Möhrle, J. J.; Van Huijsduijnen, R. H.; Gobeau, N.; Araeipour, N.; Andenmatten, N.; Rückle, T.; Duparc, S. Antimalarial activity of single-dose DSM265, a novel plasmodium dihydroorotate dehydrogenase inhibitor, in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax* malaria infection: a proof-of-concept, open-label, phase 2a study. *Lancet Infect. Dis.*, **2018**, *18*, 874–883.
- <sup>52</sup> Rottmann, M.; McNamara, C.; Yeung, B. K. S.; Lee, M. C. S.; Zou, B.; Russell, B.; Seitz, P.; Plouffe, D. M.; Dharia, N. V.; Tan, J.; Cohen, S. B.; Spencer, K. R.; González-Páez, G. E.; Lakshminarayana, S. B.; Goh, A.; Suwanarusk, R.; Jegla, T.; Schmitt, E. K.; Beck, H-P.; Brun, R.; Nosten, F.; Renia, L.; Dartois, V.; Keller, T. H.; Fidock, D. A.; Winzeler, E. A.; Diagana, T. T. Spiroindolones, a new and potent chemotype for the treatment of malaria. *Science*, **2010**, *329*, 1175–1180.
- <sup>53</sup> Spillman, N. J.; Allen, R. J.W.; McNamara, C. W.; Yeung, B. K. S.; Winzeler, E. A.; Diagana, T. T.; Kirk, K. Na<sup>+</sup> Regulation in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Involves the Cation ATPase PfATP4 and Is a Target of the Spiroindolone Antimalarials. *Cell Host Microbe*, **2013**, *13*, 227–237.
- <sup>54</sup> Das, S.; Bhatanagar, S.; Morrissey, J. M.; Daly, T. M.; Burns, Jr, J. M.; Coppens, I.; Vaidya, A. B. Na<sup>+</sup> Influx Induced by New Antimalarials Causes Rapid Alterations in the Cholesterol Content and Morphology of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog.*, **2016**, *12*: e1005647.
- <sup>55</sup> Meister, S.; Plouffe, D. M.; Kuhen, K. L.; Bonamy, G. M. C.; Wu, T.; Barnes, S.W.; Bopp, S. E.; Borboa, R.; Bright, A. T.; Che, J.; Cohen, S.; Dharia, N. V.; Gagaring, K.; Gettayacamin, M.; Gordon, P.; Groessler, T.; Kato, N.; Lee, M. C. S.; McNamara, C. W.; Fidock, David A.; Nagle, A.; Nam, T.; Richmond, W.; Roland, J.; Rottmann, M.; Zhou, B.; Froissard, P.; Glynn, R. J.; Mazier, D.; Sattabongkot, J.; Schultz, P.G.; Tuntland, T.; Walker, J. R.; Zhou, Y.; Chatterjee, A.; Diagana, T. T.; Winzeler, E. A. Imaging of *Plasmodium* liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science*, **2011**, *334*, 1372–1377.
- <sup>56</sup> Kuhen, K. L.; Chatterjee, A. K.; Rottmann, M.; Gagaring, K.; Borboa, R.; Buenviaje, J.; Chen, Z.; Francek, C.; Wu, T.; Nagle, A.; Barnes, S. W.; Plouffe, D.; Lee, M. C. S.;

---

Fidock, D. A.; Graumans, W.; Van de Vegte-Bolmer, M.; Van Gemert, G. J.; Wirjanata, G.; Sebayang, B.; Marfurt, J.; Russell, B.; Suwanarusk, R.; Price, R. N.; Nosten, F.; Tungtaeng, A.; Gettayacamin, M.; Sattabongkot, J.; Taylor, J.; Walker, J. R.; Tully, D.; Patra, K. P.; Flannery, E. L.; Vinetz, J. M.; Renia, L.; Sauerwein, R. W.; Winzeler, E. A.; Glynn, R. J.; Diagana, T. T. KAF156 Is an Antimalarial Clinical Candidate with Potential for Use in Prophylaxis, Treatment, and Prevention of Disease Transmission. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2014**, *58*, 5060–5067.

<sup>57</sup> Capela, R.; Cabal, G. G.; Rosenthal, P. J.; Gut, J.; Mota, M. M.; Moreira, R.; Lopes, F.; Prudencio, M. Design and Evaluation of Primaquine-Artemisinin Hybrids as a Multistage Antimalarial Strategy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, *55*, 4698–4706.

<sup>58</sup> Miranda, D.; Capela, R.; Albuquerque, I. S.; Meireles, P.; Paiva, I.; Nogueira, F.; Amewu, R.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Oliveira, R.; Mota, M. M.; Moreira, R.; Marti, F.; Prudêncio, M.; O'Neill, P. M.; Lopes, F. Novel Endoperoxide-Based Transmission-Blocking Antimalarials with Liver- and Blood-Schizontocidal Activities. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2014**, *5*, 108–112.

<sup>59</sup> Chavain, N.; Biot, C. Organometallic Complexes: New Tools for Chemotherapy. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 2729–2745.

<sup>60</sup> Dubar, F.; Khalife, J.; Brocard, J.; Dive, D.; Biot, C. Ferroquine, an Ingenious Antimalarial Drug –Thoughts on the Mechanism of Action. *Molecules*, **2008**, *13*, 2900–2907.

<sup>61</sup> Zhang, Y-K.; Plattner, J. J.; Easom, E. E.; Jacobs, R. T.; Guo, D.; Freund, Y. R.; Berry, P.; Ciaravino, V.; Erve, J. C. L.; Rosenthal, P. J.; Campo, B.; Gamo, F-J.; Sanz, L. M.; Cao, J. Benzoxaborole Antimalarial Agents. Part 5. Lead Optimization of Novel Amide Pyrazinyloxy Benzoxaboroles and Identification of a Preclinical Candidate. *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 5889–5908.

<sup>62</sup> Vennerstrom, J. L.; Makler, M. T.; Angerhofer, C. K.; Williams, J. A. Antimalarial Dyes Revisited: Xanthenes, Azines, Oxazines, and Thiazines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1995**, *39*, 2671–2677

<sup>63</sup> Blank, O.; Davioud-Charvet, E.; Elhabiri, M. Interactions of the Antimalarial Drug Methylene Blue with Methemoglobin and Heme Targets in *Plasmodium falciparum*: A Physico-Biochemical Study. *Antiox. Redox Signal.*, **2012**, *17*, 544–554.

<sup>64</sup> Schirmer, R. H.; Coulibaly, B.; Stich, A.; Scheiwein, M.; Merkle, H.; Eubel, J.; Becker, K.; Becher, H.; Müller, O.; Zich, T.; Schiek, W.; Kouyaté, B. Methylene blue as an antimalarial agent. *Redox Report*, **2003**, *8*, 272–275.

<sup>65</sup> Coulibaly, B.; Zoungana, A.; Mockenhaupt, F. P.; Schirmer, R. H.; Klose, C.; Mansmann, U.; Meissner, P. E.; Müller, O. Strong Gametocytocidal Effect of Methylene Blue-Based Combination Therapy against *Falciparum Malaria*: A Randomised Controlled Trial. *PLoS ONE*, **2009**, *4*(5): e5318

<sup>66</sup> Kindermans, J-M.; Pilloy, J.; Olliaro, P.; Gomes, M. Ensuring sustained ACT production and reliable artemisinin supply. *Malaria J.*, **2007**, *6*:125.

<sup>67</sup> Vennerstrom, J. L.; Arbe-Barnes, S.; Brun, R.; Charman, S. A.; Chiu, F. C. K.; Chollet, J.; Dong, Y.; Dorn, A.; Hunziker, D.; Matile, H.; McIntosh, K.; Padmanilayam, M.; Santo Tomas, J.; Scheurer, C.; Scorneaux, B.; Tang, Y.; Urwyler, H.; Wittlin, S.; Charman, W. N. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature*, **2004**, *430*, 900–904.

