



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Милена М. Петровић

**СИНТЕЗА, АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА  
АКТИВНОСТ И ЛИПОФИЛНОСТ НОВИХ  
ДЕРИВАТА ХИНОЛИН-4-КАРБОКСИЛНЕ  
КИСЕЛИНЕ КАО ПОТЕНЦИЈАЛНИХ  
ИНХИБИТОРА ДИХИДРООРОТАТ  
ДЕХИДРОГЕНАЗЕ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2023





UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF SCIENCE

Milena M. Petrović

**SYNTHESIS, ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY,  
AND LIPOPHILICITY OF NEW QUINOLINE-4-  
CARBOXYLIC ACID DERIVATIVES AS  
POTENTIAL DIHYDROOROTATE  
DEHYDROGENASE INHIBITORS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023



## Идентификациона страница докторске дисертације

<b>Аутор</b>
Име и презиме: <i>Милена М. Петровић</i>
Датум и место рођења: <i>28.03.1995. Јагодина</i>
Садашње запослење: <i>Истраживач-сарадник, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: <i>Синтеза, антипролиферативна активност и липофилност нових деривата хинолин-4-карбоксилне киселине као потенцијалних инхибитора дихидрооротат дехидрогеназе</i>
Број страница: <i>138</i>
Број слика: <i>36</i>
Број библиографских података: <i>167</i>
Установа и место где је рад израђен: <i>Природно-математички факултет, Крагујевац</i>
Научна област (УДК): <i>547.831(043.3)</i>
<b>Ментор:</b> <i>др Милан Д. Јоксовић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
<b>Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: <i>13.07.2022. год.</i>
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: <i>IV-01-754/7, 12.10.2022. год.</i>
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"><li><i>др Снежана С. Трифуновић, научни саветник, Хемијски факултет, Универзитет у Београду, научна област: хемија, члан комисије</i></li><li><i>др Милан Јоксовић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: органска хемија, ментор</i></li><li><i>др Иван Дамљановић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: органска хемија и настава хемије, члан комисије</i></li></ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"><li><i>др Снежана С. Трифуновић, научни саветник, Хемијски факултет, Универзитет у Београду, научна област: хемија, председник комисије</i></li><li><i>др Соња Мисирлић Денчић, ванредни професор, Медицински факултет, Универзитет у Београду, ужа научна област: медицинска и клиничка биохемија, члан комисије</i></li><li><i>др Иван Дамљановић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: органска хемија и настава хемије, члан комисије</i></li></ol>
Датум одбране дисертације:



*Мајци Зорици, оцу Мирославу  
и сестри Јелени*





## **Захвалница**

*Ова докторска дисертација је рађена у Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу под менторством редовног професора др Милана Д. Јоксовића. Неизмерну захвалност дугујем свом ментору на предложеној теми докторске дисертације, указаном поверењу, преданости и помоћи на основу које је ова дисертација успешно реализована.*

*Члановима комисије, др Снежани Трифуновић, научном саветнику Хемијског факултета у Београду, др Соњи Мисирлић Денчић, ванредовном професору Медицинског факултета у Београду и др Ивану Дамљановићу, доценту Природно-математичког факултета у Крагујевцу дугујем захвалност за све корисне сугестије и савете који су допринели бољем квалитету докторске дисертације.*

*Такође, захвалност дугујем др Виолети Марковић, доценту Природно-математичког факултета у Крагујевцу, др Катарини Јаковљевић и Марини Димитријевић, истраживачу-приправнику, за подршку и лепе тренутке проведене у лабораторији Б-1-4а.*

*Својим пријатељима се захваљујем на разумевању и љубави коју су ми пружили током студија.*

*Посебну захвалност дугујем својим родитељима и сестри на пруженој подршци и безусловној љубави током свих ових година.*

Милена М. Петровић





## Апстракт

У оквиру ове докторске дисертације описани су синтеза, структурна карактеризација, инхибиторна активност према ензиму дихидрооротат дехидрогенази, као и цитотоксични потенцијал, липофилност, и молекулски докинг деривата хинолин-4-карбоксилне киселине. Синтетизоване су три серије које укупно садрже 48 једињења, од којих прве две серије представљају деривате 2-супституисане-хинолин-4-карбоксилне киселине (**A** и **B**), док трећу чине деривати 2,3-дисупституисане хинолин-4-карбоксилне киселине (**C**). Сва синтетизована једињења су препозната као потенцијални инхибитори дихидрооротат дехидрогеназе (*hDHODH*) човека. Самим тим, одређене су њихове инхибиторне активности, а добијени резултати IC<sub>50</sub> вредности упоређени са познатим инхибиторима, Brequinar-ом и/или Leflunomide-ом. У оквиру сваке серије је за одређена једињења запажена добра инхибиторна активност, а посебно су одличну ензимску инхибицију испољили одговарајући деривати који припадају серијама **A** и **C**. Цитотоксичност једињења серија **A** и **C** је тестирана *in vitro* на ћелијским линијама карцинома дојке (MCF-7), плућа (A549) и меланома (A375), док је цитотоксична активност једињења серије **B** испитана на MCF-7 и ћелијској линији акутне моноцитне леукемије (THP-1). У циљу одређивања селективности и терапеутског потенцијала, тестирана је и њихова токсичност на ћелијској линији кератиноцита коже човека (HaCaT). Додатно, одређена је липофилност свих деривата и изражена преко logD<sub>7,4</sub> вредности, а у оквиру **C** серије је одређена и растворљивост. У оба случаја, нека једињења су показала боље фармаколошке особине од референтних. Поред тога, студија молекулског докинга је приказала најзначајније интеракције које остварују новосинтетизовани деривати са ензимом.

## Кључне речи

- Органска синтеза
- Doebner-ова реакција
- Pfitzinger-ова циклизациона реакција
- Структурна карактеризација
- Хинолин-4-карбоксилна киселина
- Ензимска инхибиција
- Хумана дихидрооротат дехидрогеназа (*hDHODH*)
- Цитотоксичност
- Липофилност
- Молекулски докинг



## Abstract

In this doctoral thesis, the synthesis, structural characterization, inhibitory activity against the enzyme dihydroorotate dehydrogenase, as well as the cytotoxic potential, lipophilicity, and molecular docking studies of quinoline-4-carboxylic acid derivatives were described. Three series containing a total of 48 compounds were synthesized, the first two series are derivatives of 2-substituted quinoline-4-carboxylic acid (**A** and **B**), while the third series consists of 2,3-disubstituted quinoline-4-carboxylic acid derivatives (**B**). Human dihydroorotate dehydrogenase (*h*DHODH) was clearly recognized as the ideal target for these compounds. Consequently, enzyme screening was conducted and obtained IC<sub>50</sub> results were compared with prominent inhibitors, Brequinar and/or Leflunomide. A certain number of compounds in each series showed good inhibitory activity, while some derivatives from the **A** and **B** series exhibited excellent enzyme inhibition. The cytotoxicity of series **A** and **B** was evaluated *in vitro* on breast (MCF-7), lung (A549) and melanoma (A375) cancer cell lines. In the case of series **B**, the cytotoxic potential was tested on MCF-7 and acute monocytic leukemia (THP-1) cell lines. In order to evaluate the selectivity and therapeutic potential of these compounds, their toxicity to the human skin keratinocyte cell line (HaCaT) was also examined. Additionally, lipophilicity study was conducted, and the results were expressed as logD<sub>7.4</sub> values, while solubility assay was performed for all derivatives of **B** series. In both cases, certain derivatives showed better pharmacological properties than a reference compounds. Besides, molecular docking study revealed the most important interactions of newly synthesized compounds with the enzyme.

## Key words

- Organic synthesis
- Doebner reaction
- Pfitzinger cyclization reaction
- Structural characterization
- Quinoline-4-carboxylic acid
- Enzyme inhibition
- Human dihydroorotate dehydrogenase (*h*DHODH)
- Cytotoxicity
- Lipophilicity
- Molecular docking



## Садржај

<b>1. ОПШТИ ДЕО.....</b>	<b>1</b>
1.1. Историјат и значај хинолина.....	2
1.2. Методе за синтезу хинолина.....	3
1.2.1. <i>Skraup</i> -ова метода синтезе хинолина.....	5
1.2.2. <i>Doebner</i> -ова метода синтезе хинолина.....	6
1.2.3. <i>Doebner-Von Miller</i> -ова метода синтезе хинолина.....	7
1.2.4. <i>Conrad-Limpach</i> -ова метода синтезе хинолина.....	8
1.2.5. <i>Povarov</i> -љева метода синтезе хинолина.....	8
1.2.6. <i>Knorr</i> -ова метода синтезе хинолина.....	9
1.2.7. <i>Friedländer</i> -ова метода синтезе хинолина.....	9
1.2.8. <i>Pfitzinger</i> -ова метода синтезе хинолина.....	10
1.3. Биолошка активност деривата хинолина.....	12
1.3.1. Антибактеријска и антифунгална активност деривата хинолина.....	12
1.3.2. Антиоксидативна активност деривата хинолина.....	14
1.3.3. Антиконвулзивна и аналгетичка својства деривата хинолина.....	16
1.3.4. Антиинфламаторна својства деривата хинолина.....	18
1.3.5. Антивирусна активност деривата хинолина.....	19
1.3.6. Антитуморска активност деривата хинолина.....	20
1.4. Дихидрооротат дехидрогеназа и њена улога у <i>de novo</i> синтези пиримидинских нуклеотида.....	24
1.4.1. Подела ензима дихидрооротат дехидрогеназа.....	25
1.4.2. Структура <i>hDHODH</i> .....	26
1.4.3. Реакције које катализује <i>hDHODH</i> у <i>de novo</i> синтези пиримидинских нуклеотида.....	28
1.4.4. Значај инхибиције <i>hDHODH</i> са медицинског аспекта.....	31
1.4.5. Инхибитори <i>hDHODH</i> .....	31
1.4.6. Структурне карактеристике потенцијалних инхибитора.....	36
1.5. ADMET особине.....	37
<b>2. НАШИ РАДОВИ.....</b>	<b>39</b>
2.1. Увод.....	40
2.1.1. <i>Doebner</i> -ова реакција: карактеристике и механизам.....	42
2.1.2. <i>Pfitzinger</i> -ова реакција циклизације: карактеристике и механизам.....	43
2.2. Серија А.....	47
2.2.1. Синтеза једињења серије А.....	47
2.2.2. Инхибиција <i>hDHODH</i> једињењима серије А.....	48

2.2.3. Цитотоксична активност једињења серије А .....	49
2.2.4. SAR студије.....	51
2.2.5. Студија липофилности једињења серије А .....	53
2.2.6. Молекулски докинг одабраних једињења серије А.....	55
<b>2.3. Серија Б.....</b>	<b>57</b>
2.3.1. Синтеза једињења серије Б.....	57
2.3.2. Инхибиција hDHODH једињењима серије Б.....	59
2.3.3. Цитотоксична активност једињења серије Б.....	59
2.3.4. SAR студије.....	60
2.3.5. Студија липофилности једињења серије Б .....	62
2.3.6. Молекулски докинг одабраног једињења серије Б.....	63
<b>2.4. Серија В.....</b>	<b>64</b>
2.4.1. Синтеза једињења серије В.....	64
2.4.2. Инхибиција hDHODH једињењима серије В.....	66
2.4.3. Цитотоксична активност једињења серије В .....	67
2.4.4. SAR студије.....	68
2.4.5. Студија липофилности и растворљивости једињења серије В.....	69
2.4.6. Молекулски докинг одабраног једињења серије В.....	70
<b>3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....</b>	<b>73</b>
3.1. Физичка мерења .....	74
3.2. Поступак за синтезу једињења <b>99а-к</b> .....	74
3.3. Поступак за синтезу једињења <b>100а-љ</b> .....	75
3.4. Поступак за синтезу једињења <b>103а-р</b> .....	80
3.5. Поступак за синтезу једињења <b>104а-р</b> .....	86
3.6. Поступак за синтезу једињења <b>105</b> .....	94
3.7. Поступак за синтезу једињења <b>107а-љ</b> .....	94
3.8. Одређивање липофилности .....	100
3.9. Одређивање растворљивости једињења серије В .....	101
3.10. Одређивање чистоће једињења серије В.....	101
3.11. Биолошка испитивања .....	101
3.11.1. Инхибиција hDHODH .....	101
3.11.2. Ћелијске линије и испитивање цитотоксичности.....	101
3.12. Молекулски докинг .....	102
<b>4. ЗАКЉУЧАК.....</b>	<b>104</b>
<b>5. ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>106</b>
<b>6. ПРИЛОГ..</b> .....	<b>118</b>



6.1. $^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}$ NMR спектри за <b>100ђ-е</b> , <b>104и</b> и <b>107г</b> , HPLC хроматограм и HRMS спектар високе резолуције за <b>107г</b> .....	119
6.2. Публиковани научни радови у којима су презентовани резултати докторске дисертације .....	130
<b>Листа термина и скраћеница коришћених у тексту .....</b>	<b>134</b>
<b>Биографија са подацима о досадашњем раду .....</b>	<b>138</b>

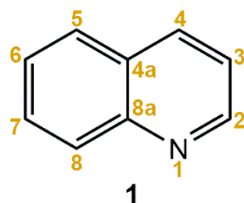


## ***1. ОПШТИ ДЕО***



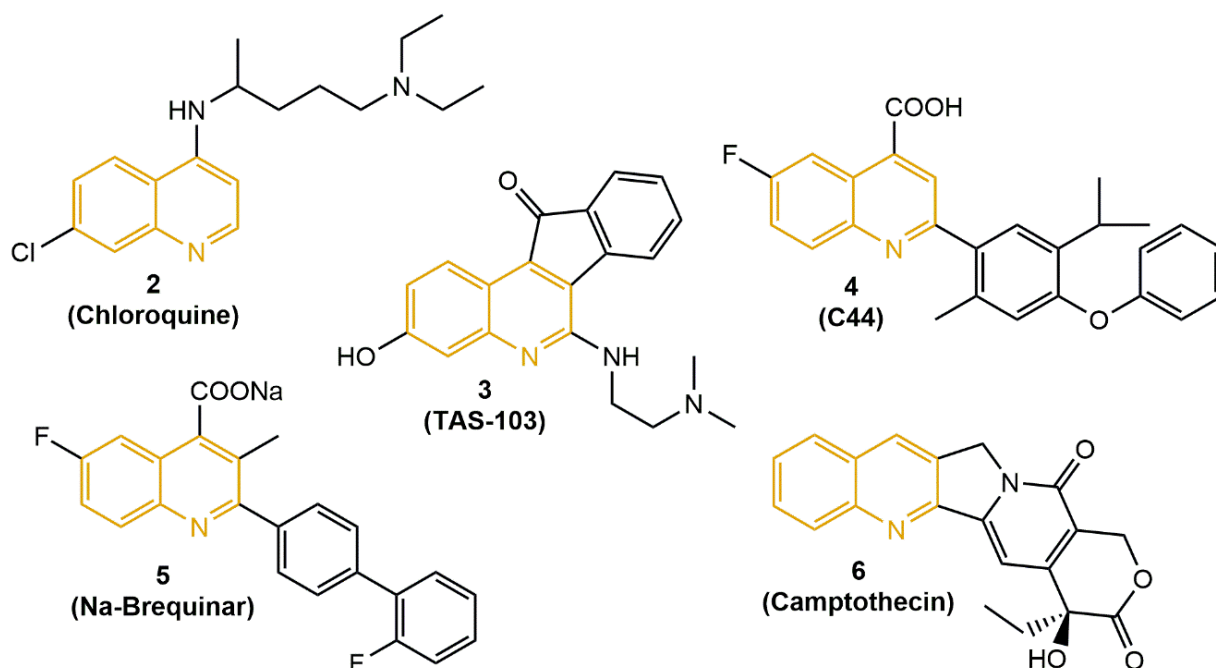
## 1.1. Историјат и значај хинолина

Хинолин припада класи хетероцикличних азотних једињења које је 1834. године изоловао Friedlieb Ferdinand Runge као једну од компоненти добијених екстракцијом катрана каменог угља (Слика 1).<sup>1</sup> Уколико није изложена светлости, ова супстанца је безбојна течност, па је самим тим добила назив „бело уље“ (грч. leukol),<sup>1</sup> док у супротном може бити жуте или браон боје.