<sup>68</sup> Valecha, N.; Looareesuwan, S.; Martensson, A.; Abdulla, S. M.; Krudsood, S.; Tangpukdee, N.; Mohanty, S.; Mishra, S.K.; Tyagi, P. K.; Sharma, S. K.; Moehrle, J.; Gautam, A.; Roy, A.; Paliwal, J.K.; Kothari, M.; Saha, N.; Dash, A. P.; Björkman, A.

---

Arterolane, a New Synthetic Trioxolane for Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria: A Phase II, Multicenter, Randomized, Dose-Finding Clinical Trial. *Clin. Infect. Dis.*, **2010**, *51*, 684–691.

<sup>69</sup> Olliaro, P.; Wells, T. N. C. The Global Portfolio of New Antimalarial Medicines Under Development. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2009**, *85*, 584–595.

<sup>70</sup> Charmana, S. A.; Arbe-Barnesb, S.; Bathurstc, I. C.; Brund, R.; Campbella, M.; Charmana, W. N.; Chiua, F. C. K.; Cholletd, J.; Craftc, J. C.; Creeka, D. J.; Dongf, Y.; Matileg, H.; Maurerd, M.; Morizzia, J.; Nguyena, T.; Papastogiannidisd, P.; Scheurerd, C.; Shackleforda, D. M.; Sriraghavanf, K.; Stingelina, L.; Tangf, Y.; Urwylerh, H.; Wangf, X.; Whitea, K. L.; Wittlind, S.; Zhouf, L.; Vennerstrom, J. L. Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *PNAS*, **2011**, *108*, 4400–4405.

<sup>71</sup> NIH ClinicalTrials. gov

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02497612?term=NCT02497612&cond=malaria&rank=1>. Pristupljeno je 21. februara 2019. godine

<sup>72</sup> Mullard, A.; Malaria medicine box expands. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2018**, *17*, 693–695.

<sup>73</sup> Ebstie, Y. A.; Abay, S. M.; Tadesse, W. T.; Ejigu, D. A. Tafenoquine and its potential in the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria: the evidence to date. *Drug Des. Devel. Ther.*, **2016**, *10*, 2387–2399.

<sup>74</sup> Dagnogo, O.; Ako, A. B.; Ouattara, L.; Dago, N. D.; Coulibaly, D. N.; Touré, A. O.; Djaman, J. A. Towards a re-emergence of chloroquine sensitivity in Côte d'Ivoire? *Malar J.*, **2018**, *17*:413.

<sup>75</sup> Achungu, C. R.; Nkuo-Akenji, T.; Tobias, A.; Samuel, W. Re-Emergence of Chloroquine Sensitive *Plasmodium falciparum* after Several Years of Chloroquine Withdrawal in Bamenda, North West Cameroon. *EC Microbiology*. **2018**, *14*, 831–836.

<sup>76</sup> Wangai, L. N.; Kimani, F.T.; Omar, S.A.; Karanja, S.M.; Nderu, D.W.; Magoma, G.; Mutua, D. Chloroquine resistance status a decade after: Re-emergence of sensitive *Plasmodium falciparum* strains in malaria endemic and epidemic areas in Kenya. *J. Protozool. Res.*, **2011**, *21*, 20–29.

<sup>77</sup> Hocart, S. J.; Liu, H.; Deng, H.; De, D.; Krogstad, F. M.; Krogstad, D. J. 4-Aminoquinolines Active against Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum*: Basis of Antiparasite Activity and Quantitative Structure-Activity Relationship Analyses. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, *55*, 2233–2244.

<sup>78</sup> De, D.; Krogstad, F. M.; Byers, L. D.; Krogstad, D. J. Structure-Activity Relationships for Antiplasmodial Activity among 7-Substituted 4-Aminoquinolines. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4918–4926.

<sup>79</sup> a) Riccio, E. S.; Lee, P.S.; Winegar, R. A.; De, D.; Krogstad, D. J.; De, D.; Mirsalis, J. C. Genetic toxicology testing of the antimalarial drug chloroquine and a new analog, AQ-13. *Environ. Mol. Mutagen.*, **2001**, *38*, 69–79. b) Ramanathan-Girish, S.; Catz, P.; Creek, M. R.; Wu, B.; Thomas, D.; Krogstad, D. J.; De, D.; Mirsalis, J. C.; Green, C. E. Pharmacokinetics of the Antimalarial Drug, AQ-13, in Rats and Cynomolgus Macaques. *Int. J. Toxicol.*, **2004**, *23*, 179–189.

<sup>80</sup> Koita, O. A.; Sangaré, L.; Miller, H. D.; Sissako, A.; Coulibaly, M.; Thompson, T. A.; Fongoro, S.; Diarra, Y.; Ba, M.; Maiga, A.; Diallo, B.; Mushatt, D. M.; Mather, F. J.; Shaffer, J. G.; Anwar, A. H.; Krogstad, D. J. AQ-13, an investigational antimalarial, versus artemether plus lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium*

---

*falciparum* malaria: a randomised, phase 2, non-inferiority clinical trial. *Lancet Infect. Dis.*, **2017**, *17*, 1266–1275.

<sup>81</sup> Pérez, B. C.; Teixeira, C.; Albuquerque, I. S.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Gomes, J. R. B.; Prudêncio, M.; Gomes, P. N-Cinnamoylated Chloroquine Analogues as Dual-Stage Antimalarial Leads. *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 556–567.

<sup>82</sup> Lödigea, M.; Lewis, M. D.; Paulsen, E. S.; Eschg, H. L.; Pradeld, G.; Lehmann, L.; Brune, R.; Bringmann, G.; Mueller, A.-K. A primaquine–chloroquine hybrid with dual activity against *Plasmodium* liver and blood stages. *Int. J. Med. Microbiol.*, **2013**, *303*, 539–547.

<sup>83</sup> 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.

<sup>84</sup> Sáenz, F. E.; Mutka, T.; Udenze, K.; Oduola, A. M. J.; Kylea, D. E. Novel 4-Aminoquinoline Analogs Highly Active against the Blood and Sexual Stages of *Plasmodium* *In Vivo* and *In Vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2012**, *56*, 4685–4692.

<sup>85</sup> National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. Understanding Cancer. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/> Pristupljeno je 2. aprila 2019. godine

<sup>86</sup> World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>

Pristupljeno je 3. marta 2019. godine

<sup>87</sup> Patrick, G. L. Anti Cancer Agents in *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 5<sup>th</sup> edition, Oxford, United Kingdom, 2013, 514.

<sup>88</sup> Nelson, S. M.; Ferguson, L. R.; Denny, W. A. DNA and the chromosome – varied targets for chemotherapy. *Cell Chromosome*, **2004**, *3*:2.

<sup>89</sup> Coleman, W. B.; Tsongalis, G. J. Molecular mechanisms of human carcinogenesis in *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*. Bignold, L. P., Ed., Birkhäuser Verlag/Switzerland, 2006, 321–349.

<sup>90</sup> Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, **2000**, *100*, 57–70.

<sup>91</sup> Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **2011**, *144*, 646–674.

<sup>92</sup> Bissell, M. J.; Radisky, D. Putting Tumors in Context. *Nat. Rev. Cancer*. **2001**, *1*, 46–54.

<sup>93</sup> Dagogo-Jack, I.; Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2018**, *15*, 81–94.

<sup>94</sup> Avendaño, C.; Menéndez, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. 2<sup>nd</sup> edition, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2015

<sup>95</sup> Rang, H. P.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson, G. *Rang and Dale's Pharmacology*, 8<sup>th</sup> edition, Elsevier, 2016, 676–691.

<sup>96</sup> Padma, V. V. An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*, **2015**, *5*, 1–6.