Слика 1. Структурна формула хинолина.

Услед масовне употребе у медицини и индустрији, хинолински систем је изучаван више од једног века. Често је присутан као структурни мотив у природним производима (*Cinchona* алкалоидима) и биоактивним лековима. У индустрији, хинолини се користе као флуоресцентни агенси, растварачи за смоле и терпене, за израду LED диода (енг. light-emitting diode) као и фотонапонских ћелија. Хинолинско језгро је заступљено у фармацији, али и у агрохемији као саставна компонента многих производа.<sup>2</sup> Захваљујући азоту, у координационој хемији, хинолини представљају *N*-донорске лиганде.<sup>3</sup> Деривати хинолина испољавају многобројне фармаколошке активности,<sup>4-6</sup> укључујући антипротозоалну,<sup>7</sup> антитуморску,<sup>8,9</sup> антиинфламаторну,<sup>10</sup> антифунгалну,<sup>11</sup> антитуберкулозну,<sup>12</sup> антиоксидативну<sup>4</sup> и многе друге. Такође, лекови који у својој структури садрже хинолински прстен су показали добар ефекат у терапији неуродегенеративних болести.<sup>7</sup> Аминохинолински фрагмент присутан у антималяријским агенсима познат је још од 1940. године.<sup>3</sup> Chloroquine, један од најпознатијих антималяријских агенаса, привукао је велику пажњу током пандемије коронавируса јер испољава и антивирално дејство према коронавирусу SARS-CoV-2.<sup>13</sup> На Слици 2 приказане су структуре неких фармаколошки активних једињења која садрже хинолински систем.



Слика 2. Структуре неких фармаколошки значајних деривата хинолина.

## 1.2. Методе за синтезу хинолина

Постоји више установљених метода за синтезу хинолина у којима је један од реактанта једноставни ариламин, најчешће анилин. Једна од најстаријих метода је Skraup-ова реакција (Схема 1, А). Раних 80-их година XIX века, чешки хемичар Zdenko Hans Skraup је изоловао хинолин у веома ниском приносу. Ова метода загревања глицерола и анилина са оксидансом у присуству концентроване сумпорне киселине се и данас користи за синтезу хетероароматичних несупституисаних хинолина.<sup>14</sup> Пар година касније, 1887. године, Oscar Doebner је представио своју трокомпонентну реакцију између пирогрођане киселине, анилина и одговарајућег алдехида, при чему се као крајњи продукти реакције добијају 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине (Схема 1, Б).<sup>15</sup> У Doebner-Von Miller-овој реакцији коришћени су  $\alpha,\beta$ -незасићени алдехиди или кетони за синтезу 2- или 4-супституисаних хинолина такође у киселим условима (Схема 1, В).<sup>16</sup> Conrad и Limpach су успешно синтетизовали 2,3-дисупституисане хинолин-4-оле у реакцији  $\beta$ -кетоестара са анилином у киселим условима (Схема 1, Г).<sup>17</sup> Једну од савременијих реакција извели су 1963. године L.S. Rovagov и сарадници, при чему у реакцији активираних алкена и арил алдехида настају 2-арилхинолини (Схема 1, Д).<sup>18</sup>

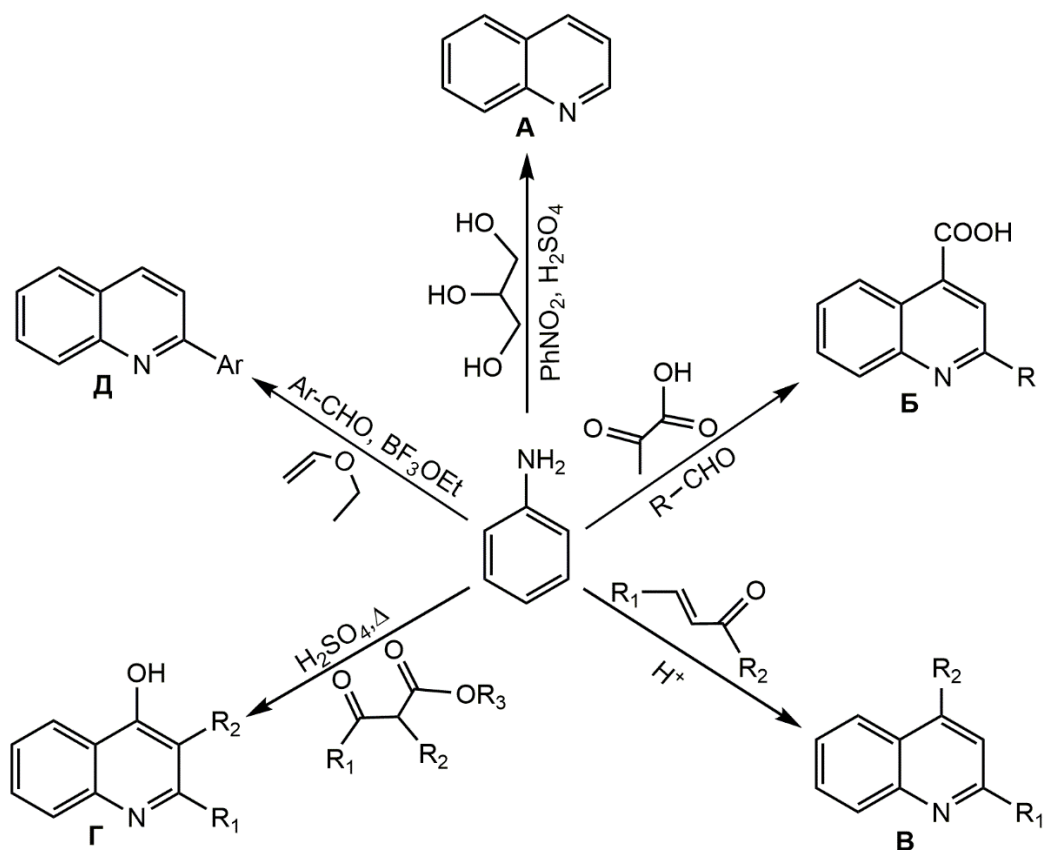
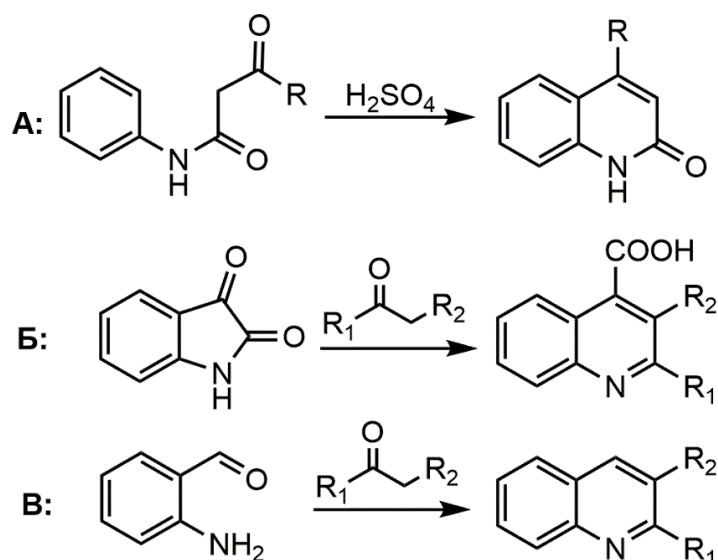


Схема 1. Методе синтезе хинолина.

Поред ових, постоје и друге методе за синтезу хинолина код којих је полазни реагенс супституисани анилин или неко друго једињење при чему долази до циклизације.

У случају Knorr-ове синтезе хинолина полазни супстрат је  $\beta$ -кетоанилид који подлеже циклизацији у присуству сумпорне киселине до жељеног хинолина (Схема 2, А).<sup>19</sup> Како би синтетизовао 2,3-дисупституисане хинолине, Paul Friedländer је 1882. године користио 2-аминобензалдехид и одговарајуће карбонилно једињење (Схема 2, Б).<sup>2</sup> У Pfitzinger-овој реакцији долази до циклизације изатина са карбонилним једињењем у базним условима при чему се формирају 2,3-дисупституисане хинолин-4-карбоксилне киселине (Схема 2, В).<sup>20</sup>



**Схема 2.** Методе синтезе хинолина: А) Knoevenagel-ова реакција; Б) Friedländer-ова реакција; В) Pfitzinger-ова реакција.

Све ове методе су погодне за синтезу широког спектра несупституисаних до високо функционализованих хинолина. Ипак, многе од њих имају недостатке као што су ригорозни услови реакција и низак принос финалних производа.

### 1.2.1. Skraup-ова метода синтезе хинолина

Као што је већ поменуто, једна од најстаријих метода која се и даље широко примењује за синтезу хетероцикличних, несупституисаних хинолина је Skraup-ова реакција. Како би се добио жељени хинолин, анилин и глицерол је неопходно рефлуговати са оксидансом у концентрованој сумпорној киселини. Међутим, ова метода се карактерише ригорозним реакционим условима, токсичним реагенсима и релативно ниским приносима. У циљу побољшања, многе истраживачке групе су предложиле своје процедуре и на тај начин унапредиле већ познату методу.

Употреба микроталасног зрачења уместо конвенционалних синтетичких путева је постала веома заступљена последњих година. Микроталасно зрачење представља погодан извор загревања за синтезу хинолина, при чему се смањује потребно време реакције и повећава принос. Saggadi и сарадници су токсичне реагенсе као што су арсен оксид и нитробензен заменили водом и применили микроталасно зрачење (Схема 3).<sup>21</sup> Самим тим, представили су своју зелену синтезу хинолина (*eng.* green synthesis) чије су предности у односу на традиционалну методу знатно краће време реакције и употреба воде као растварача што доприноси очувању животне средине. У овој реакцији анилин (**7**) реагује са глицеролом (**9**) у односу 1:3 у присуству сумпорне киселине која има улогу катализатора. Након 15 минута, добијени хинолин (**1**) је изолован у ниском приносу (8%), али повећање количине катализатора резултовало је повећаном конверзијом анилина при чему је финални производ добијен у приносу од 44%. Такође, у реакцији са супституисаним анилинима (**8**), успешно су добијени и моно-супституисани хинолини (**10**) у ниским до умереним приносима (10-66%).





Схема 3. Модификована Скраур-ова реакција у присуству микроталасног зрачења.

### 1.2.2. Doebner-ова метода синтезе хинолина

Doebner-ова реакција представља још једну методу за синтезу хинолинских система. Заснива се на реакцији анилина са бензалдехидом и пирогрожђаном киселином при чему настају 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине. Ова реакција представља један од главних путева за синтезу 2-супституисаних хинолин-4-карбоксилних киселина, а њена распрострањеност приписује се могућности добијања разноврсних хинолинских деривата. У овој трокомпонентној реакцији учествују анилин (7), одговарајући алдеhid (11) и пирогрожђана киселина (12) при чему настају хинолински деривати (13) приказани на Схеми 4.

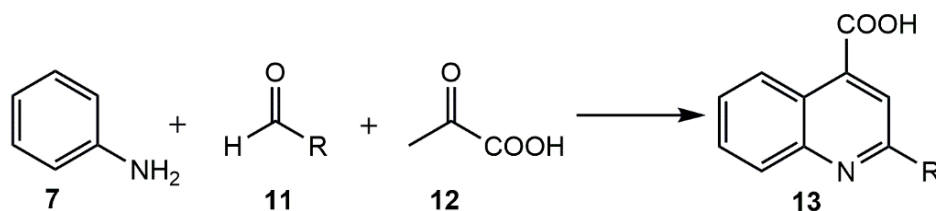


Схема 4. Doebner-ова реакција.

Узимајући у обзир да је ова реакција окарактерисана ниским приносима и дугим реакционим временом, постоји доста измењених метода од којих неке подразумевају употребу Brønsted-ових киселина као катализатора, високе температуре и микроталасног зрачења. Како би повећали принос финалних деривата, Wang и сарадници<sup>22</sup> су у својој студији применили неколико катализатора, али су најбољи принос постигли користећи Lewis-ову киселину итербијум перфлуороктаноат  $\text{Yb}(\text{PFO})_3$ , при чему се реакција између пирогрожђане киселине (12), моносупституисаног анилина (8) и алдеhида (14) одвијала у воденој средини на рефлуксу (Схема 5). Финални деривати хинолин-4-карбоксилне киселине (15) добијени су у умереном до добром приносу (25-76%), од којих је дериват са највишим приносом супституисан метил групом на анилину и ароматичном прстену алдеhида ( $\text{R} = \text{R}_1 = p\text{-CH}_3$ ). На овај начин, успешно су избегнути органски растварачи и дуго време реакције, док се катализатор након завршене реакције може регенерисати и поново користити.

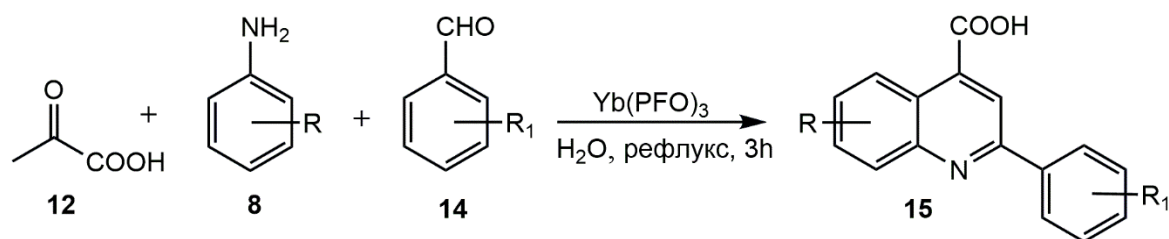


Схема 5. Doebner-ова реакција катализована итербијум перфлуороктаноатом.

### 1.2.3. Doebner-Von Miller-ова метода синтезе хинолина

Doebner-Von Miller-ова реакција је настала модификацијом Skraup-ове синтезе. Уместо глицерола, у овом случају  $\alpha,\beta$ -незасићена једињења реагују са ароматичним аминима у присуству киселог катализатора или јода. Doebner-Von Miller-ова метода је распрострањенија, јер не захтева присуство токсичних оксиданата као што је то неопходно у Skraup-овој синтези. Међутим, ова реакција је склона кисело-катализованој полимеризацији карбонилног супстрата што резултује ниским приносима главног производа.

Ramann и Cowen су модификовали ову синтезу, па се у њиховој реакцији анилина (**7**) и акролеина (**16**) у односу 1:2 у бифазном систему у коме се налазе једнаке количине толуена и 6N HCl, добија хинолин (**1**) у нешто вишем приносу.<sup>23</sup> Промена односа толуена и киселине у корист киселине, може да повећа принос реакције и до 28%. Поред несупституисаних хинолина, овом методом могу се добити и супституисани производи јер у реакцији могу учествовати супституисани ароматични амини (**8**), као и енали (**17**), при чему настаје дериват код ког је хетероароматични део хинолина супституисан у положају C2 (**18**) (Схема 6).

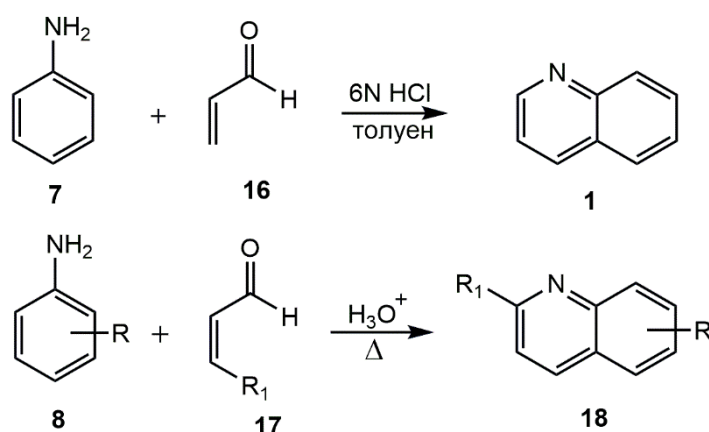


Схема 6. Doebner-Von Miller-ова синтеза несупституисаног и супституисаног хинолина.

### 1.2.4. Conrad-Limpach-ова метода синтезе хинолина

Conrad-Limpach-ова реакција је описана још 1887. године и помоћу ње се као крајњи производи добијају 4-хинолони, који често подлежу изомеризацији до 4-хидроксихинолина.<sup>24</sup> У овој синтези учествују примарни ароматични амини, најчешће анилин (**7**) који реагују са карбонилном групом  $\beta$ -кетоестера (**19**), при чему као интермедијер најпре настаје Schiff-ова база (**20**) која циклизује до финалних хинолинских деривата (**21**) (Схема 7).

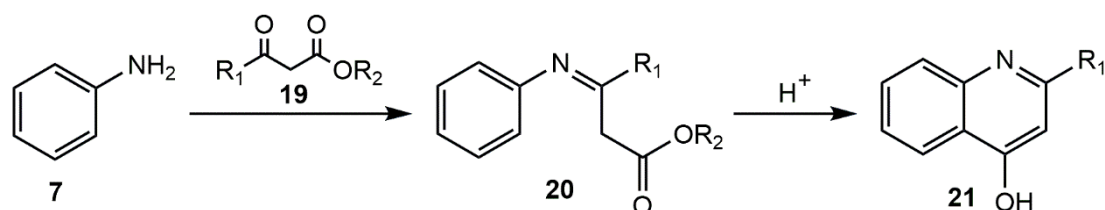


Схема 7. Conrad-Limpach-ова синтеза супституисаних 4-хидроксихинолина.

Међутим, током кондензације примарних ароматичних амина са  $\beta$ -кетоестрима, амино група такође може да реагује са естарском групом  $\beta$ -кетоестра, притом формирајући  $\beta$ -кетоацетамидни интермедијер, који се даље циклизује у 2-хидроксихинолин. Ова врста конверзије је првобитно откривена код Knorr-ове реакције добијања хинолина па се Conrad-Limpach-ова синтеза хинолина често назива и Conrad-Limpach-Knorr-ова синтеза. Ипак, између ових метода постоје знатне разлике, па самим тим уколико је реакција изведена при повишеној температури, крајњи производ ће одговарати Knorr-овој реакцији, док нижа температура доводи до Conrad-Limpach-овог производа. Такође, у овој реакцији је присуство јода или киселог катализатора често неопходно, док се уместо  $\beta$ -кетоестера могу користити и ацетоацетонитрили<sup>25</sup> или Meldrum-ова киселина<sup>26</sup> како би се добили 4-хидроксихинолини.

### 1.2.5. Povarov-љева метода синтезе хинолина

Povarov-љева реакција представља мултикомпонентну реакцију између ароматичног амина (**7**), алдехида (**11**) и активiranог алкена (**22**) где прво долази до формирања Schiff-ове базе између амина и алдехида, која даље реагује са активираним алкеном у присуству Lewis-ове или Brønsted-ове киселине. У овој реакцији се најпре формирају тетрахиdroхинолини (**23**) који се оксидују до финалних хинолинских деривата (**24**) помоћу реагенса као што су 2,3-дихлоро-5,6-дицијано-1,4-бензохинон (DDQ),  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ ,  $\text{Pd}/\text{C}$  или загревањем на ваздуху (Схема 8). Заправо, ова синтеза је привукла велику пажњу јер представља [4 + 2] циклоадицију између ароматичног амина који има улогу диена и олефина богатог електронима као диенофила.<sup>27</sup> Како би се повећала нуклеофилност олефина, пожељно је да  $\text{R}_2$  супституенти буду електрон-донорске групе.

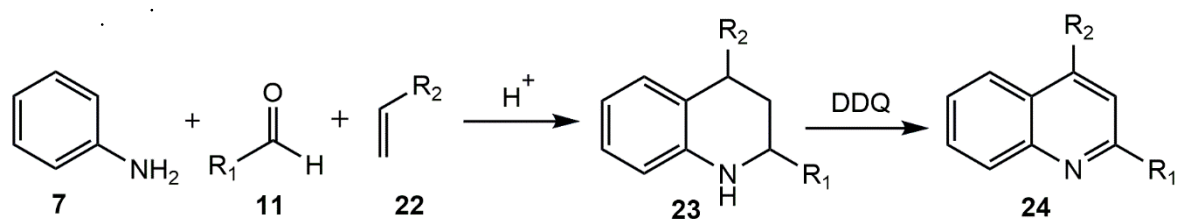


Схема 8. Povarov-љева циклоадициона реакција.

### 1.2.6. Knorr-ова метода синтезе хинолина

Слично Conrad-Limpach-овој методи, у Knorr-овој реакцији кондензације учествују примарни ароматични амини (**7**) и  $\beta$ -кетоестри (**25**), где амино група амина реагује са естарском групом  $\beta$ -кетоестра при чему настају 2-хидроксихинолини (**27**) (Схема 9).<sup>28</sup>

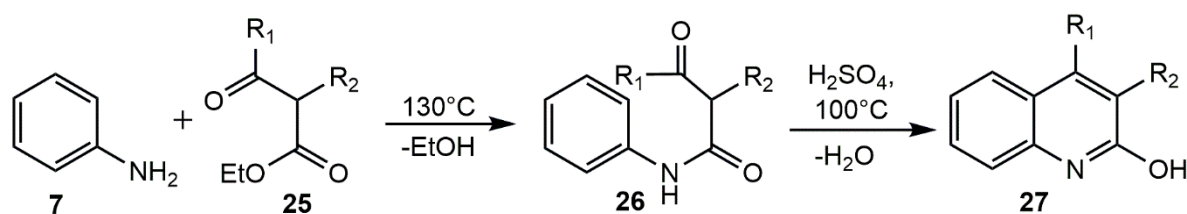


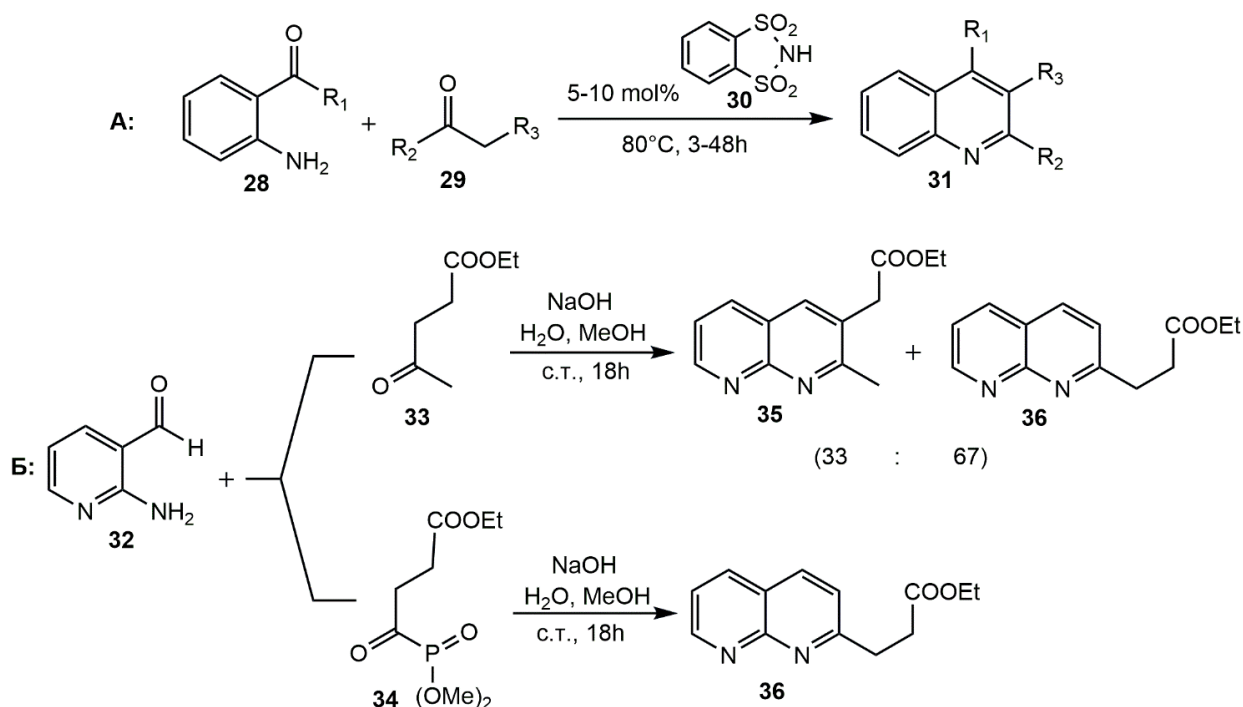
Схема 9. Супституисани хидроксихинолини добијени Knorr-овом синтезом.

Као интермеђијер у овој реакцији настаје анилид (**26**) који се загревањем у сумпорној киселини, уз губитак молекула воде, циклизује до финалних деривата.

### 1.2.7. Friedländer-ова метода синтезе хинолина

Friedländer-ова реакција, у којој учествују 2-аминобензалдехиди и кетони, представља најстарију и најједноставнију методу за синтезу хинолина. Велику пажњу је привукла због могућности супституције и разноврсности функционалних група како на ариламину, тако и на кетону.<sup>29</sup> Као катализатори најчешће се користе трифлуорсирћетна киселина (TFA), јод, Lewis-ове киселине или *p*-толуенсулфонска киселина.

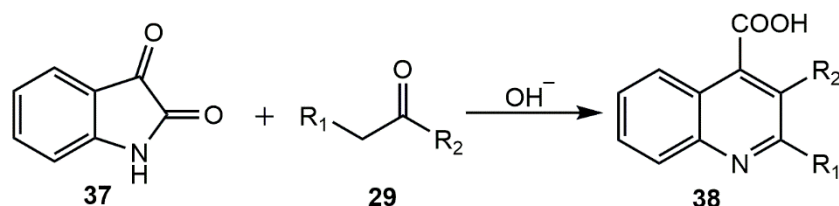
У последњих неколико година појавило се неколико Brønsted-ових верзија кисело катализоване Friedländer-ове реакције. Dughera и сарадници су користили *o*-бензендисулфонимид (**30**) без присуства растварача у реакцији 2-аминоарилкетона (**28**) са другим кетонима (**29**).<sup>30</sup> На овај начин, добили су неколико 2,3-дисупституисаних хинолина (**31**) као и друге цикличне петочлане системе у добрим приносима (55-100%) (Схема 10, А). Међутим, ова метода има своје недостатке; уколико се користи асиметричан кетон могуће је добити 2-супституисане и 2,3-дисупституисане хинолине као производе у реакцији. Региоселективност се може поспешити увођењем одређене групе на један од  $\alpha$ - угљеникових атома, што је приказано у реакцији између 2-амино никотиналдехида (**32**) са етил 4-оксопентаноатом (**33**) где се добија смеша два производа у односу 33:67, док увођењем фосфонатне групе на карбонилно једињење (**34**) реакција води формирању само једног производа (Схема 10, Б).<sup>31</sup>



**Схема 10.** А) Brønsted-ова верзија кисело катализоване Friedländer-ове реакције;  
 Б) Friedländer-ова реакција 2-амино никотиналдехида са етил 4-оксопентаноатом.

### 1.2.8. Pfitzinger-ова метода синтезе хинолина

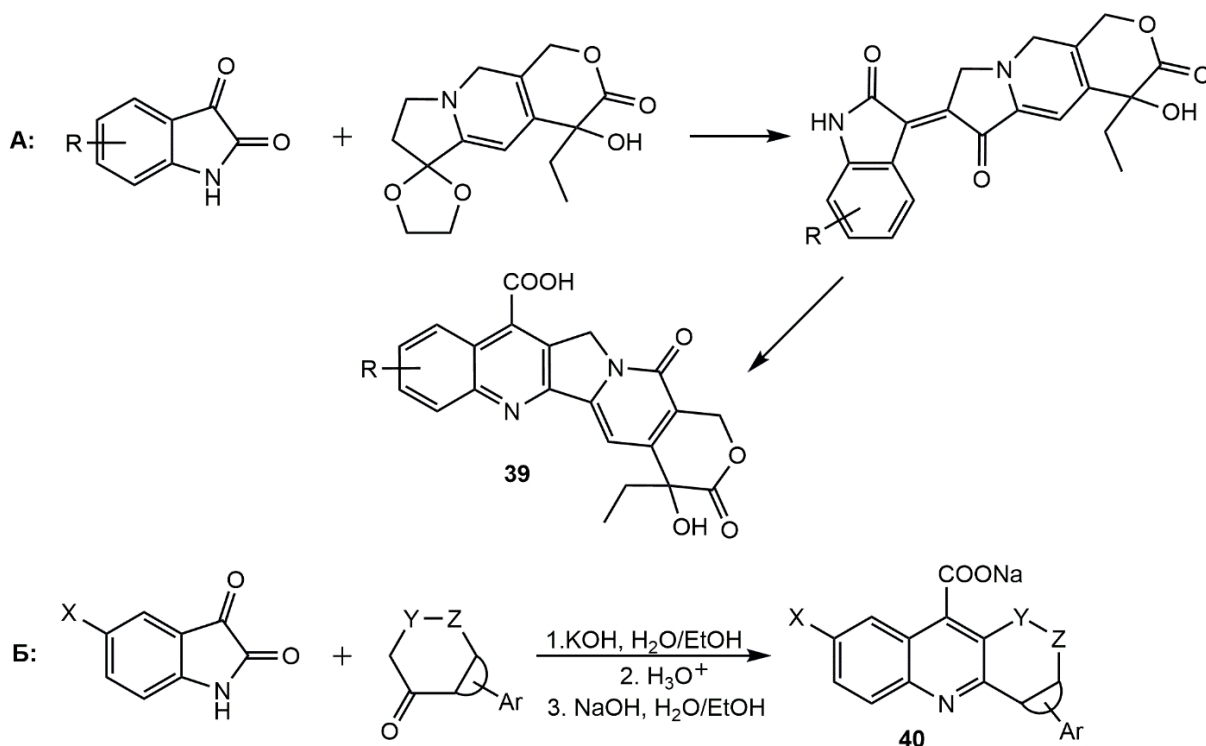
У односу на претходно описане методе, ова реакција представља другачији приступ синтези хинолининских деривата. Уз обавезно присуство јаког нуклеофила (најчешће хидроксида), изатин (**37**) реагује са кетонима (**29**) формирајући 2,3-дисулституисане деривате хинолин-4-карбоксилне киселине (**Схема 11**).