<sup>97</sup> Rubin, E. H.; Hait, W. N.; Intercalating Drugs that Target Topoisomerases in *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6<sup>th</sup> edition, Kufe, D. W.; Pollock, R. E.; Weichselbaum, R. R. et al., Eds., Hamilton (ON): BC Decker, 2003.



- 
- <sup>98</sup> Siddik, Z. H. Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: DNA-Interactive Alkylating Agents and Antitumour Platinum-Based Drugs in *The Cancer Handbook*, 1<sup>st</sup> Edition. Alison, M. R., Ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- <sup>99</sup> Nabors, L. B.; Surboeck, B.; Grisold, W. Complications from pharmacotherapy in *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 134, Gliomas, Berger, M.S.; Weller, M., Eds, Elsevier B.V., 2016.
- <sup>100</sup> Dasari, S.; Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.*, **2014**, *0*, 364–378.
- <sup>101</sup> Kaye, S. B. New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *Br. J. Cancer*, **1998**, *78*, 1–7.
- <sup>102</sup> Bhullar, K. S.; Lagarón, N. O.; McGowan, E. M.; Parmar, I.; Jha, A.; Hubbard, B. P.; Rupasinghe, H. P. V. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol. Cancer*, **2018**, *17*: 48.
- <sup>103</sup> Peddi, P. F. Hormone receptor positive breast cancer: state of the art. *Curr. Opin. Obstet Gynecol.*, **2018**, *30*, 51–54.
- <sup>104</sup> Pufall, M. A. Glucocorticoids and Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2015**, *872*, 315–333.
- <sup>105</sup> Zhang, H.; Chen, J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *J. Cancer*, **2018**, *9*, 1773–1781.
- <sup>106</sup> Cook, A. M.; Lesterhuis, W. J.; Nowak, A. K.; Lake, R. A. Chemotherapy and immunotherapy: mapping the road ahead. *Curr. Opin. Immunol.*, **2016**, *39*, 23–29.
- <sup>107</sup> Gascoigne, K. E.; Taylor, S. S. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J. Cell Sci.*, **2009**, *122*, 2579–2585.
- <sup>108</sup> Wong, E. V. Cell Cycle: Life cycle of the cell and Gametogenesis in *Cells: Molecules and Mechanisms*, Axolotl Academic Publishing Company, Louisville, KY, 2009, pp. 229–252.
- <sup>109</sup> Dickson, M. A.; Schwartz, G. K. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Curr. Oncol.*, **2009**, *16*, 36–43.
- <sup>110</sup> Florian, S.; Mitchison, T. J. Anti-Microtubule Drugs in *The Mitotic Spindle Methods and Protocols*, Eds. Chang, P.; Ohi, R. Springer Science+Business Media, New York, 2016, pp. 403–422.
- <sup>111</sup> Negi, A. S.; Gautam, Y.; Sarfaraz, A.; Chanda, D.; Luqman, S.; Sarkar, J.; Khan, F.; Konwar, R. Natural antitubulin agents: Importance of 3,4,5-trimethoxyphenyl fragment. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 373–389.
- <sup>112</sup> Loong, H. H.; Yeo, W. Microtubule-targeting agents in oncology and therapeutic potential in hepatocellular carcinoma. *OncoTargets Ther.*, **2014**, *7*, 575–585.
- <sup>113</sup> Galluzzi, L.; Vitale, I. et al., Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.*, **2018**, *25*, 486–541.
- <sup>114</sup> Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, **2007**, *35*, 495–516.
- <sup>115</sup> Taylor, R. C.; Cullen, S. P.; Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2008**, *9*, 231–241.
- <sup>116</sup> Bratton, D. L.; Fadok, V. A.; Richter, D. A.; Kailey, J. M.; Guthrie, L. A.; Henson, P. M. Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-mediated Nonspecific Flip-Flop and Is Enhanced by Loss of the Aminophospholipid Translocase. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 26159–26165.
- <sup>117</sup> Ozaki, T.; Nakagawara, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers*, **2011**, *3*, 994–1013.

- 
- <sup>118</sup> Kumari, S.; Badana, A. K.; Mohan, M. G.; Shailender, G.; Malla, R. R. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark. Insights*, **2018**, *13*, 1–9.
- <sup>119</sup> Sosaa, V.; Molinéa, T.; Somozaa, R.; Paciuccib, R.; Kondohc, H.; Lleonarta, M. E. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res. Rev.*, **2013**, *12*, 376–390.
- <sup>120</sup> Wang, J.; Yi, J. Cancer cell killing via ROS To increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol. Ther.*, **2008**, *7*, 1875–1884.
- <sup>121</sup> Sullivan, L. B.; Chandel, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.*, **2014**, *2*:17.
- <sup>122</sup> a) Ishikawa, K.; Takenaga, K.; Akimoto, M.; Koshikawa, N.; Yamaguchi, A.; Imanishi, H.; Nakada, K.; Honma, Y.; Hayashi, J-I. ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. *Science*, **2008**, *320*, 661–664. b) Ferraro, D.; Corso, S.; Fasano, E.; Panieri, E.; Santangelo, R.; Borrello, S.; Giordano, S.; Pani, G.; Galeotti, T. Pro-metastatic signaling by c-Met through RAC-1 and reactive oxygen species (ROS). *Oncogene*, **2006**, *25*, 3689–3698.
- <sup>123</sup> Neal, C. P.; Berry, D. P. Basic principles of the molecular biology of cancer II: angiogenesis, invasion and metastasis. *Surgery*, **2006**, *24*, 120–125.
- <sup>124</sup> Guan, X.; Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin. B*, **2015**, *5*, 402–418.
- <sup>125</sup> Lu, D-Y.; Lu, T-R.; Xu, B., ; Che, J-Y.; Wu, S-Y.; Wu, H-Y.; Yarla, N. S. Anti-Metastatic Drug Developments: Work Out towards New Direction. *Med. Chem.*, **2018**, *8*, 192–196.
- <sup>126</sup> Anjou, K.; von Sydow, E. The Aroma of Cranberries. *Acta Chem. Scand.*, **1967**, *21*, 2076–2082.
- <sup>127</sup> White, E. H.; McCapra, F.; Field, G. F.; McElroy, W. D. The structure and synthesis of firefly luciferin. *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, 2402–2403.
- <sup>128</sup> Stierle, A. A.; Cardellina II, J. H. Benzothiazoles from a putative bacterial symbiont of the marine sponge *Tedania ignis*. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 4847–4848.
- <sup>129</sup> Chill, L.; Rudi, A.; Benayahu, Y.; Kashman, Y. Violatinctamine, a new heterocyclic compound from the marine tunicate *Cystodytes cf. violatinctus*. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 7925–7928.
- <sup>130</sup> Gunawardand, G. P.; Kohmoto, S., Burres, N. S. New cytotoxic acridine alkaloids from two deep water marine sponges of the family *Pachustrellidae*. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 4359–4362.
- <sup>131</sup> Scheetz II, M. E.; Carlson, D. G.; Schinitski, M.R. Frentizole, a novel immunosuppressive, and azathioprine: their comparative effects on host resistance to *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, herpes simplex virus, and influenza (Ann Arbor) virus. *Infect. Immun.*, **1977**, *15*, 145–148.
- <sup>132</sup> Jimonet, P.; Audiau, F.; Barreau, M.; Blanchard, J-C.; Boireau, A.; Bour, Y.; Coléno, M-A.; Doble, A.; Doerflinger, G.; Huu, C.D.; Donat, M-H.; Duchesne, J. M.; Ganil, P.; Guérémy, C.; Honoré, E.; Just, B.; Kerphirique, R.; Gontier, S.; Hubert, P.; Laduron, P. M.; Blevet, J. L.; Meunier, M.; Miquet, J-M.; Nemecek, C.; Pasquet, M.; Piot, O.; Pratt, J.; Rataud, J.; Reibaud, M.; Stutzmann, J-M.; Mignani, S. Riluzole series. Synthesis and in vivo “Antigliutamate” activity of 6-Substituted-2-benzothiazolamines and 3-Substituted-2-iminobenzothiazolines, *J. Med.Chem.*, **1999**, *42*, 2828–2843.
- <sup>133</sup> Inskip, P. B.; Reed, A. E.; Ronfeld, R. A. Pharmacokinetics of Zopolrestat, a Carboxylic Acid Aldose Reductase Inhibitor, in Normal and Diabetic Rats. *Pharm. Res.*, **1991**, *8*, 1511–1515.