**Схема 11.** Pfitzinger-ова реакција циклизације.

Зависно од базе, као и растварача који се користе у реакцији, изатин може реаговати са 1,3-дикарбонилним једињењима или  $\alpha$ -метилен кетонима на два различита начина. Оба протокола су описана у литератури, а један од њих представља алдолни тип реакције у којој су финални производи 3-хидроксииндоли.<sup>32</sup> Ови деривати настају у случају када се користе органски растварачи и средње јаке или слабе базе као што су имидазол, пролин, пиперидин, триетиламин (ТЕА), 4-диметиламинопиридин (DMAP), 1,4-диазабцикло[2,2,2]октан (DABCO) или 1,8-диазабцикло[5,4,0]ундец-7-ен (DBU). Други тип реакције се одвија у воденој средини и захтева присуство јаке базе (најчешће се користи калијум хидроксид), док закисељавање хлороводоничном киселином води настајању хинолин-4-карбоксилних киселина.<sup>32</sup>

Многа биоактивна једињења су синтетизована управо помоћу Pfitzinger-ове реакције, као на пример деривати Samptothecin-a (**39**) који представљају инхибиторе топоизомеразе I (Схема 12, А) или деривати Brequinar-a (**40**, Б) који инхибирају ензим дихидрооратат дехидрогеназу.

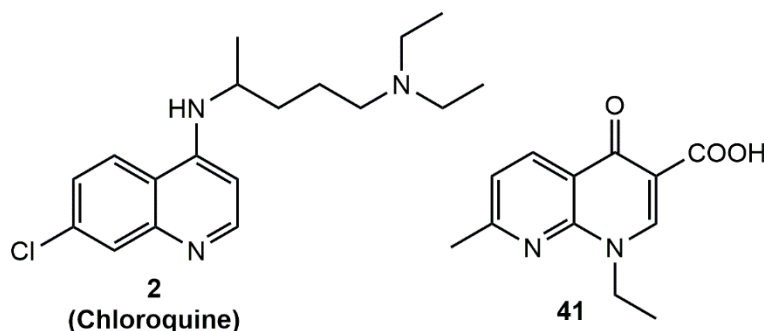


### 1.3. Биолошка активност деривата хинолина

Као што је већ поменуто, деривати хинолина показују широк спектар биолошких активности. У природи се ова једињења срећу у биљкама углавном у облику алкалоида, док као синтетички деривати представљају потенцијалне лекове који имају веома разнолико дејство: антиоксидативно,<sup>4,33</sup> антивирално,<sup>34-36</sup> антиинфламаторно,<sup>37,38</sup> антиконвулзивно,<sup>39</sup> антибактеријско,<sup>40,41</sup> антифунгално,<sup>42,43</sup> антитуморско<sup>44-46</sup> и аналгетско.<sup>37</sup> Такође, многи припадници ове класе једињења имају способност да инхибирају одређене ензиме. Поред тога, они се користе у агрохемији, али и у фармацеутској индустрији као агенси са значајним биолошким дејствима о чему ће бити више речи у даљем тексту.

#### 1.3.1. Антибактеријска и антифунгална активност деривата хинолина

Leshar и сарадници су 1962. године из антималаријског агенса Chloroquine (**2**) генерисали први синтетички антибиотик, односно налидиксинску киселину (NegGram<sup>®</sup> **41**, Слика 3).<sup>47</sup>

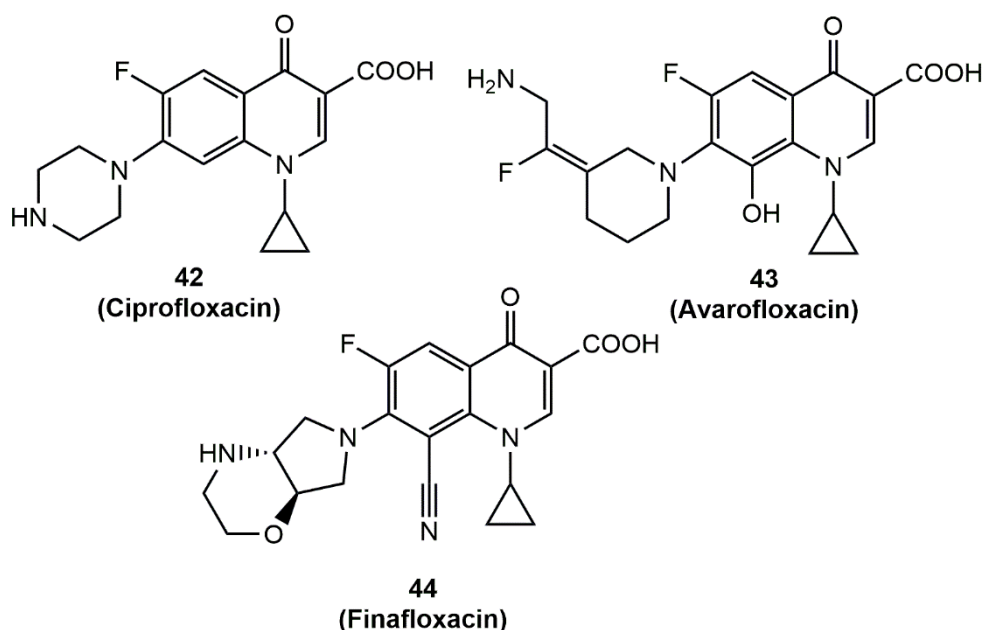


Слика 3. Антималаријски агенс Chloroquine и налидиксинска киселина.

Ова киселина се користила у лечењу инфекције уринарног тракта (*енг.* Urinary tract infections, UTIs). Временом, откривени су нови деривати хинолона који су се показали као добри антибиотици за лечење различитих врста инфекција изазваних бактеријама.<sup>48</sup> Заправо, антибактеријско деловање хинолона огледа се у њиховој могућности да инхибирају ДНК гиразу која је ангажована у ДНК репликацији код бактерија што узрокује њихову смрт.<sup>49</sup>

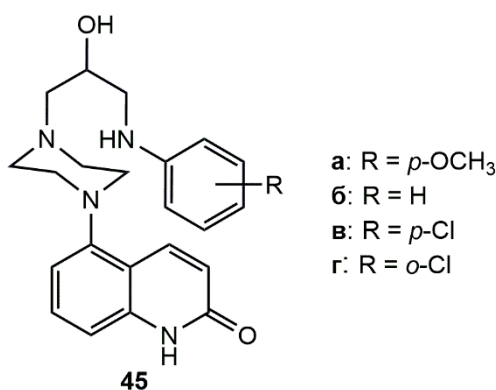
На Слици 4 приказани су деривати флуорохинолона који испољавају антибактеријско дејство. Ciprofloxacin (Cipro) је лек који је FDA (*енг.* Food and Drug Administration) одобрила. Користи се у сузбијању инфекција уринарног тракта, коже, костију, гастроинтестиналног или респираторног тракта изазваних *грам*-негативним бактеријама.<sup>50</sup> Avafloxacin, који такође припада групи флуорохинолона, показује одличну активност према патогенима који узрокују упалу плућа (*енг.* community-acquired pneumonia, CAP), као на пример *Streptococcus pneumoniae*, *influenza A*, *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae*.<sup>51</sup> Finafloxacin (Xtoro<sup>®</sup>) је антибиотик који је такође одобрен од стране FDA, а успешно се користи у лечењу акутне упале спољашњег уха коју проузрокују бактерије *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.<sup>52</sup>





Слика 4. Антибактеријски агенси који су деривати флуорохинолона.

Поред антибактеријског деловања, хинолонски деривати делују и антифунгално. На Слици 5 приказани су деривати **45a** ( $IC_{50} = 0,10 \text{ mM}$ ) и **45b** ( $IC_{50} = 0,15 \text{ mM}$ ) чија је антифунгална активност боља од референтног једињења (Polyoxin B,  $IC_{50} = 0,18 \text{ mM}$ ). Такође су ова једињења показала *in vitro* антифунгално дејство према следећим врстама: *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* и *Cryptococcus neoformans*.<sup>50</sup> У случају *Candida albicans* врсте, задовољавајуће МИС (енг. Minimum inhibitory concentration) вредности показали су деривати **45a**, **45b-г**, које су и овог пута биле боље од референтног једињења Polyoxin B (Слика 5).<sup>49</sup> Додатно, тестирани деривати представљају инхибиторе хитин синтазе и окарактерисани су као једињења која имају селективну антифунгалну активност.

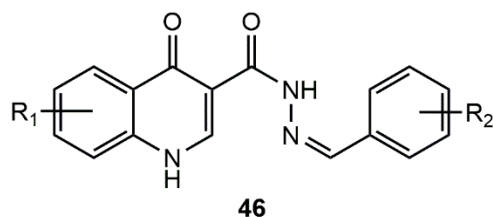


Слика 5. Дериват хиолин-2-она поседује антибактеријско и антифунгално дејство.

Деривати 4-хинолона (**46**) приказани на Слици 6, показују добру антифунгалну активност са МИС вредностима које се крећу у опсегу од 0,49 до 62,5  $\mu\text{g/mL}$  према тестираним врстама: *Aspergillus fumigatus* и *Candida albicans*. Једињења код којих је хлор на С7 позицији хиолинског фрагмента, показују бољу активност од оних код којих је хлор на С6 атому. Такође, бољу активност су испољила и једињења код којих



је бензенов прстен дисупституисан, при чему су њихове МИС вредности биле ниске (0,49  $\mu\text{g/mL}$ ).<sup>53</sup>



$R_1 = m\text{-Cl, } p\text{-Cl}$

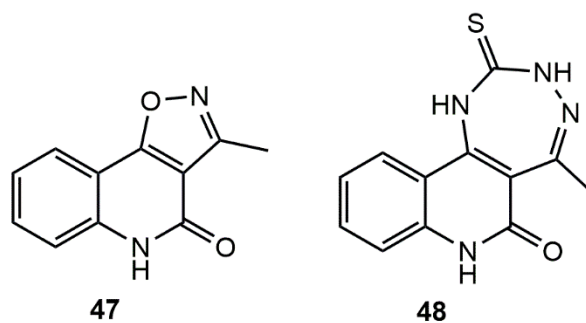
$R_2 = \text{Cl, di-Cl, F, CH}_3, \text{OCH}_3, \text{di-CH}_3, \text{di-OCH}_3, \text{tri-OCH}_3$

Слика 6. Деривати 4-хинолона имају антифунгално дејство.

### 1.3.2. Антиоксидативна активност деривата хинолина

Као што је већ познато, присуство слободних радикала у биолошким системима у количини која надмашује постојеће механизме за њихову неутрализацију доводи до оксидативног стреса.<sup>54</sup> Наиме, слободни радикали су изузетно реактивни и ступају у хемијске реакције са макромолекулима при чему долази до оштећења и дисфункције органа. Реактивне кисеоничне врсте (*енг.* Reactive oxygen species, ROS), најзаступљенији тип слободних радикала у биолошким системима, углавном потичу из егзогених извора као што су аеро-загађење, храна или радијација, али такође настају и ендогено тј. у организму човека током метаболичких процеса.<sup>4</sup> Улога антиоксиданата јесте уклањање, тј. неутрализација слободно-радикалских интермедијера из оксидационих реакција, при чему не долази до оштећења ћелија. У антиоксидансе спадају редукујући агенси попут тиола (нпр. глутатион), полифенола, аскорбинске киселине, витамина Е, као и ензими антиоксидативне заштите (каталаза, супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза). У литератури су познати и деривати хинолина који испољавају антиоксидативну активност.<sup>55</sup>

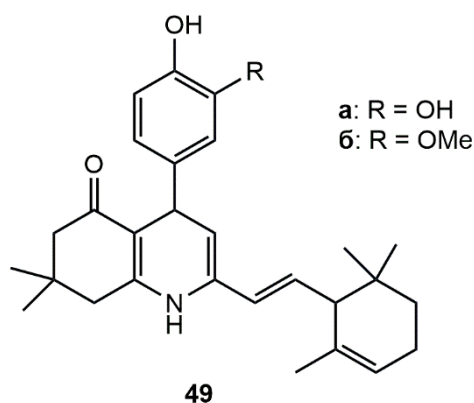
Sankaran и сарадници су у свом раду приказали антиоксидативну активност деривата хинолин-2-она, при чему су једињења тестирана *in vitro*, а као референтно једињење коришћен је 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH).<sup>49</sup> Такође, за синтетизоване деривате одређен је и антиоксидативни капацитет у односу на познати антиоксиданс тролокс који представља аналог витамина Е растворан у води (*енг.* Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) као и још један параметар који представља могућност смањивања концентрације гвожђа у плазми (*енг.* Ferric reducing ability of plasma, FRAP). Од свих тестираних деривата, једињења **47** и **48** су показала најзначајнију антиоксидативну активност (Слика 7), где се једињење **47** истиче са вредностима FRAP теста од 205,2 mmol Fe(II)/g и 3879,2  $\mu\text{mol Trolox/g}$  у случају TEAC теста.



Слика 7. Деривати хинолин-2-она који имају антиоксидативно дејство.

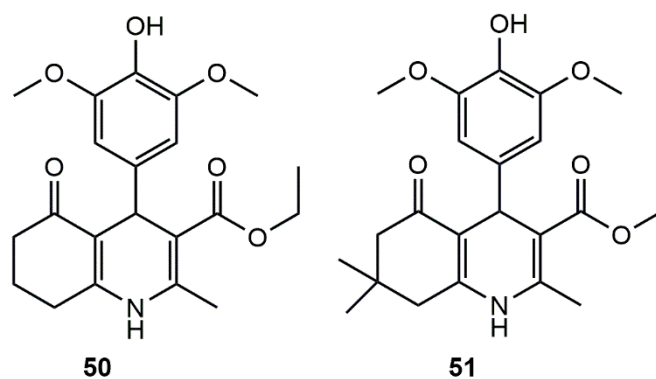
Резултати су показали да присуство сумпора (**48**) у триазепинском делу молекула има добар утицај на активност једињења.

Findik и сарадници су својим истраживањем показали да и присуство катехолских група има позитиван утицај на антиоксидативне особине неког једињења.<sup>56-58</sup> Они су представили серију 7,8-дихидрохинолин-5-(1Н, 4Н, 6Н)-она који су показали високу антиоксидативну активност захваљујући присуству фенолних група (Слика 8).



Слика 8. Деривати 7,8-дихидрохинолин-5-(1Н, 4Н, 6Н)-она који су антиоксиданси.

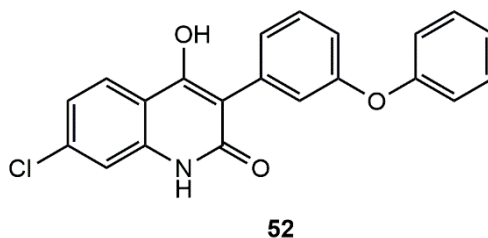
Такође, присуство метокси група поспешује активност, па су Yang и сарадници синтетизовали деривате хексахидрохинолина и испитали њихову антиоксидативну активност *in vitro* у односу на већ поменути DPPH и диамонијумову со 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-сулфонске киселине) (енг. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)<sup>+</sup>).<sup>57,59</sup> Услед присуства метокси група, деривати на Слици 9 показали су веома високу антиоксидативну активност што представља основу за њихова даља истраживања.



Слика 9. Хексахидрохинолин-3-карбоксилатни деривати као антиоксиданси.

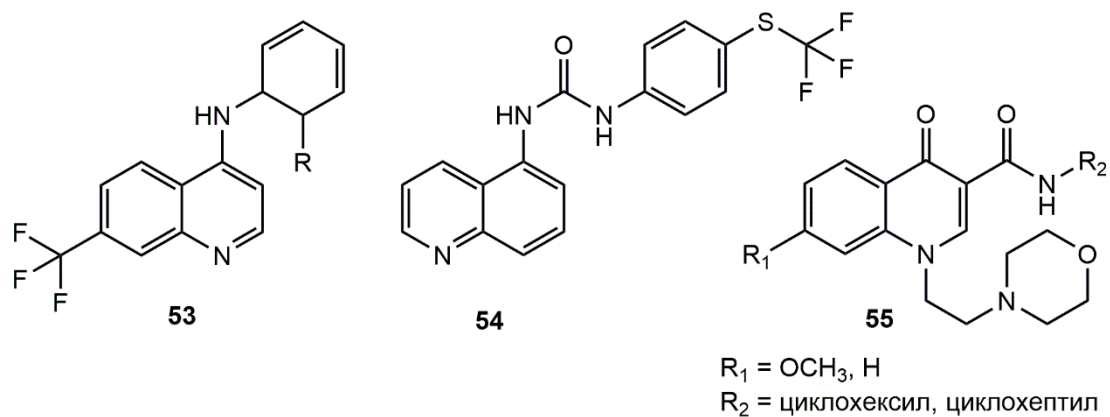
### 1.3.3. Антиконвулзивна и аналгетичка својства деривата хинолина

Антиконвулсанти или антиепилептици су лекови који су нашли широку примену у лечењу епилепсије. Потенцијални антиконвулзивни лек који садржи хинолински фрагмент приказан је на Слици 10. Једињење **52** представља антагонист *N*-метил-*D*-аспартат (енг. *N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA) рецептора за глутамат у неуронима.<sup>58</sup>



Слика 10. Потенцијални антиконвулзивни лек, антагонист NMDA рецептора.

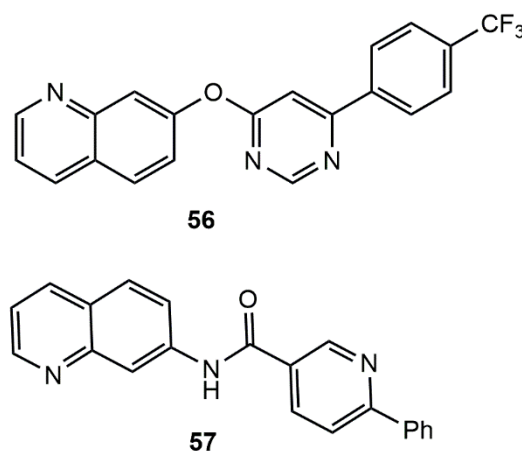
Abadi и сарадници су синтетизовали 4-супституисане-7-трифлуорметил хинолине који су показали одличне аналгетичке и антиинфламаторне особине *in vivo*, при чему се издваја дериват **53** (Слика 11) чија је антиинфламаторна активност тестирана на едему шапе пацова, а добијена вредност слична референтном једињењу (Indometacin).<sup>59</sup> Његова аналгетичка својства су једнака Glafenin-у који је у овом случају узет за референтно једињење. Као антагонисте TrpV1 рецептора (енг. Transient receptor potential cation channel; subfamily V; member 1), Gomtsyan и сарадници<sup>60</sup> су синтетизовали деривате са аналгетичким својствима од којих је најбољу активност показао дериват **54**, док су Manera и сарадници су синтетизовали дериват **55**, који представља селективни агонист канабиноид CB<sub>2</sub> рецептора (енг. Cannabinoid receptor type 2).<sup>61</sup>



Слика 11. Деривати хинолина са аналгетичким деловањем.

TrpV1 рецептори се налазе у централном и периферном нервном систему и укључени су у преношење и модулацију бола. Многи агенси који су се користили у терапији бола (капсаицин, резинифератоксин итд.) имали су нежељене нуспојаве као што су осећај печења и иритације што је подстакло научнике да своја истраживања усмере ка откривању нових потенцијалних аналгетика са бољим особинама.

Приказано једињење (**56**, Слика 12) представља потенцијални антагонист TrpV1 рецептора код миша и човека, док **57** успешно инхибира најзначајније изоформе (1A2, 2C9, 2C19, 2D6 и 3A4), цитохром P450 ( $\text{IC}_{50} > 18 \mu\text{M}$ ), а уједно представља и добар антагонист TrpV1 рецептора код човека.

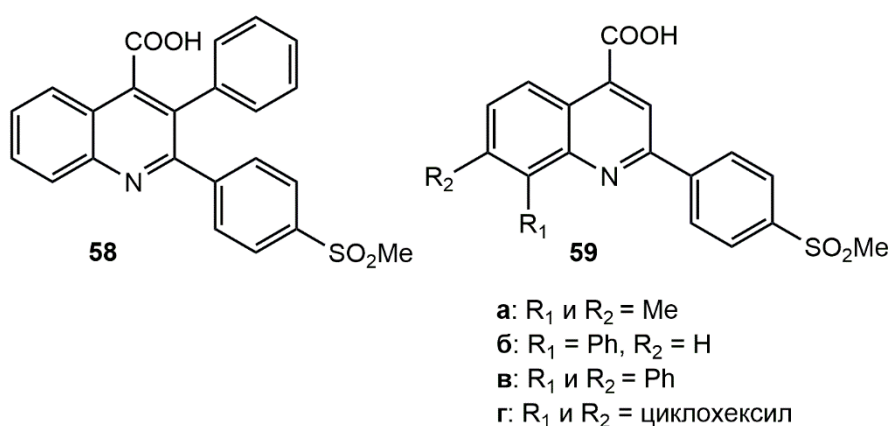


Слика 12. Деривати хинолина као потенцијални антагонисти TrpV1 рецептора (**56** и **57**) и потенцијални инхибитор цитохрома P450 (**57**).

### 1.3.4. Антиинфламаторна својства деривата хинолина

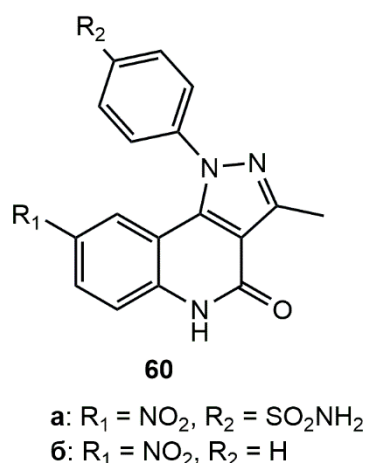
Хинолини су привукли пажњу и као антиинфламаторни агенси који имају способност инхибиције медијатора инфламације као што су циклооксигеназа-2 (енг. Cyclooxygenase-2, COX-2), фосфодиестераза 4 (енг. Phosphodiesterase 4, PDE4), неки цитокини итд.<sup>62</sup>

Трисупституисани хинолин који садржи карбоксилну групу на С4 положају (**58**, **Слика 13**) представљен је као инхибитор циклооксигеназе-2 ( $IC_{50} = 0,07\mu M$  за COX-2) са високом селективношћу  $SI = 687,1$ , што се може поредити са Celecoxib-ом (Celebra<sup>®</sup>), референтним леком ( $IC_{50} = 0,06\mu M$  за COX-2;  $SI = 405$ ).<sup>63</sup> Такође, полисупституисани дериват **59** је идентификован као инхибитор COX-2, али и COX-1 ензима, при чему инхибиторна активност зависи од липофилних карактеристика супституената на С7 и С8 положају хинолинског дела молекула. Способност инхибиције COX-2 опада следећим редом:  $IC_{50} = 0,043$  (**59a**),  $0,054$  (**59b**),  $0,071$  (**59v**) и  $0,075\mu M$  (**59g**). У односу на референтно једињење Celecoxib, дериват **59g** показује бољу инхибицију као и селективност ( $SI > 513$ ).



**Слика 13.** Хинолин-4-карбоксилне киселине као потенцијални инхибитори ензима COX-1 (**58** и **59a-г**) и COX-2 (**59a-г**).

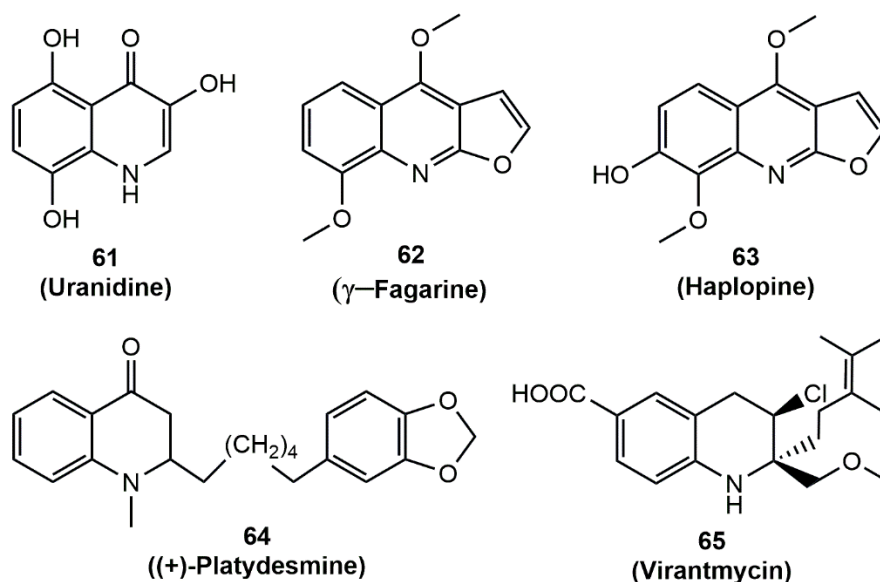
Такође, неки комплекснији системи показали су добру инхибиторну активност према овим ензимима, као што су деривати **60a** и **60b** код којих поред хинолинског прстена уочавамо и пирозолски (Слика 14). Једињење **60a** има  $IC_{50}$  вредност  $4,7\mu M$  за COX-1 и  $0,24\mu M$  за COX-2, док је дериват **60b** нешто мање активан са вредношћу  $IC_{50} = 5,0\mu M$  за COX-1 и  $IC_{50} = 0,55\mu M$  за COX-2. Претпоставља се да је присуство нитро групе на хинолинском делу молекула, као и сулфонамидне на бензеновом прстену, допринело селективности ових деривата.



**Слика 14.** Дериват хинолина са пиразолским прстеном делује као инхибитор COX-1 и COX-2 ензима.

### 1.3.5. Антивирална активност деривата хинолина

Антивирални агенси се широко примењују у спречавању репликације одређених вируса. Ови агенси се углавном добијају синтетичким путем, мада и у природи постоји доста алкалоида са овом особиним. На **Слици 15** приказани су неки од деривата изолованих из природних производа који садрже хинолински систем и испољавају антивирално дејство.<sup>64</sup>

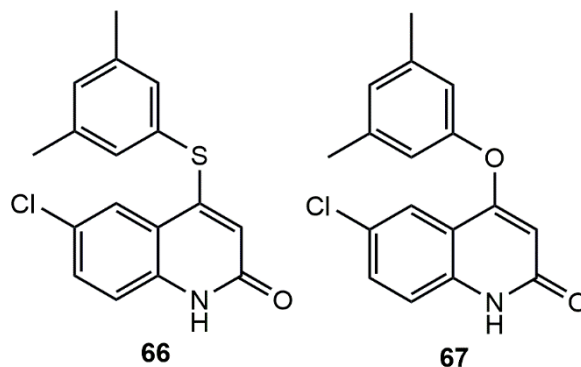


**Слика 15.** Природни антивирални алкалоиди.

Хинолински алкалоид Uranidine познат је као инхибитор реверсне транскриптазе код HIV-1 и HIV-2 вируса. Претпоставља се да присуство 3-хидрокси-4-оксо система доприноси инхибиторној активности овог једињења. Фуорохинолински алкалоиди, γ-Fagarine, Haplopine и (+)-Platydesmine, успешно инхибирају HIV-1 репликацију у H9 лимфоцитима при ниским концентрацијама (EC<sub>50</sub> < 5,85 μM), док γ-Fagarine показује

најбољи терапеутски индекс. Virantmycin такође успешно инхибира разноврсне РНК и ДНК вирусе.<sup>64</sup>

Cheng и сарадници су представили серију деривата хинолин-2-она који су показали задовољавајућу инхибиторну активност HIV-1 реверсне транскриптазе (енг. reverse transcriptase RT) *in vitro*.<sup>65</sup> Издвојили су се деривати **66** и **67** који инхибирају реверсну транскриптазу при IC<sub>50</sub> вредностима од 0,21 µМ (**66**) и 0,15 µМ (**67**) (Слика 16).



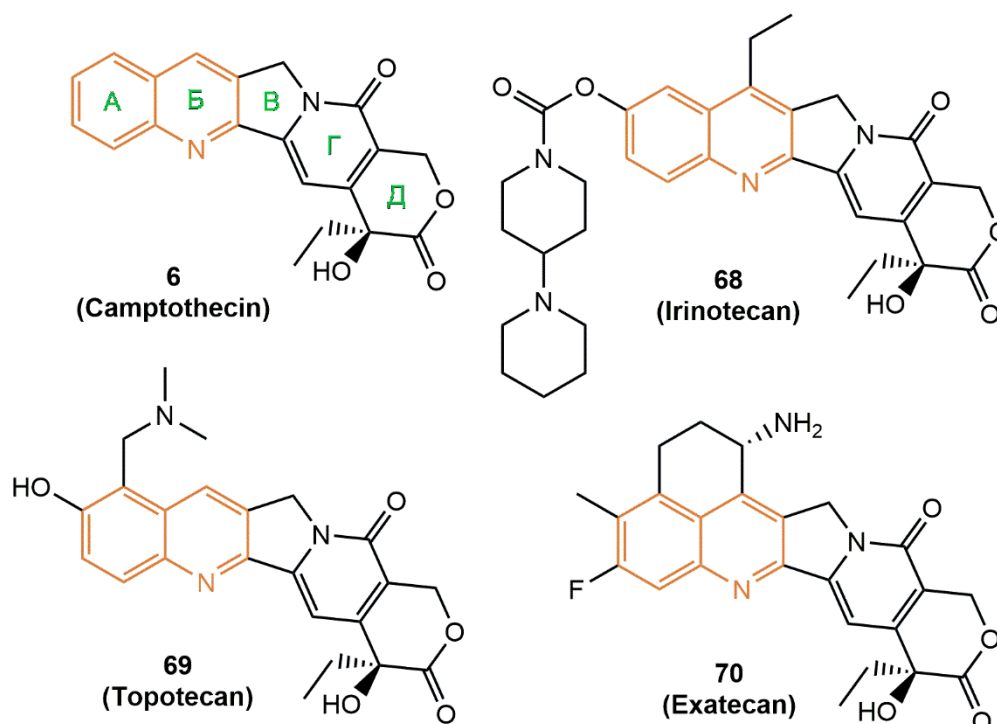
Слика 16. Инхибитори HIV-1 реверсне транскриптазе.

### 1.3.6. Антитуморска активност деривата хинолина

Хинолински прстен је често заступљен у структури антитуморских агенаса који делују тако што спречавају ћелијски раст, ангиогенезу, а у неким случајевима и прекидају миграцију ћелија итд.

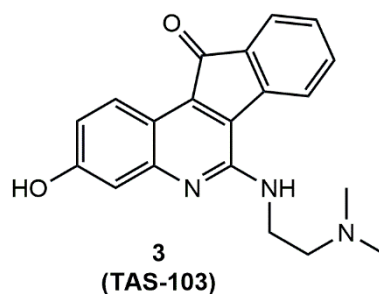
Антитуморски агенс Camptothecin, као и његови аналози Irinotecan, Topotecan и Elicatecan допринели су развоју цитотоксичних лекова који садрже хинолински прстен (Слика 17).<sup>8</sup>

Camptothecin (CPT) је цитотоксични хинолински алкалоид изолован из коре и стабла дрвета *Camptotheca acuminata*, а који је коришћен за лечење карцинома још у древној Кини. Планарна пентациклична структура се сматра најбитнијим фактором у инхибицији топоизомеразе, док најважнији део структуре представља прстен Д, који има три позициона места која су у могућности да интерагују са топоизомеразом, чиме се дезинтегрише ДНК и тиме нарушава целовитост генома што доводи до апоптозе. Такође, хидроксилна група доприноси инхибицији топоизомеразе, стварањем водоничне везе са аспарагином који се налази у активном џепу ензима. CPT аналози као што су Topotecan, Elicatecan и Irinotecan се данас широко примењују у хемиотерапији.<sup>8</sup>



Слика 17. Антитуморски агенси који у својој структури садрже хинолин.