- <sup>134</sup> Biancalana, M.; Koide, S. Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2010**, *1804*, 1405–1412.
- <sup>135</sup> Keri, R. S.; Patil, M. R.; Patil, S. A.; Budagumpi, S. A comprehensive review in current developments of benzothiazole based molecules in medicinal chemistry. *Eur. J. Med. Chem.*; **2015**, *89*, 207–251.
- <sup>136</sup> a) Singh, M. K.; Tilak, R.; Nath, G.; Awasthi, S. K.; Agarwal, A. Design, synthesis and antimicrobial activity of novel benzothiazole analogs. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 635–644. b) Ouyanga, L.; Huangb, Y.; Zhaoa, Y.; He, G.; Xiea, Y.; Liua, J.; Hea, J.; Liua, B.; Wei, Y. Preparation, antibacterial evaluation and preliminary structure–activity relationship (SAR) study of benzothiazol- and benzoxazol-2-amine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 3044–3049.
- <sup>137</sup> Pitta, E.; Geronikaki, A.; Surmava, S.; Eleftheriou, P.; Mehta, V. P.; Van der Eycken, E. V. Synthesis and HIV-1 RT inhibitory action of novel (4/6-substituted benzo[d]thiazol-2-yl)thiazolidin-4-ones. Divergence from the non-competitive inhibition mechanism. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*, 113–122.
- <sup>138</sup> a) Ongarora, D. S. B.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Masimirembwa, C. N.; Chibale, K. Benzoheterocyclic amodiaquine analogues with potent antiplasmodial activity: Synthesis and pharmacological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 5046–5050. b) Ge, J-F.; Zhang, Q-Q.; Lu, J-M.; Kaiser, M.; Wittlin, S.; Brunb, R.; Ihara, M. Synthesis of cyanine dyes and investigation of their in vitro antiprotozoal activities. *Med. Chem. Commun.*, **2012**, *3*, 1435–1442. c) Burger, A.; Sawhey, S.N. Antimalarials. III. Benzothiazole amino alcohols, *J. Med. Chem.*, **1968**, *11*, 270–273. d) Dar, A. A.; Shadab, M.; Khan, S; Ali, N.; Khan, A. T. One-Pot Synthesis and Evaluation of Antileishmanial Activities of Functionalized S-Alkyl/Aryl Benzothiazole-2-carbothioate Scaffold. *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, (8), 3149–3160. e) Tapia, R.A.; Prieto, Y.; Pautet, F.; Domard, M.; Sarciron, M.; Walchshofer, N.; Fillion, H. Synthesis and antileishmanial activity of indoloquinones containing a fused benzothiazole ring, *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 4005–4010.
- <sup>139</sup> Kamal, A.; Syed, M. A. H.; Mohammed, S. M. Therapeutic potential of benzothiazoles: a patent review (2010 - 2014). *Expert Opin. Ther. Patents*, **2014**, *25*, 335–349.
- <sup>140</sup> Stevens, M. F. G.; McCall, C. J.; Lelieveld, P.; Alexander, P.; Richter, A.; Daviess, D. E. Structural Studies on Bioactive Compounds. 23. Synthesis of Polyhydroxylated 2-Phenylbenzothiazoles and a Comparison of Their Cytotoxicities and Pharmacological Properties with Genistein and Quercetin. *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 1689–1695.
- <sup>141</sup> Shi, D-F.; Bradshaw, T. D.; Wrigley, S.; McCall, C. J.; Lelieveld, P.; Fichtner, I.; Stevens, M. F. G. Antitumor Benzothiazoles. 3. Synthesis of 2-(4-Aminophenyl)benzothiazoles and Evaluation of Their Activities against Breast Cancer Cell Lines *in Vitro* and *in Vivo*. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 3375–3384.
- <sup>142</sup> Bradshaw, T.D.; Stevens, M.F.G.; Westwell, A.D. The Discovery of the Potent and Selective Antitumour Agent 2-(4-Amino-3-methylphenyl)benzothiazole (DF 203) and Related Compounds. *Curr. Med. Chem.*, **2001**, *8*, 203–210.
- <sup>143</sup> Bradshaw, T.D.; Bibby, M. C.; Double, J. A.; Fichtner, I.; Cooper, P. A.; Alley, M. C.; Donohue, S.; Stinson, S. F.; Tomaszewski, J. E.; Sausville, E. A.; Stevens. M. F. G. Preclinical Evaluation of Amino Acid Prodrugs of Novel Antitumor 2-(4-Amino-3-Methylphenyl)Benzothiazoles. *Mol. Cancer Ther.*, **2002**, *1*, 239–246.

- <sup>144</sup> Leong, C. O.; Suggitt, M.; Swaine, D. J.; Bibby, M. C.; Stevens, M. F. G.; Bradshaw, T. D. *In vitro*, *in vivo*, and *in silico* analyses of the antitumor activity of 2-(4-amino-3-methylphenyl)-5-fluorobenzothiazoles. *Mol. Cancer Ther.*, **2004**, *3*, 1565–1575.
- <sup>145</sup> a) Pinar, A.; Yurdakul, P.; Yildiz, I.; Temiz-Arpaci, O.; Acan, N. L.; Aki-Sener, E.; Yalcin, I. Some fused heterocyclic compounds as eukaryotic topoisomerase II inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, *317*, 670–674. b) Abdel-Aziz, M.; Matsuda, K.; Otsuka, M.; Uyeda, M.; Okawara, T.; Suzuki, K. Inhibitory activities against topoisomerase I & II by polyhydroxybenzoyl amide derivatives and their structure–activity relationship. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 1669–1672.
- <sup>146</sup> Kamal, A.; Mallareddy, A.; Suresh, P.; Shaik, T. B.; Lakshma Nayak, V.; Kishor, C.; Shetti, R. V.; Sankara Rao, N.; Tamboli, J. R.; Ramakrishna, S.; Addlagatta, A. Synthesis of chalcone-amidobenzothiazole conjugates as antimitotic and apoptotic inducing agents. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 3480–3492.
- <sup>147</sup> Kamal, A.; Sultana, F.; Ramaiah, M. J.; Srikanth, Y. V. V.; Viswanath, A.; Kishor, C.; Sharma, P.; Pushpavalli, S. N. C. V. L.; Addlagatta, A.; Pal-Bhadra, M. 3-Substituted 2-Phenylimidazo[2,1-b]benzothiazoles: Synthesis, Anticancer Activity, and Inhibition of Tubulin Polymerization. *Chem. Med. Chem.*, **2012**, *7*, 292–300.
- <sup>148</sup> a) Lei, Q.; Zhang, L.; Xia, Y.; Ye, T.; Yang, F.; Zhu, Y.; Song, X.; Wang, N.; Xu, Y.; Liua, X.; Yu, L. A novel benzothiazole derivative SKLB826 inhibits human hepatocellular carcinoma growth via inducing G2/M phase arrest and apoptosis. *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 41341–41351. b) Kamal, A.; Faazil, S.; Ramaiah, M. J.; Ashraf, M.; Balakrishna, M.; Pushpavalli, S. N. C. V. L.; Patel, N.; Pal-Bhadra, M. Synthesis and study of benzothiazole conjugates in the control of cell proliferation by modulating Ras/MEK/ERK-dependent pathway in MCF-7 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 5733–5739. c) Xuejiao, S.; Yong, X.; Ningyu, W.; Lidan, Z.; Xuanhong, S.; Youzhi, X.; Tinghong, Y.; Yaojie, S.; Yongxia, Y.; Luoting, Y. A novel benzothiazole derivative YLT322 induces apoptosis via the mitochondrial apoptosis pathway *in vitro* with antitumor activity in solid malignancies. *PLoS One*, **2013**, *8*, e63900. d) Corbo, F.; Carocci, A.; Armenise, D.; De Laurentis, N.; Laghezza, A.; Loiodice, F.; Ancona, P.; Muraglia, M.; Pagliarulo, V.; Franchini, C.; Catalano, A. Antiproliferative activity evaluation of a series of N-1,3-benzothiazole-2-ylbenzamides as novel apoptosis inducers. *J. Chem.*, 2016, 1–5.
- <sup>149</sup> Solomon, V. R.; Lee, H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur. J. Pharmacol.*, **2009**, *625*, 220–233.
- <sup>150</sup> Golden, E. B.; Cho, H.-Y.; Hofman, F. M.; Louie, S. G.; Schönthal, A. H.; Chen, T. C. Quinoline-based antimalarial drugs: a novel class of autophagy inhibitors. *Neurosurg. Focus*, **2015**, *38*, E12.
- <sup>151</sup> Kondratskiy, A.; Kondratska, K.; Abeele, F. V.; Gordienko, D.; Dubois, C.; Toillon, R.-A.; Slomianny, C.; Lemièrre, S.; Delcourt, P.; Dewailly, E.; Skryma, R.; Biot, C.; Prevarskaya, N. Ferroquine, the next generation antimalarial drug, has antitumor activity. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 15896.
- <sup>152</sup> Yamagishi, T.; Sahni, S.; Sharp, D. M.; Arvind, A.; Jansson, P. J.; Richardson, D. R. P-glycoprotein Mediates Drug Resistance via a Novel Mechanism Involving Lysosomal Sequestration. *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*, 31761–31771.
- <sup>153</sup> Li, Y.; Sun, Y.; Jing, L.; Wang, J.; Yan, Y.; Feng, Y.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Ma, L.; Diao, A. Lysosome Inhibitors Enhance the Chemotherapeutic Activity of Doxorubicin in HepG2 Cells. *Chemotherapy*, **2017**, *62*, 85–93.