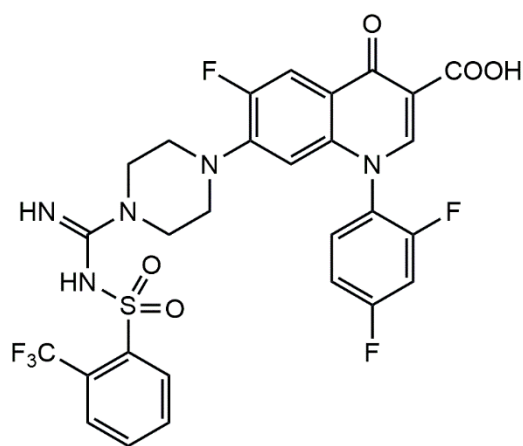
Utsugi и сарадници су представили хинолински дериват TAS-103 (Слика 18) који је показао добру инхибиторну активност према топоизомеразама I и II, као и задовољавајуће цитотоксичне ефекте *in vitro*.<sup>66</sup> Такође, ово једињење је показало одличну антитуморску активност према неким типовима тумора *in vivo*.



Слика 18. TAS-103.

На Слици 19 приказан је антитуморски агенс 71 чија се активност огледа у инхибицији топоизомеразе I. Код овог деривата је примећена антитуморска активност која је неколико пута јача у односу на активност референтних једињења (Irinotecan и *Cis-platinum*). Цитотоксичност према хуманим канцерогеним ћелијама (A549, HL-60 и HeLa) за дериват 71 је задовољавајућа ( $IC_{50} = 0,008-0,010 \mu\text{M}$ ), док  $IC_{50}$  на истим ћелијским линијама за Irinotecan износи  $0,032-0,044 \mu\text{M}$ , а за *Cis-Platinum* у интервалу од  $0,047$  до  $0,057 \mu\text{M}$ .<sup>67</sup>

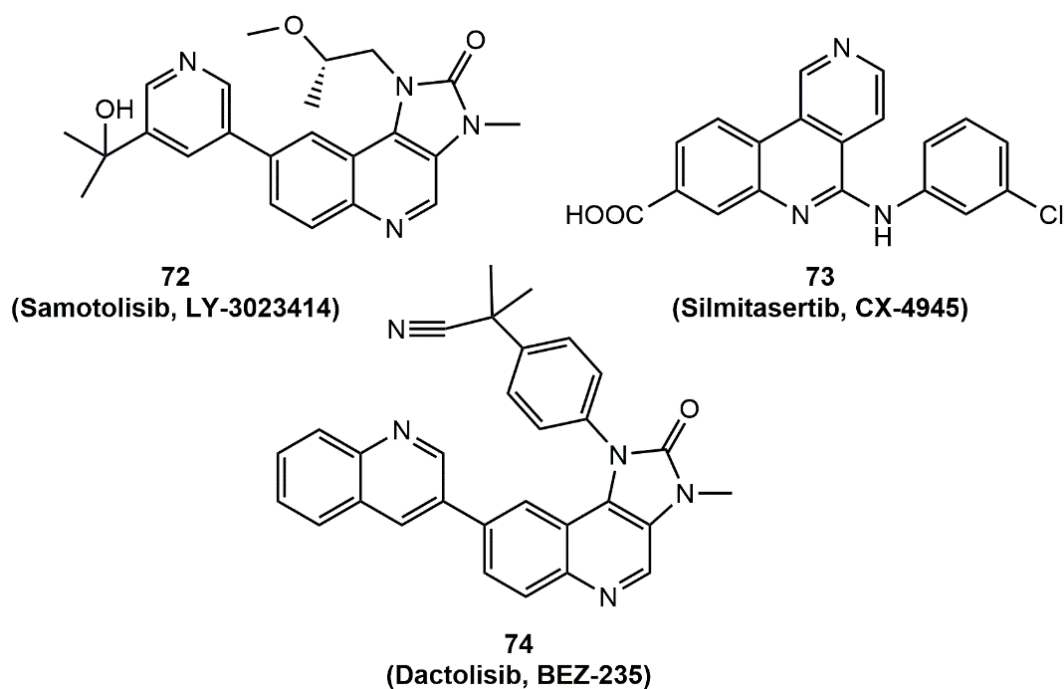




71

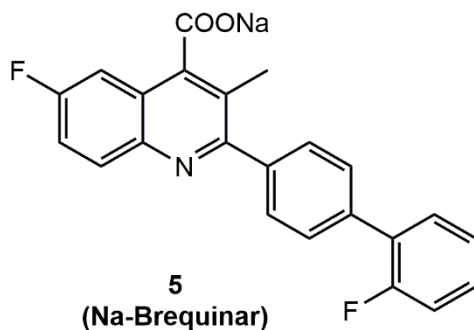
Слика 19. Флуорохинолон као потенцијални антитуморски агенс.

Поред поменутих ензима, деривати хинолина који се могу пронаћи у литературним подацима имају могућност да инхибирају неке врсте киназа, анхидраза, теломераза, синтаза итд. и на тај начин испољавају своје антитуморско дејство. На **Слици 20** приказане су структуре антитуморских агенаса који су прошли неку од фаза у клиничким испитивањима.<sup>68</sup> Samotolisib своје антитуморско дејство испољава инхибицијом киназе гликоген синтазе 3 (*енг.* glycogen synthase kinase 3, GSK-3), Silmitasertib инхибицијом казеин киназе (*енг.* casein kinase II, CK2), док Dactolisib инхибира фосфатидилинозитол-3-киназу (*енг.* phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K).

72  
(Samotolisib, LY-3023414)73  
(Silmitasertib, CX-4945)74  
(Dactolisib, BEZ-235)

Слика 20. Антитуморски агенси који су прошли прву (Samotolisib) и другу (Silmitasertib и Dactolisib) фазу клиничких испитивања.

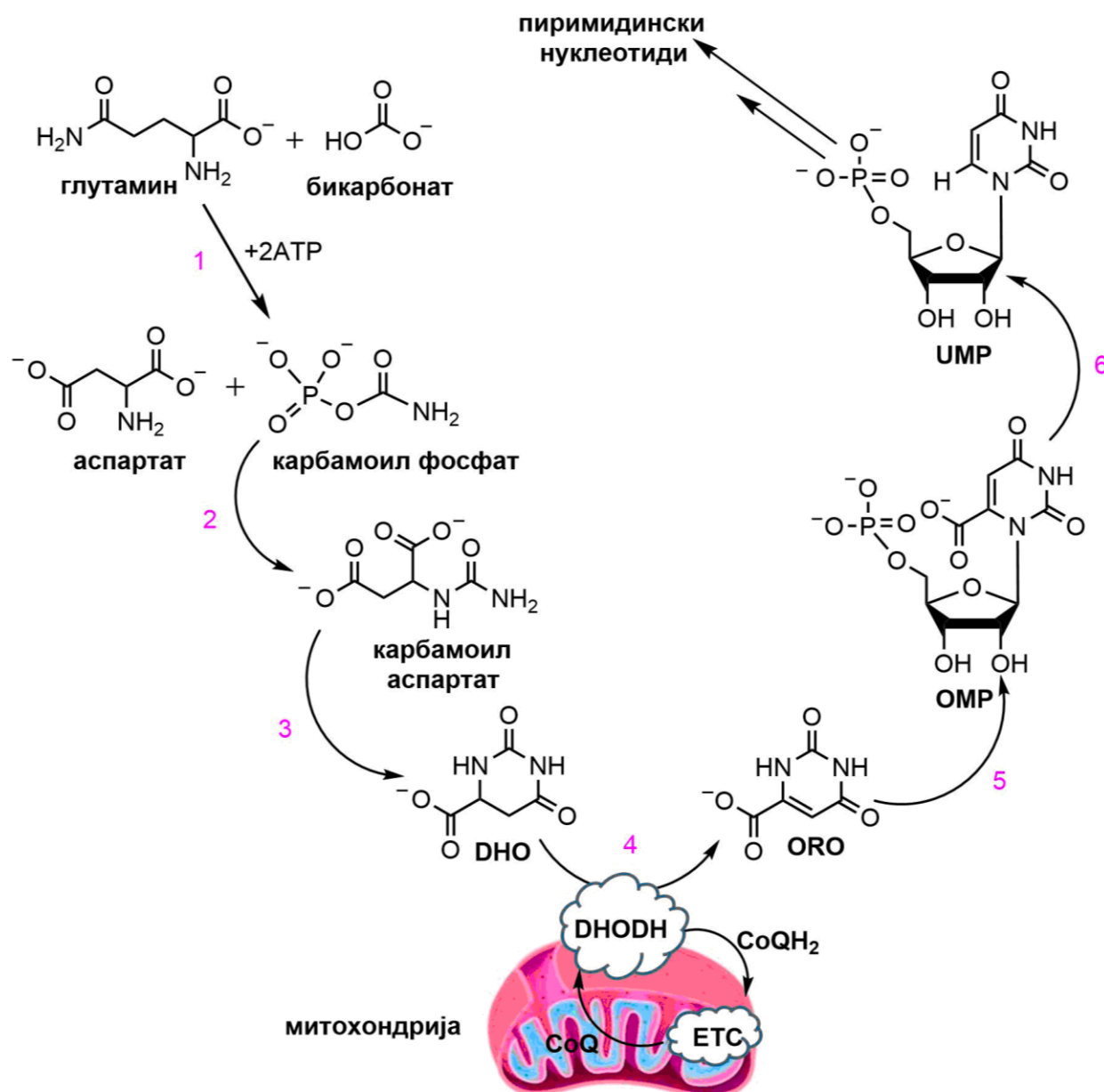
Такође, често се спомињу и инхибитори дихидрооротат дехидрогеназе, од којих је најпознатији Na-Brequinar (Слика 21). Ова со инхибицијом споменутог ензима испољава своје антитуморско дејство о чему ће бити више речи касније, док ће у наредном поглављу бити окарактерисан овај ензим као и његова улога у *de novo* синтези пиримидинских нуклеотида.



**Слика 21.** Инхибитор дихидрооротат дехидрогеназе који испољава антитуморско дејство.

#### 1.4. Дихидрооротат дехидрогеназа и њена улога у *de novo* синтези пиримидинских нуклеотида

Дихидрооротат дехидрогеназа (*енг.* dihydroorotate dehydrogenase, DHODH), која припада групи флавоензима и смештена је у унутрашњој мембрани митохондрија, представља један од ензима који учествују у процесу *de novo* синтезе пиримидина.<sup>69</sup>



**Схема 13.** *De novo* синтеза пиримидинских нуклеотида у којој учествују следећи ензими: 1) карбамоил фосфат синтетaza II; 2) L-аспартат транскарбамилаза; 3) L-дихидрооротаза; 4) дихидрооротат дехидрогеназа (DHODH); 5) оротат фосфорибозил трансфераза; 6) оротидин 5'-монофосфат декарбоксилаза: DHO- дихидрооротат; ORO-оротат; ETC- респираторни ланац.

*De novo* синтеза пиримидина (**Схема 13**) почиње стварањем карбамоил фосфата од глутамина и бикарбоната уз енергију из аденозин трифосфата (*енг.* adenosine triphosphate, АТФ). За *de novo* синтезу пиримидинских нуклеотида неопходно је шест ензима. Прва три корака синтезе катализована су ензимима који се једним именом називају САД, што представља акроним изведен из имена сваког од ензима (карбамоил фосфат синтетаза II, L-аспартат транскарбамилаза и L-дихидрооротаза).<sup>70</sup> Ови ензими се налазе у цитоплазми, а производ ових реакција, дихидрооротат (DHO), дифундује у митохондрије где долази до његове оксидације у оротат (ORO). Ензим који катализује корак оксидације је дихидрооротат дехидрогеназа, која је, насупротив осталим ензимима синтезе пиримидина, смештена у унутрашњој мембрани митохондрија. Истовремено, током оксидације дихидрооротата до оротата, долази и до редукције флавин мононуклеотида (FMN) до дихидрофлавин мононуклеотида (FMNH<sub>2</sub>). Као најспорији процес, реакција катализована овим ензимом одређује брзину синтезе пиримидина.<sup>71,72</sup> Самим тим није изненађујуће да се управо инхибицијом дихидрооротат дехидрогеназе зауставља ћелијски циклус и изазива смрт ћелије. Обзиром да нуклеотиди представљају основне градивне јединице ДНК и РНК и коензима NAD<sup>+</sup> и sarFAD, као и да су значајан извор енергије за биосинтетске процесе у ћелији,<sup>73</sup> инхибиција дихидрооротат дехидрогеназе представља могућ механизам деловања нових потенцијалних цитотоксичних лекова.<sup>74</sup>

Последња два корака синтезе пиримидина одвијају се у цитоплазми и катализована су бифункционалним ензимом односно оротат фосфорибозилтрансфераза/оротидин-5'-монофосфат декарбоксилазом (познатим и као уридинмонофосфат синтетаза). Овај ензимски комплекс се састоји из оротат фосфорибозил трансферазе и оротидин 5'-монофосфат декарбоксилазе. Оротат фосфорибозил трансфераза катализује пренос фосфорибозил групе на оротат, док у последњем кораку декарбоксилацијом коју врши оротидин-5'-фосфатна декарбоксилаза (OMP декарбоксилаза) настаје уридин монофосфат UMP. Настали производ (UMP) представља прекурсор за остале пиримидинске нуклеотиде.<sup>70</sup>

#### 1.4.1. Подела ензима дихидрооротат дехидрогеназа

На основу секвенци аминокиселина, ћелијске и ензимске локализације као и у зависности од супстрата/кофактора, DHODH ензими се могу поделити у две класе.<sup>75</sup>

*Класи-1* припадају ензими који се налазе у цитосолу, а она се даље може поделити на три подкласе, **1А**, **1Б** и **1С**.<sup>76</sup> Ензими, који припадају **1А** подкласи, су хомодимерни протеини састављени од две *purD* подјединице од којих свака садржи флавин мононуклеотид. Код ове групе ензима, која се може пронаћи у *грам*-позитивним бактеријама *Lactococcus lactis* и *Enterococcus faecalis*, фумарат је акцептор електрона. Ензими **1Б** подкласе представљају хетеротетрамере састављене од два хетеродимера од којих сваки садржи по једну *purD* и *purK* подјединицу.<sup>75</sup> Поред FMN-а, ови ензими садрже и гвожђе-сумпор кластере као и флавин аденин динуклеотид (FAD).<sup>77</sup> Ови ензими користе никотинамид аденин динуклеотид (NAD<sup>+</sup>) као акцептор електрона.<sup>78</sup> **1Б** ензими присутни су у *грам*-позитивним бактеријама као што су *Clostridium oroticum* и *Bacillus subtilis*.<sup>77</sup> У неким случајевима обе врсте ензима се налазе у истом организму (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*). Секвенце подкласа **1А** и **1Б** се подударују 30%, односно 311 идентичних аминокиселинских остатака учествује у изградњи **1А** ланца, као и *purD* подјединице **1Б** подкласе. Најновија подкласа која је идентификована је **1С** која се може пронаћи у

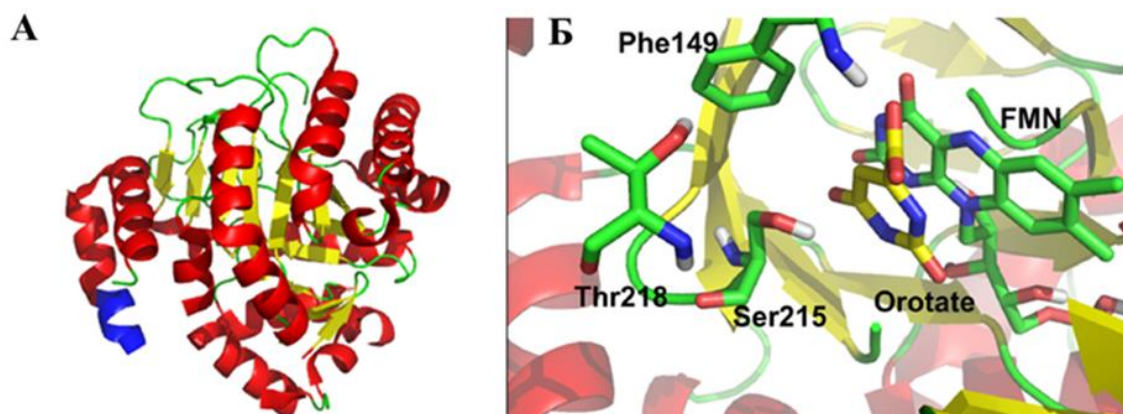
*Sulfolobus solfataricus*, а овој групи припадају ензими који користе молекулски кисеоник или CoQ у улози електрон-акцептора.<sup>79</sup>

Класи-2 припадају мономерни протеини који су код еукариота и неких прокариота смештени у унутрашњој мембрани митохондрија где је убихинон акцептор електрона. Једна од разлика између класа-1 и -2 је и у каталитичкој бази која се налази у активном центру ензима, па у случају класе-2 ту улогу има аминокиселински остатак серина, док у класи-1 остатак цистеина. Ипак, ове две класе имају мали део секвенци које се не разликују (20%). Класи-2 припада и дихидрооротат дехидрогеназа изолована код човека (енг. human dihydroorotate dehydrogenase *hDHODH*).

#### 1.4.2. Структура *hDHODH*

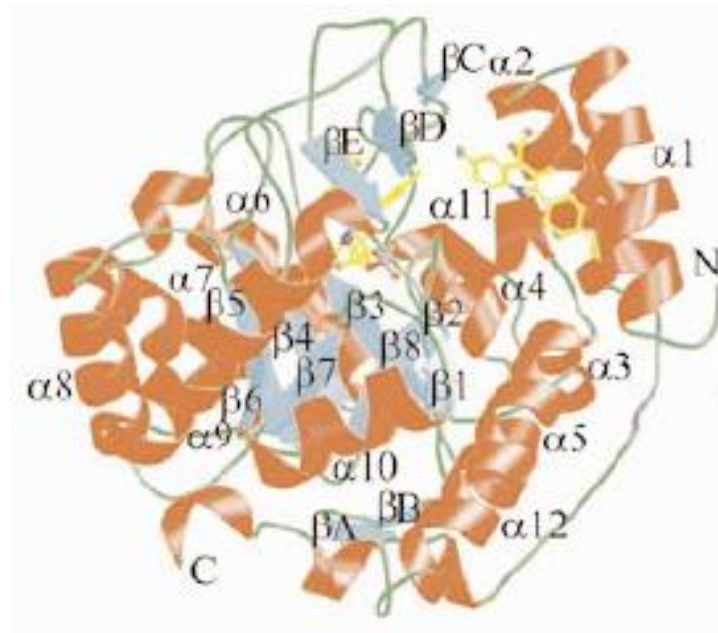
Истраживања су показала да се *hDHODH* састоји од два домена:  $\alpha/\beta$  набор који садржи активни центар и  $\alpha$ -спирални домен који формира тунел који води до активног центра ензима, односно великог карбоксилног краја (Met78 - Arg396) и мањег аминок краја (Met30 - Leu68) протеина (Слика 22, А).

Карбоксилни крај је директно повезан са аминок крајем ензима и састоји се од осам паралелних  $\beta$  ланаца ( $\beta 1$ -  $\beta 8$ ) окружених са осам  $\alpha$  хеликса ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ - $\alpha 10$  и  $\alpha 12$ ) који се савијају. Аминок крај протеина чине приближно 40 остатака који се савијају у два  $\alpha$ -хеликса повезана кратком петљом.<sup>76</sup> Ова два хеликса обухватају прорез од  $10 \times 20$  Å у такозваном хидрофобном цепу заједно са кратком петљом на уском крају овог прореза. Аминок крај се налази наспрам  $\alpha/\beta$  набора, близу  $\beta C$  и  $\beta D$  ланаца и формира тунел у ком се налази место за везивање кофактора убихинона.<sup>80</sup> Овај тунел се сужава наспрам проксималног редокс места и завршава се са неколико наелектрисаних или поларних бочних ланаца (Gln47, Tyr356, Thr360 и Arg136). Убихинон, који веома лако дифундује кроз ћелијску мембрану, користи овај тунел како би допрео до FMN<sub>2</sub> и редуковао се до убихинола.



Слика 22. А) Кристална структура *hDHODH*: Аминок крај протеина је означен плавом бојом, док је карбоксилни крај означен црвеном ( $\alpha$  хеликси), жутом ( $\beta$  набори) и зеленом (петља) бојом. Б) Најважнији аминокиселински остаци и њихова оријентација у каталитичком центру ензима према оротату (назначен жутом бојом).<sup>81</sup>

Изнад  $\alpha/\beta$  набора налазе се три антипаралелна  $\beta$  ланца ( $\beta C$ ,  $\beta D$  и  $\beta E$ ) који формирају круту структуру, док се још два антипаралелна ланца ( $\beta A$  и  $\beta B$ ) налазе испод набора (Слика 23). Овај домен, поред места где се везује FMN кофактор, садржи и активно место где се везује оротат (ORO). Велики домен формирају три *cis*-пептидне везе које су веома значајне (Pro131, Gly119 и Val282), од којих су Gly119 и Val282 неопходне за везивање FMN-а.<sup>82</sup>



**Слика 23.** Приказ структуре *hDNODH* у комплексу са инхибитором који представља Вреquina-ов аналог означен жутом бојом (атоми кисеоника црвеном, азота плавом, фосфора ружичастом и флуора зеленом бојом). Хеликси су обојени наранџастом, ланци плавом, а калемови зеленом бојом.

Ова слика је добијена коришћењем програма Molscript.<sup>83</sup>

### 1.4.3. Реакције које катализује *hDHODH* у *de novo* синтези пиримидинских нуклеотида

Дихидрооротат дехидрогеназа катализује реакције оксидације/редукције у *de novo* синтези пиримидинских нуклеотида. Дакле, у четвртм кораку ове синтезе долази до оксидације дихидрооротата (DHO) до оротата (ORO) и редукције флавин мононуклеотида (FMN) до дихидрофлавин мононуклеотида (FMNH<sub>2</sub>), односно убихинона до убихинола (Схема 14).

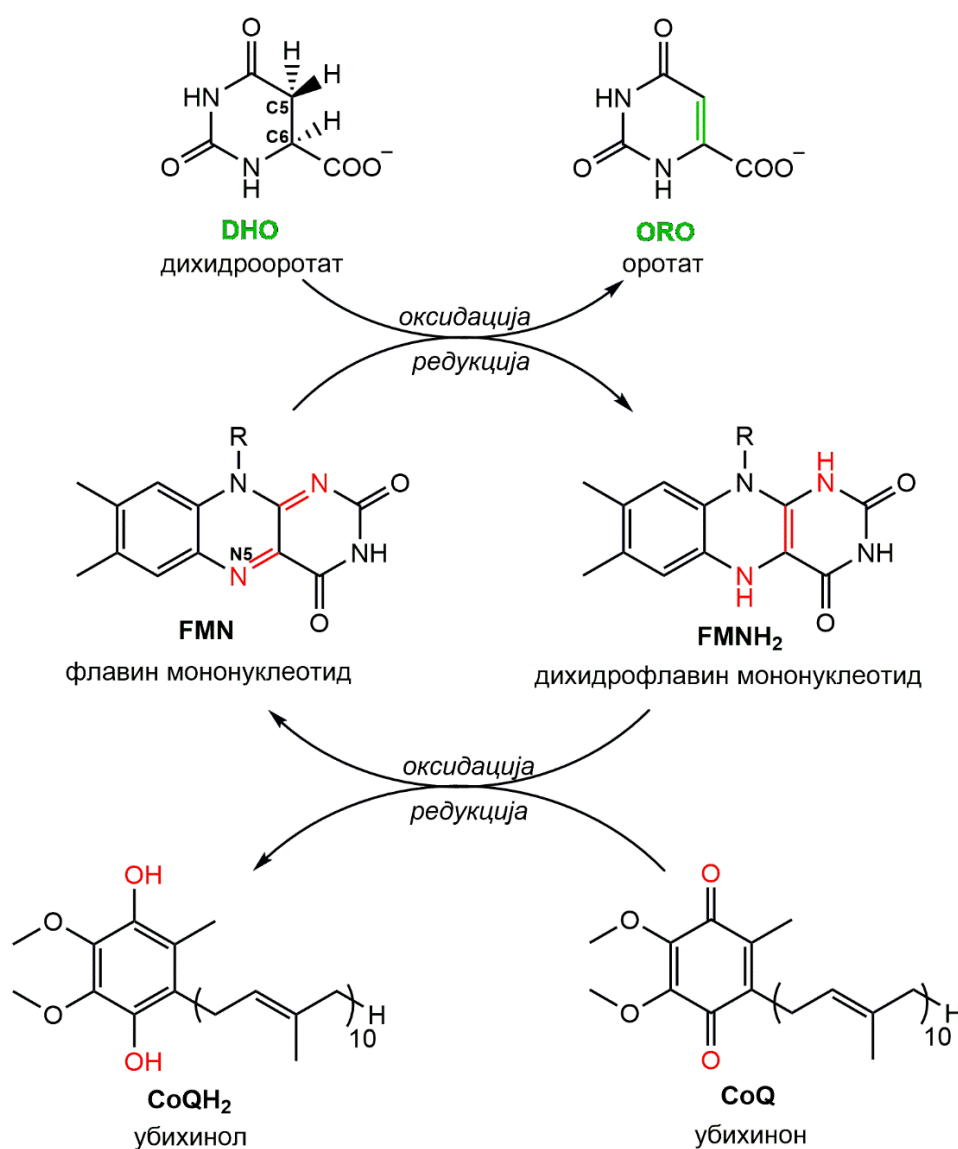
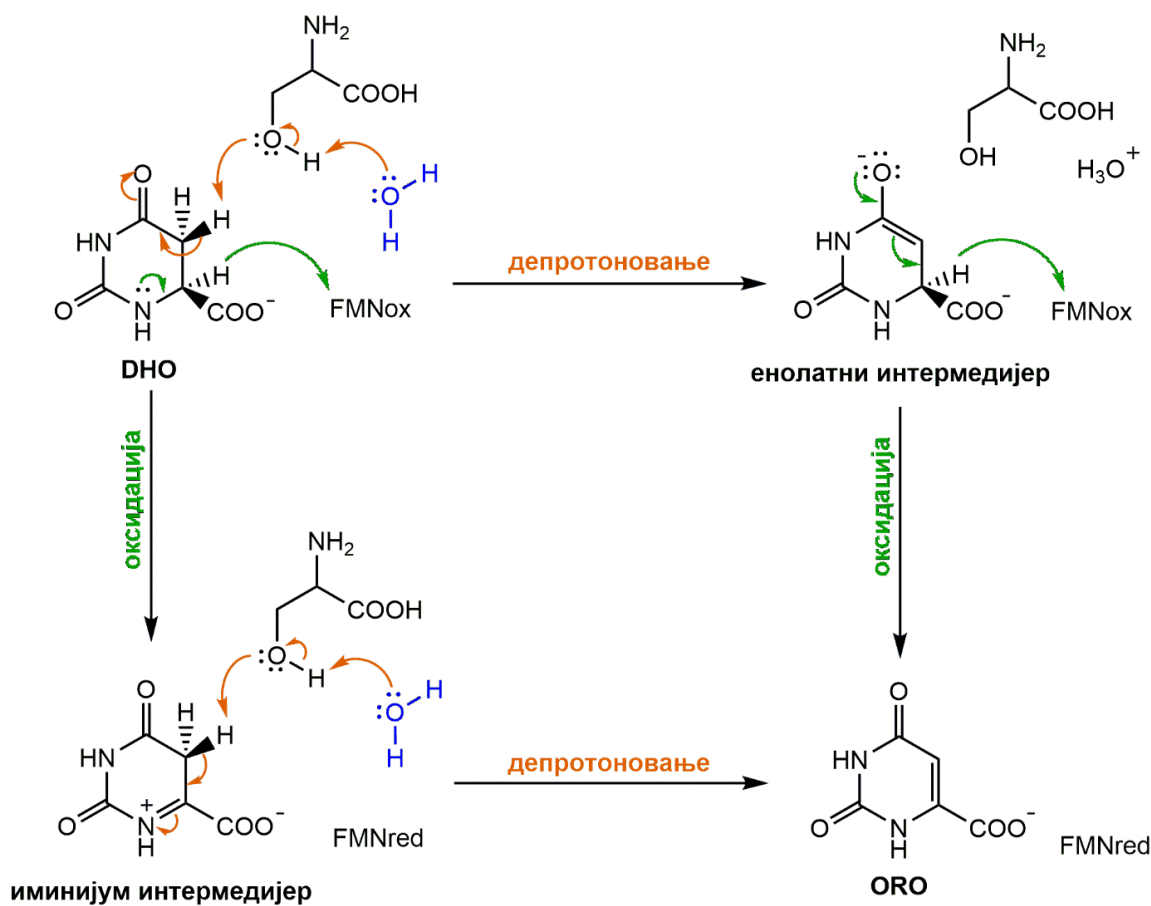


Схема 14. Реакције оксидације/редукције које катализује *hDHODH*.

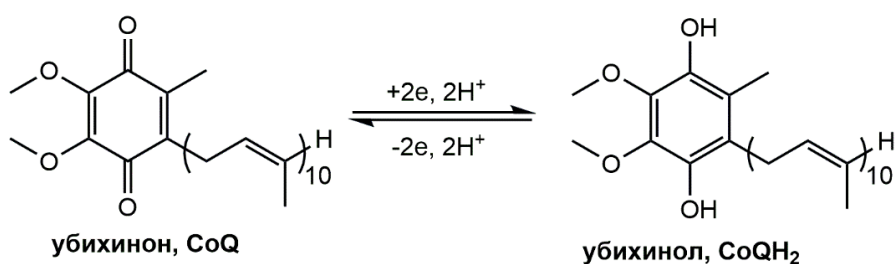
Оксидација дихидрооротата започиње депротоновањем оротата у положају C5, а затим следи хидридни пренос са положаја C6 на N5 атом изоалоксазинског прстена FMN-а (Схема 14).<sup>84</sup> Претпоставља се да је каталитичка база која покреће депротоновање на C5 угљениковом атому остатак серина Ser215 (Слика 22, Б). Студије су показале да постоје два могућа интермедијера који могу настати у овом процесу, енолатни или иминијум интермедијер (Схема 15). Нажалост, још увек није потпуно разјашњено да ли најпре долази до реакције оксидације или депротоновања.