- <sup>154</sup> a) Koo, J-S.; Choi, W-C.; Rhee, Y-H.; Lee, H-J.; Lee, E-O.; Ahn, K. S.; Bae, H-S.; Ahn, K-S.; Kang, J-M.; Choi, S-U.; Kim, M. O.; Lu, J.; Kim, S-H. Quinoline derivative KB3-1 potentiates paclitaxel induced cytotoxicity and cycle arrest via multidrug resistance reversal in MES-SA/DX5 cancer cells. *Life Sciences*, **2008**, *83*, 700–708. b) Pires, M. M.; Emmert, D.; Hrycyna, C. A.; Chmielewski, J. Inhibition of P-Glycoprotein-Mediated Paclitaxel Resistance by Reversibly Linked Quinine Homodimers. *Mol. Pharmacol.*, **2009**, *75*, 92–100.
- <sup>155</sup> ClinicalTrials.gov  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=ab&cond=cancer&term=chloroquine&cntry=&state=&city=&dist=Pristupljeno> je 17. jula 2019.
- <sup>156</sup> Pandey, S.; Agarwal, P.; Srivastava, K.; RajaKumar, S.; Puri, S. K.; Verma, P.; Saxena, J. K.; Sharma, A.; Lal, J.; Chauhan, P. M. S. Synthesis and bioevaluation of novel 4-aminoquinoline-tetrazole derivatives as potent antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *66*, 69–81.
- <sup>157</sup> Šolaja, B. A.; Opsenica, D.; Smith, K. S.; Milhous, W. K.; Terzić, N.; Opsenica, I.; Burnett, J. C.; Nuss, J.; Gussio, R.; Bavari, S. Novel-Aminoquinolines Active against Chloroquine-Resistant and Sensitive *P. falciparum* Strains that also Inhibit Botulinum Serotype A. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 4388–4391.
- <sup>158</sup> 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 and *P. falciparum* Malaria. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 4134–4153.
- <sup>159</sup> Opsenica, I. M.; Tot, M.; Gomba, L.; Nuss, J.; Sciotti, R. J.; Bavari, S.; Burnett, J. C.; Šolaja, B. A. 4-Amino-7chloroquinolines: Probing Ligand Efficiency Provides Botulinum Neurotoxin Serotype A Light Chain Inhibitors with Significant Antiprotozoal Activity. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5860–5871.
- <sup>160</sup> Opsenica, I. M.; Verbić, T. Ž.; Tot, M.; Sciotti, R. J.; Pybus, B. S.; Đurković-Đaković, O.; Slavić, K.; Šolaja, B. A. Investigation into novel thiophene- and furan-based 4-amino-7-chloroquinolines afforded antimalarials that cure mice. *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, *23*, 2176–2186.
- <sup>161</sup> Konstantinović, J.; Videnović, M.; Sribljanović, J.; Đurković-Đaković, O.; Bogojević, K.; Sciotti, R.; Šolaja, B. Antimalarials with Benzothiophene Moieties as Aminoquinoline Partners. *Molecules*, **2017**, *22*, 343.
- <sup>162</sup> Amoroso, F.; Colussi, S.; Del Zotto, A.; Llorca Piqué, J.; Trovarelli, A. PdO hydrate as an efficient and recyclable catalyst for the Suzuki–Miyaura reaction in water/ethanol at room temperature. *Cat. Commun.*, **2011**, *12*, 563–567.
- <sup>163</sup> 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.
- <sup>164</sup> Bendale, P.; Olepu, S.; Suryadevara, P. K.; Bulbule, V.; Rivas, K.; Nallan, L.; Smart, B.; Yokoyama, K.; Ankala, S.; Pendyala, P. R.; Floyd, D.; Lombardo, L. J.; Williams, D. K.; Buckner, F. S.; Chakrabarti, D.; Verlinde, C. L. M. J.; Van Voorhis, W. C.; Gelb, M. H. Second Generation Tetrahydroquinoline-Based Protein Farnesyltransferase Inhibitors as Antimalarials. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 4585–4605.
- <sup>165</sup> Bulbule, V. J.; Rivas, K.; Verlinde, C. L. M. J.; Van Voorhis, W. C.; Gelb, M. H. 2-Oxotetrahydroquinoline-Based Antimalarials with High Potency and Metabolic Stability. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 384–387.

- <sup>166</sup> Bridger, G.; Skerlj, R.; Kaller, A.; Harwig, C.; Bogucki, D.; Wilson, T. R.; Crawford, J.; McEachern, E. J.; Atsma, B.; Nan, S.; Zhou, Y.; Schols, D.; Smith, C. D.; Di Fluri, M. Preparation of Tertiary N-(5,6,7,8-Tetrahydro-8-quinolinyl)-N-(1H-benzimidazol-2-ylmethyl)amines and Analogs as Chemokine Receptor Modulators for Treatment of HIV or FIV. Int. Appl. WO2002034745, PCT, 2002.
- <sup>167</sup> Ghorab, M. M.; Ragab, F. A.; Hamed, M. M. Design, synthesis and anticancer evaluation of novel tetrahydroquinoline derivatives containing sulfonamide moiety. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 4211–4217.
- <sup>168</sup> Skupinska, K. A.; McEachern, E. J.; Skerlj, R. T.; Bridger, G. J. Concise Preparation of Amino-5,6,7,8-tetrahydroquinolines and Amino-5,6,7,8-tetrahydroisoquinolines via Catalytic Hydrogenation of Acetamidoquinolines and Acetamidoisoquinolines. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 7890–7893.
- <sup>169</sup> Korotchenko, V.; Sathunuru, R.; Gerena, L.; Caridha, D.; Li, Q.; Kreishman-Deitrick, M.; Smith, P. L.; and Lin, A. J. Antimalarial Activity of 4-Amidinoquinoline and 10-Amidinobenzonaphthyridine Derivatives. *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 3411–3431.
- <sup>170</sup> Bakke, J. M.; Riha, J. Synthesis of 3,4-Diaminopyridine and Imidazo[4,5-c]pyridines by Nitration of 4-Acylaminopyridines. *J. Heterocycl. Chem.*, **1999**, *36*, 1143–1145.
- <sup>171</sup> Decker, M. Introduction. In *Design of Hybrid Molecules for Drug Development*, Elsevier, 2017, 1–3.
- <sup>172</sup> Regel, E. Acylierung von 1-Acylimidazolen, Thiazolen und Oxazolen sowie Darstellung N-unsubstituierter C-Acylazole. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1977**, 159–168.
- <sup>173</sup> Bastiaansen, L. A. M.; Godefroi, E. F. 2-Aminomethylimidazole and Imidazole-2-carboxaldehyde: Two Facile Syntheses. *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 1603–1604.
- <sup>174</sup> Pagola, S.; Stephens, P. W.; Bohle, D. S.; Kosar, A. D.; Madsen, S. K. The structure of malaria pigment  $\beta$ -haematin. *Nature*, **2000**, *404*, 307–310.
- <sup>175</sup> White, N. J.; Ashley, E. A.; Recht, J.; Delves, M. J.; Ruecker, A.; Smithuis, F. M.; Eziefula, A. C.; Bousema, T.; Drakeley, C.; Chotivanich, K.; Imwong, M.; Pukrittayakamee, S.; Prachumsri, J.; Chu, C.; Andolina, C.; Bancone, G.; Hien, T. T.; Mayxay, M.; Taylor, W. R. J.; von Seidlein, L.; Price, R. N.; Barnes, K. I.; Djimdé, A.; ter Kuile, F.; Gosling, R.; Chen, I.; Dhorda, M. J.; Stepniewska, K.; Guérin, P.; Woodrow, C. J.; Dondorp, A. M.; Day, N. P. J.; Nosten, F. H. Assessment of therapeutic responses to gametocytocidal drugs in *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar. J.*, **2014**, *13*:483.
- <sup>176</sup> Hallett, R.L.; Sutherland, C.J.; Alexander, N.; Ord, R.; Jawara, M.; Drakeley, C. J.; Pinder, M.; Walraven, G.; Targett, G. A.; Allouche, A. Combination therapy counteracts the enhanced transmission of drug-resistant malaria parasites to mosquitoes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, *48*, 3940–3943.
- <sup>177</sup> Rodrigues, T.; Prudêncio, M.; Moreira, R.; Mota, M. M.; Lopes, F. Targeting the Liver Stage of Malaria Parasites: A Yet Unmet Goal. *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 995–1012.
- <sup>178</sup> Choi, S.; Sainz Jr., B.; Corcoran, P.; Uprichard, S.; Jeong, H. Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells. *Xenobiotica*, **2009**, *39*, 205–217.
- <sup>179</sup> Cunha-Rodrigues, M.; Portugal, S.; Prudêncio, M.; Gonçalves, L. A.; Casalou, C.; Bugar, D.; Sauerwein, R.; Haas, W.; Mota, M. M. Genistein-Supplemented Diet Decreases Malaria Liver Infection in Mice and Constitutes a Potential Prophylactic Strategy. *PLoS ONE*, **2008**, *3*, e2732.
- <sup>180</sup> Duan, Z.; Ranjit, S.; Liu, X. One-Pot Synthesis of Amine-Substituted Aryl Sulfides and Benzo[b]thiophene Derivatives. *Org. Lett.*, **2010**, *12* (10), 2430–2433.

- <sup>181</sup> Li, H.; Li, J.; Chen, H.; Zhang, Y.; Huang, D. Synthesis and Crystal Structure of Charge Transfer Complex (CTC) of 2-Aminobenzothiazole with Its Schiff Base. *J. Chem. Crystallogr.*, **2011**, *41*, 1844–1849.
- <sup>182</sup> Rennison, D.; Conole, D.; Tingle, M. D.; Yang, J.; Eason, C. T.; Brimble, M.A. Synthesis and methemoglobinemia-inducing properties of analogues of para-aminopropiophenone designed as humane rodenticides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 6629–6635.
- <sup>183</sup> Bulman Page, P. C.; Graham, A. E.; Bethell, D.; Park, K. A Simple and Convenient Method for the Oxidation of Sulphides. *Synth. Commun.*, **1993**, *23* (11), 1507–1514.
- <sup>184</sup> Discovery & Development Services DTP [https://dtp.cancer.gov/discovery\\_development/nci-60/methodology.htm](https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm) (pristupljeno je 24.1.2019.)
- <sup>185</sup> Discovery & Development Services DTP [https://dtp.cancer.gov/organization/btb/acute\\_toxicity.htm](https://dtp.cancer.gov/organization/btb/acute_toxicity.htm) (pristupljeno je 21.5.2018.)
- <sup>186</sup> Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Salvador, M. K.; Prencipe, F.; Lopez-Cara, C.; Ortega, S. S.; Brancale, A.; Hamel, E.; Castagliuolo, I.; Mitola, S.; Ronca, R.; Bortolozzi, R.; Porcù, E.; Basso, G.; Viola, G. Design, Synthesis, in Vitro, and in Vivo Anticancer and Antiangiogenic Activity of Novel 3-Arylamino-benzofuran Derivatives Targeting the Colchicine Site on Tubulin. *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 3209–3222.
- <sup>187</sup> Verdier-Pinard, P.; Lai, J.-Y.; Yoo, H.-D.; Yu, J.; Marquez, B.; Nagle, D. G.; Nambu, M.; White, J. D.; Falck, J. R.; Gerwick, W. H.; Day, B. W.; Hamel, E. Structure-Activity Analysis of the Interaction of Curacin A, the Potent Colchicine Site Antimitotic Agent, with Tubulin and Effects of Analogs on the Growth of MCF-7 Breast Cancer Cells *Mol. Pharmacol.*, **1998**, *53*, 62–76.
- <sup>188</sup> Borisy, G. G. A Rapid Method for Quantitative Determination of Microtubule Protein using DEAE-Cellulose Filters. *Anal. Biochem.*, **1972**, *50*, 373–385.
- <sup>189</sup> Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **1983**, *65*, 55–63.
- <sup>190</sup> Ohno, M.; Abe, T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J. Immunol. Methods*, **1991**, *145*, 199–203.
- <sup>191</sup> van Tonder, A.; Joubert, A. M.; Cromarty, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res. Notes*, **2015**, *8*:47.
- <sup>192</sup> Jin, P.; Hardy, S.; Morgan, D. O. Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage. *J. Cell Biol.*, **1998**, *141*, 875–885.
- <sup>193</sup> van Engeland, M.; Nieland, L. J. W.; Ramaekers, F. C. S.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C. P. M. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry*, **1998**, *31*, 1–9.
- <sup>194</sup> Ly, J. D.; Grubb, D. R.; Lawen, A. The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, **2003**, *8*, 115–128.
- <sup>195</sup> Yan, M.; Zhu, P.; Liu, H.-M.; Zhang, H.-T.; Liu, L. Ethanol induced mitochondria injury and permeability transition pore opening: role of mitochondria in alcoholic liver disease. *World J. Gastroenterol.*, **2007**, *13*, 2352–2356.
- <sup>196</sup> Chipuk, J.E.; Green, D.R. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.*, **2006**, *13*, 994–1002.
- <sup>197</sup> Sayan, A. E.; Sayan, B. S.; Gogvadze, V.; Dinsdale, D.; Nyman, U.; Hansen, T. M.; Zhivotovsky, B.; Cohen, G. M.; Knight, R. A.; Melino, G. p73 and caspase-cleaved p73

---

fragments localize to mitochondria and augment TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene*, **2008**, *27*, 4363–4372.

<sup>198</sup> Simpson, C. D.; Anyiwea, K.; Schimmer, A. D. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett.*, **2008**, *272*, 177–185.

<sup>199</sup> Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Im.*, **1997**, A.3B.1-A.3B.2

<sup>200</sup> Bauer, J.; Marcolis, M.; Schreiner, C.; Edcell, C.-J.; Azizkhan, J.; Lazarowski, E.; JULIANO, R.L. In Vitro Model of Angiogenesis Using a Human Endothelium-Derived Permanent Cell Line: Contributions of Induced Gene Expression, G-Proteins, and Integrins. *J. Cell. Physiol.*, **1992**, *153*, 437–449.

<sup>201</sup> Zon, L. I.; Peterson, R. T. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2005**, *4*, 35–44.

<sup>202</sup> Langheinrich, U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays*, **2003**, *25*, 904–912.

<sup>203</sup> Veinotte, C. J.; Delleaire, G.; Berman, J. N. Hooking the big one: the potential of zebrafish xenotransplantation to reform cancer drug screening in the genomic era. *Dis. Model. Mech.*, **2014**, *7*, 745–754.

<sup>204</sup> Lama, S.H.; Chuaa, H.L.; Gong, Z.; Lama, T.J.; Sin, Y.M. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.*, **2004**, *28*, 9–28.

<sup>205</sup> Frisch, S.M.; Sreaton, R.A. Anoikis mechanisms, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2001**, *5*, 555–562.

<sup>206</sup> Kim, S.; Oh, C. H.; Ko, J. S.; Ahn, K. H.; Kim, Y. J. Zinc-Modified Cyanoborohydride as a Selective Reducing Agent. *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 1927–1932.

<sup>207</sup> Margolis, B. J.; Long, K. A.; Laird, D. L. T.; Ruble, J. C.; Pulley, S. R. Assembly of 4-Aminoquinolines via Palladium Catalysis: A Mild and Convenient Alternative to SNAr Methodology. *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 2232–2235.

<sup>208</sup> Wallberg, A.; Nilsson, K.; Granberg, K.; Ghosal, S.; Slassi, A.; Edwards, L.; Isaac, M.; Xin, T.; Stefanac, T.; Dove, P. MgluR5 modulators V. US 2007/0259860 A1, November 8, 2007.

<sup>209</sup> Tietze, L. F.; Güntner, C.; Gericke, K. M.; Schuberth, I.; Bunkoczi, G. A Diels–Alder reaction for the total synthesis of the novel antibiotic antitumor agent mensacarcin. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, *27*, 2459–2467.

<sup>210</sup> Seggio, A.; Priem, G.; Chevallier, F.; Mongin, F. Palladium-Catalyzed Cross-Couplings of Lithium Arylzincates with Aromatic Halides: Synthesis of Analogues of Isomeridianin G and Evaluation as GSK-3 $\beta$  Inhibitors. *Synthesis*, **2009**, *21*, 3617–3632.

<sup>211</sup> Chaires, J. B.; Ren, J.; Hamelberg, D.; Kumar, A.; Pandya, V.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. Structural Selectivity of Aromatic Diamidines. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 5729–5742.

<sup>212</sup> Baghbanzadeh, M.; Pilger, C.; Kappe, C. O. Palladium-Catalyzed Direct Arylation of Heteroaromatic Compounds: Improved Conditions Utilizing Controlled Microwave Heating. *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 8138–8142.

<sup>213</sup> Gong, L.; Tan, Y.-C. Inhibitors of JNK. WO 2011/151357, December 8, 2011.

<sup>214</sup> Jiang, X.-J.; Lo, P.-C.; Tsang, Y.-M.; Yeung, S.-L.; Fong, W.-P.; Ng, D.K.P. Phthalocyanine-Polyamine Conjugates as pH-Controlled Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16* (16), 4777–4783.

<sup>215</sup> Feng, Y.; Lograsso, P.; Schroeter, T.; Yin, Y. Urea and carbamate compounds and analogs as kinase inhibitors. WO 2010036316 A1, April 1, 2010.



- <sup>216</sup> James, T.; Simpson, I.; Grant, J. A.; Sridharan, V.; Nelson, A. Modular, Gold-Catalyzed Approach to the Synthesis of Lead-Like Piperazine Scaffolds. *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 6094–6097.
- <sup>217</sup> Čaplar, V.; Žinić, M.; Pozzo, J.-L.; Fages, F.; Mieden-Gundert, G.; Vogtle, F. Chiral Gelators Constructed from 11-Aminoundecanoic (AUDA), Lauric and Amino Acid Units. Synthesis, Gelling Properties and Preferred Gelation of Racemates vs. the Pure Enantiomers. *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 4048–4059.
- <sup>218</sup> Heindel, N. D.; Fine, S. A. 3-Nitro-7-Chloroquinoline. *Org. Prep. Proced.*, **1969**, *1*, 279–281.
- <sup>219</sup> Johnson, J. D.; Denuff, 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.
- <sup>220</sup> Makler, M. T.; Hinrichs, D. J. Measurement of the Lactate Dehydrogenase Activity of *Plasmodium falciparum* as an Assessment of Parasitemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1993**, *48*, 205–210.
- <sup>221</sup> Trager, W.; Jensen, J. B. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science*, **1976**, *193*, 673–675.
- <sup>222</sup> D'Alessandro, S.; Silvestrini, F.; Dechering, K.; Corbett, Y.; Parapini, S.; Timmerman, M.; Galastri, L.; Basilio, 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.
- <sup>223</sup> 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.
- <sup>224</sup> D'Alessandro, S.; Camarda, G.; Corbett, Y.; Siciliano, G.; Parapini, S.; Cevenini, L.; Michelini, E.; Roda, A.; Leroy, D.; Taramelli, D.; Alano, P. A chemical susceptibility profile of the *Plasmodium falciparum* transmission stages by complementary cell-based gametocyte assays. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2016**, *71*, 1148–1158.
- <sup>225</sup> Parapini, S.; Basilio, 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.
- <sup>226</sup> Prudencio, M.; Mota, M. M.; Mendes, A. M. A toolbox to study liver stage malaria. *Trends Parasitol.*, **2011**, *27*, 565–574.
- <sup>227</sup> Ploemen, I. H. J.; Prudencio, M.; Douradinha, B. G.; Ramesar, J.; Fonager, J.; van Gemert, G.-J.; Luty, A. J. F.; Hermsen, C. C.; Sauerwein, R. W.; Baptista, F. G.; Mota, M. M.; Waters, A. P.; Que, I.; Lowik, C. W. G. M.; Khan, S. M.; Janse, C. J.; Franke-Fayard, B. M. D. Visualisation and Quantitative Analysis of the Rodent Malaria Liver Stage by Real Time Imaging. *PLoS One*, **2009**, *4*, e7881.
- <sup>228</sup> Baiocco, P.; Ilari, A.; Ceci, P.; Orsini, S.; Gramiccia, M.; Di Muccio, T.; Colotti, G. Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione Reductase Activity and *Leishmania infantum* Proliferation. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2011**, *2*, 230–233.
- <sup>229</sup> D'Alessandro, S.; Gelati, M.; Basilio, N.; Parati, E. A.; Haynes, R. K.; Taramelli, D. Differential Effects on Angiogenesis of Two Antimalarial Compounds, Dihydroartemisinin and Artemisone: Implications for Embryotoxicity. *Toxicology*, **2007**, *241*, 66–74.

- 
- <sup>230</sup> Andrews, P. A. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev. Biol.*, **1984**, *103*, 285–293.
- <sup>231</sup> Lu, H.; LI, X.; Zhang, J.; Shi, H.; Zhu, X.; He, X. Effects of cordycepin on HepG2 and EA.hy926 cells: Potential antiproliferative, antimetastatic and anti-angiogenic effects on hepatocellular carcinoma. *Oncol. Lett.*, **2014**, *7*, 1556–1562.
- <sup>232</sup> OECD (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>. Pristupljeno je 17. jula 2019.
- <sup>233</sup> Pavic, A.; Glišić, B. Đ.; Vojnovica, S.; Waržajtisc, B.; Savić, N. D.; Antić, M.; Radenković, Sl.; Janjić, G. V.; Nikodinovic-Runic, J.; Rychlewska, U.; Djuran, M. I. Mononuclear gold(III) complexes with phenanthroline ligands as efficient inhibitors of angiogenesis: A comparative study with auranofin and sunitinib. *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, *174*, 156–168.
- <sup>234</sup> Fornabaio, G.; Barnhill, R. L.; Lugassy, C.; Bentolila, L. A.; Cassoux, N.; Roman-Roman, S.; Alsafadi, S.; Del Bene, F. Angiotropism and extravascular migratory metastasis in cutaneous and uveal melanoma progression in a zebrafish model. *Sci. Rep.*, **2018**, *8*:10448.

## **Biografski podaci**

Milica Đ. Selaković (rođena Videnović) rođena je 28. oktobra 1984. godine u Boru, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2003. godine, a diplomirala je 30. decembra 2010. godine sa prosekom 8,07 i ocenom 10 na diplomskom radu. Master studije na istom fakultetu upisala je 2011. godine i završila 2012. godine sa prosekom 9,25 i ocenom 10 na master radu. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je u oktobru 2012. godine.

Od januara 2011. godine do septembra 2012. godine bila je angažovana na projektu „Druga generacija malih molekula inhibitora botulinum neurotoksina“, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, realizovanom na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom profesora dr Bogdana Šolaje. Od oktobra 2012. do maja 2013. godine bila je zaposlena kao stručni saradnik na istom projektu na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od juna 2013. angažovana je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom “Sinteza aminohinolina i njihovih derivata kao antimalarika i inhibitora botulinum neurotoksina A“ (172008) kao istraživač-pripravnik u Inovacionom centru Hemijskog fakulteta. Izabrana je u zvanje istraživač-saradnik 2014. godine. Kao stipendista Evropske fondacije za medicinsku hemiju (EFMC), pohađala je letnju školu medicinske hemije „36<sup>th</sup> Advanced Course of Medicinal Chemistry and “E. Duranti“ National Seminar for PhD Students”, European School of Medicinal Chemistry, u Urbinu, Italiji (26. jun – 1. jul, 2016). U julu 2019. godine, u okviru bilateralnog projekta, boravila je u Centre de Recherche des Cordeliers, u Parizu, Francuskoj. Od 2019. godine uključena je u strateški projekat SANU “Sinteza novih terapeutika na bazi prirodnih proizvoda i kompleksa metala”, pod rukovodstvom akademika Bogdana Šolaje.

Dobitnica je IUPAC nagrade za najbolje postersko saopštenje na 49. Savetovanju Srpskog hemijskog društva održanom u Kragujevcu 13 – 14 jula 2011. godine.

Član je Srpskog hemijskog društva od 2011. godine.

## Bibliografija kandidata

### Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a):

1. Videnović, M.; Mojsin, M.; Stevanović, M.; Opsenica, I.; Srdić-Rajić, T.; Šolaja, B. Benzothiazole carbamates and amides as antiproliferative species, *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 1096.
2. Konstantinović, J.; Kiris, E.; Kota, K. P.; Kugelman-Tonos, J.; Videnović, M.; Cazares, L. H.; Terzić-Jovanović, N.; Verbić, T. Ž.; Anđelković, 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**, *16*, 1595.
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.

### Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. Konstantinović, J.; Videnović, M.; Orsini, S.; Bogojević, K.; D'Alessandro, S.; Scaccabarozzi, D.; Terzić Jovanović, N.; Gradoni, L.; Basilico, N.; Šolaja, B. A. Novel Aminoquinoline Derivatives Significantly Reduce Parasite Load in *Leishmania infantum* Infected Mice, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2018**, *9*, 629.
2. Konstantinović, J.; Videnović, M.; Srbljanović, J.; Đurković-Đaković, O.; Bogojević, K.; Sciotti, R.; Šolaja, B. Antimalarials with Benzothiophene Moieties as Aminoquinoline Partners. *Molecules*, **2017**, *22*, 343.

### Radovi saopšteni na skupovima od međunarodnog značaja štampani u izvodu (M34):

1. Videnović, M.; Srdić-Rajić, T.; Opsenica, I.; Radulović, S.; Šolaja, B. New benzothiazolamine derivatives as inducers of an early apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell line, XXXVI edition of European School of Medicinal Chemistry, National Seminar for PhD Students, ESMEC, Urbino, Italy, June 26 – July 1, page 75

### Radovi saopšteni na skupovima od nacionalnog značaja štampani u izvodu (M64):

1. Videnović, M.; Mojsin, M.; Srdić-Rajić, T.; Opsenica, I.; Stevanović, M.; Šolaja, B. Potencijalno antimetastatsko i antiproliferativno dejstvo derivata benzotiazola na ćelije embrionalnog humanog teratokarcinoma NT2/D1, 55. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 8 – 9. Jun 2018, Zbornik radova (MH P 09), str. 87; ISBN 978-86-7132-069-6
2. Konstantinović, J.M.; Terzić, N.; Videnović, M.; Bogojević, K.; Basilico, N.; Gradoni, L.; Šolaja, B. A. Derivati aminohinolina pokazuju aktivnost protiv lajšmanija parazita u in vivo uslovima, 5. Konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 29 – 30. Septembar 2017, Zbornik radova (OP (Y)1), str. 95; ISBN 978-86-7132-066-5

3. Pavlović, N. Z.; Videnović, M. Đ.; Šolaja, B. A. Inhibicija BoNT/A *in vitro* i zaštita SNAP-25 u ćeliji novih aminohinolinskih derivata tiofena, Četvrta konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 5. Novembar 2016, Zbornik radova (HS P 05), str. 41; ISBN 978-86-7132-063-4
  4. Videnović, M.; Srdić-Rajić, T.; Opsenica, I.; Radulović, S.; Šolaja, B. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti novih derivata benzotiazolamina prema MCF-7 ćelijskoj liniji humanog kancera dojke, 53. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Kragujevac, 10–11. Jun 2016, Zbornik radova (OHO5), str. 99; ISBN 978-86-7132-061-0
  5. Videnović, M. Đ.; Šolaja, B. A. Nova generacija 4-aminohinolina: dizajn, sinteza i antimalarijska aktivnost, 52. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 29 – 30. Maj 2015, Zbornik radova (OH-20), str. 134; ISBN 978-86-7132-056-6
  6. Videnović, M.; Opsenica, D. M.; Šolaja, B. A. Nova generacija steroidnih 4-aminohinolina kao potencijalnih antimalarika, 49. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Kragujevac, 13 – 14. Maj 2011, Zbornik radova (OH-25P), str. 143; ISBN 978-86-7132-045
-

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Milica Selaković

Broj indeksa DH18/2012

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**Razvoj novih inhibitora proliferacije parazita *Plasmodium falciparum* i malignih ćelija**

- 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**

U Beogradu, 6.9.2019.

---

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora      Milica Selaković  
Broj indeksa                DH18/2012  
Studijski program         doktor hemijskih nauka  
Naslov rada                **Razvoj novih inhibitora proliferacije parazita *Plasmodium falciparum* i malignih ćelija**  
Mentor                      akademik Bogdan Šolaja, profesor Univerziteta u Beogradu –  
Hemijskog fakulteta, u penziji

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerzitetu 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

U Beogradu, 6.9.2019.

---

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

### **Razvoj novih inhibitora proliferacije parazita *Plasmodium falciparum* i malignih ćelija**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala 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 odlučila

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**

U Beogradu, 6.9.2019.

---



1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istim uslovima ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.