**Схема 15.** Реакција оксидације дихидрооротата до оротата коју катализује *hDHODH*.

Након отпуштања електрона током реакције оксидације, у другој реакцији долази до регенерације FMN-а и редукције убихинона (Схема 16) из митохондријског ланца за пренос електрона (*енг.* Electron transport chain, ETC). Убихинон може примити електроне из различитих редокс путева.<sup>85</sup>



**Схема 16.** Реакција редукције убихинона до убихинола коју катализује *hDHODH*.

Код виших еукариота, DHODH врши своју функцију према такозваном *ping-pong* механизму, где флавин моноклеотид служи као интермеђијер у преносу електрона, док је убихинон финални акцептор електрона.<sup>79</sup> Овај механизам је окарактерисан настајањем интермеђијерне форме ензима након везивања првог супстрата, при чему се на крају реакције ензим налази у својој оригиналној форми (Схема 17). Након што се први супстрат веже за ензим и формиран производ напусти



$E^*P_1$  комплекс, везује се други супстрат.<sup>80</sup> После завршетка реакције, ензим у својој  $E$  форми може да понови овај процес.<sup>86, 87</sup>

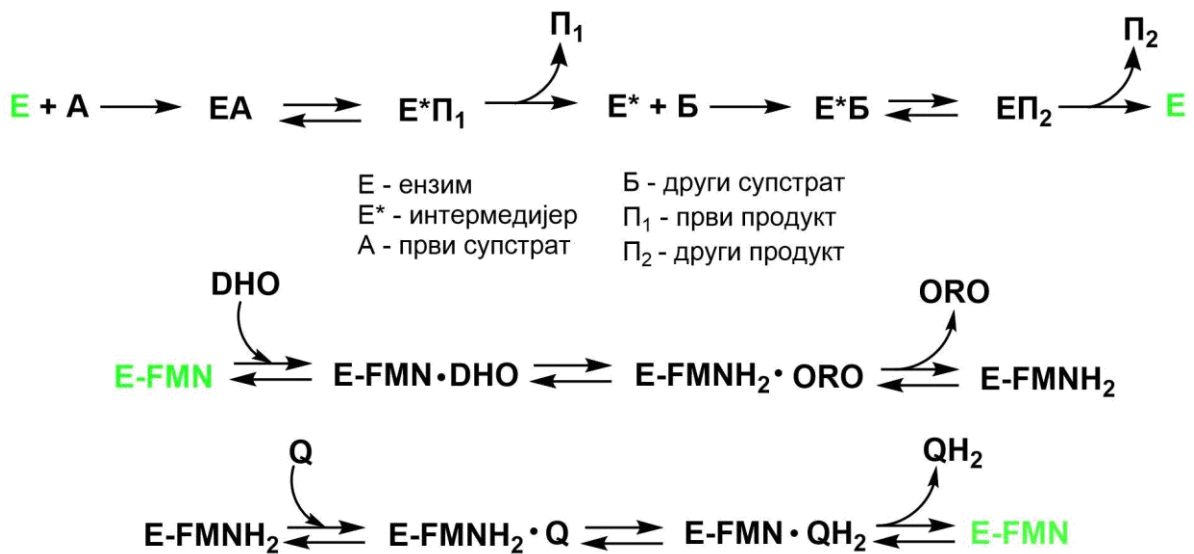


Схема 17. *Ping-pong* механизам.

У ћелијском циклусу, *hDHODH* заиста има изузетно велики значај. Имајући у виду да ћелијска пролиферација директно зависи од *de novo* синтезе нуклеотида, инхибиција овог ензима и заустављање ћелијског циклуса могу бити једна од стратегија за развој нових агенаса са потенцијалом антитуморског, антимикробног или имуносупресивног деловања.<sup>79</sup>

#### 1.4.4. Значај инхибиције *hDHODH* са медицинског аспекта

Најчешће је прекомерна транскрипциона активност гена за овај ензим, односно повећана количина овог ензима у ћелији, примећена у малигним ћелијама, укључујући ћелије карцинома панкреаса,<sup>88</sup> коже,<sup>89</sup> дојке,<sup>90</sup> плућа,<sup>91</sup> грлића материце,<sup>92</sup> дебелог црева (*енг.* colorectal cancer, CRC),<sup>93</sup> бубрега (*енг.* renal cell carcinoma, RCC),<sup>94</sup> врата,<sup>95</sup> неуробластома,<sup>96</sup> матичним ћелијама глиобластома (*енг.* glioblastoma stem cells, GSCs),<sup>97</sup> и ћелијама акутне мијелоцитне леукемије (*енг.* acute myelocytic leukemia, AML).<sup>98</sup> Осим у терапији малигнух обољења, инхибитори *hDHODH* су показали ефикасност у лечењу вирусних<sup>99</sup> и бактеријских<sup>100</sup> инфекција, паразитских болести<sup>101</sup> (маларија), као и имунолошких поремећаја<sup>102</sup> (реуматодни артритис и мултипла склероза).

#### 1.4.5. Инхибитори *hDHODH*

Један од најпознатијих инхибитора је већ поменути Na-Brequinar који представља дериват хинолин-4-карбоксилне киселине. Поред Na-Brequinar-а, велику пажњу привукли су Leflunomide и његов активни метаболит Teriflunomide (Схема 18).

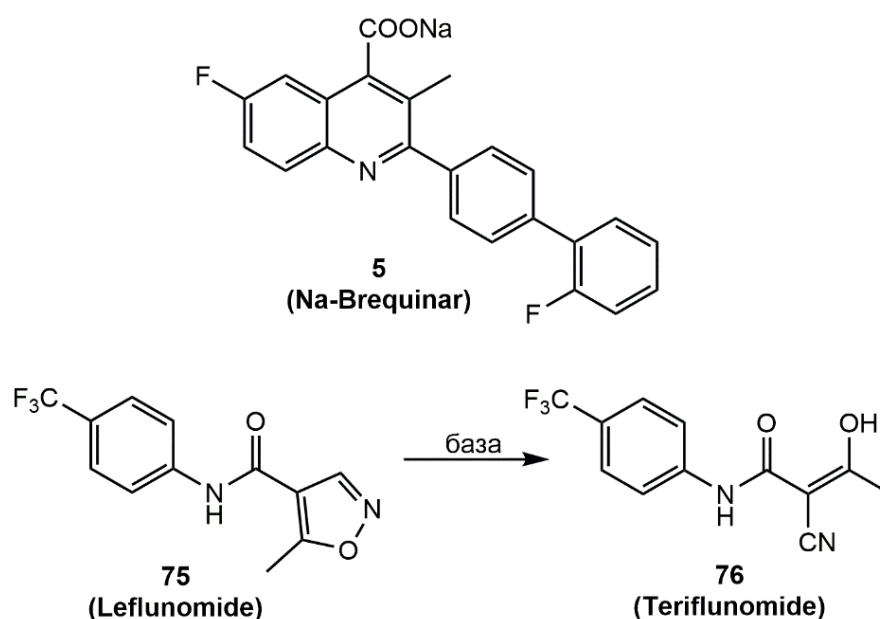


Схема 18. Инхибитори дихидрооротат дехидрогеназе.

Na-Brequinar је показао добро антитуморско дејство у претклиничким испитивањима како *in vitro* тако и *in vivo* условима, при чему је IC<sub>50</sub> вредност била у опсегу 5–10 nM.<sup>103-106</sup>

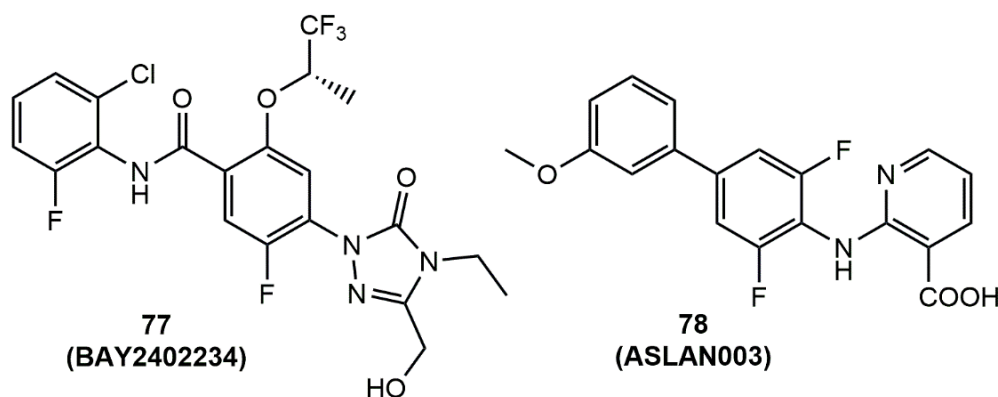
Упркос томе, Na-Brequinar није прошао другу фазу клиничких испитивања у случају карцинома дојке,<sup>107</sup> дебелог црева,<sup>108</sup> врата и главе,<sup>109</sup> гастроинтестиналног тракта,<sup>110</sup> плућа<sup>111</sup> и коже.<sup>112</sup> Наиме, ово једињење има слабу растворљивост у води (< 0,10 mg/mL на собној температури при pH = 7,4) што произилази из неполарности фенил група које улазе у састав молекула. Као последица његове слабе растворљивости, стварају се молекулски агрегати при чему се Brequinar и његови метаболити отежано излучују из организма.<sup>113</sup> Обзиром да Brequinar није ефикасан када

су солидни тумори у питању, даља истраживања су усмерена ка потенцијалној употреби овог инхибитора у лечењу акутне мијелоцитне леукемије (AML).<sup>114</sup> Ипак, Vemurafenib се данас најчешће користи у комбинацији са другим биолошки активним једињењима, као на пример Doxorubicin-ом, са којим остварује синергистички ефекат.<sup>115</sup>

Leflunomide је имуномодулатор који је одобрен од стране FDA и представља први hDHODH инхибитор који се користи у медицини за лечење реуматоидног и псоријатичног артритиса и као такав представља про-лек јер се након апсорпције његов хетероциклични систем брзо трансформише и настаје активни метаболит A771726 (Teriflunomide). Овај имуномодулатор одобрен је такође од стране FDA и користи се у лечењу мултипле склерозе.<sup>116</sup> Поред тога, он је и антивирални агенс који успешном инхибицијом ензима дихидроротат дехидрогеназе сузбија репликацију РНК вируса, међу којима и коронавируса SARS-CoV-2. Његова антивирална активност огледа се у блокирању *de novo* синтезе пиримидина што омета репликацију вируса у инфицираним ћелијама, а што даље лимитира производњу цитокина, посебно IL-6, за који се сматра да доприноси развоју синдрома респираторног дистреса код инфекције COVID-19.<sup>117</sup>

Ова два лека имају јако сличне фармаколошке и фармакокинетичке особине.<sup>118</sup> Ипак, њихова употреба је ограничена услед лоше селективности, односно токсичности према здравим ћелијама.<sup>119</sup> Употреба Teriflunomide-a у терапији узрокује скок вредности аланин аминотрансферазе (ензима посебно заступљеног у јетри), па се овај лек често повезује са хепатотоксичношћу.<sup>120</sup>

Инхибитори који су прошли прву или другу фазу клиничких испитивања представљени су на **Слици 24**. Приказана једињења су тестирана на ћелијама карцинома дојке, AML-а и још неким, при чему је BAY2402234 (Orludodstat) прошао прву фазу, док је ASLAN003 прошао и другу фазу клиничких испитивања (**Слика 24**).

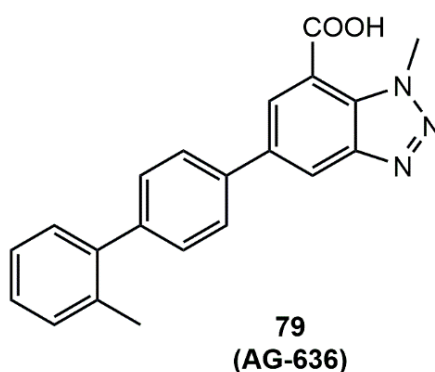


**Слика 24.** Инхибитори дихидрооротат дехидрогеназе који су прошли I или II фазу клиничких испитивања.

BAY2402234 успешно инхибира дихидрооротат дехидрогеназу ( $IC_{50} = 1,2 \text{ nM}$ ) и показује добру селективност. Такође, једна од важних фармаколошких карактеристика јесте и липофилност, изражена преко  $\log D$  вредности, која за овај инхибитор износи  $\log D = 2,7$  што улази у опсег идеалних вредности (0–3).<sup>121</sup> Утврђено је да инхибиција ензима директно утиче на ћелијску пролиферацију код ТНР-1 ћелија *in vitro*, при чему  $IC_{50}$  вредност износи 2,6 nM. Поред ове ћелијске линије, чак девет различитих леукемијских ћелијских линија је осетљиво на деловање овог инхибитора са  $IC_{50}$  вредностима у опсегу од  $8,1 \times 10^{-11} \text{ M}$  до  $8,2 \times 10^{-9} \text{ M}$ .<sup>121</sup>

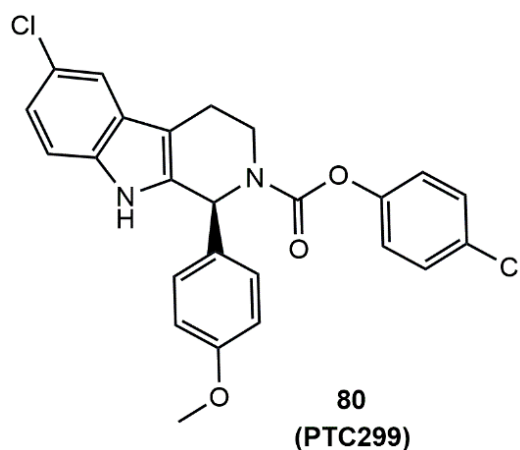
ASLAN003 је показао снажне инхибиторне активности у *in vitro* и *in vivo* експериментима на ћелијама акутне мијелоидне леукемије. Наиме, испитивања су показала да уколико се хумане леукемијске ћелије THP-1, MOLM-14 и KG-1 третирају овим леком долази до инхибиције њиховог раста при  $IC_{50}$  вредностима од 152 nM (THP-1), 582 nM (MOLM-14) и 382 nM (KG-1). Заправо, антилеукемијска активност овог једињења се огледа у инхибицији *hDHODH* при чему  $IC_{50}$  износи 35 nM.<sup>122</sup>

Један новији инхибитор који утиче на ћелијску пролиферацију и доводи до ћелијске апоптозе је AG-636 чија је  $IC_{50} = 17$  nM (Слика 25). Овај мали молекул инхибира *hDHODH* и испољава јаку антитуморску активност *in vitro* и *in vivo* према различитим врстама лимфома и акутне леукемије. Поменути инхибитор представља потенцијални лек за многа хематолошка обољења.<sup>123</sup>



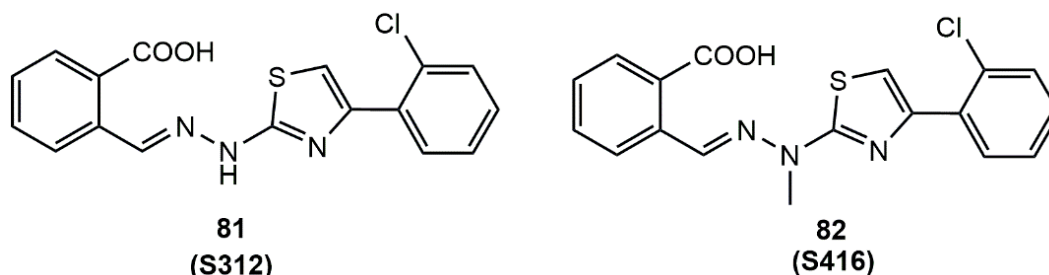
Слика 25. Инхибитор дихидрооротат дехидрогеназе AG-636.

PTC299 (Emvododstat), представља још један агенс који инхибицијом овог ензима испољава своје антилеукемијско дејство, али такође поседује и антивирално (Слика 26). Luban и сарадници су у својој студији објавили да овај инхибитор успешно спречава репликацију SARS-CoV-2 вируса, као и неких других РНК вируса.<sup>124</sup> Такође, овај агенс утиче и на смањење продукције цитокина који су одговорни за инфламацију која се јавља услед инфекције SARS-CoV-2 вирусом. Дobar фармакокинетички профил је такође приписан овом агенсу, након испитивања у ком су учествовали здрави волонтери, али и онколошки пацијенти. Охрабрујући резултати након ове студије представљају подстрек за даља истраживања где PTC299 представља потенцијални лек који се може безбедно користити у терапији COVID-19 инфекције.<sup>124</sup>



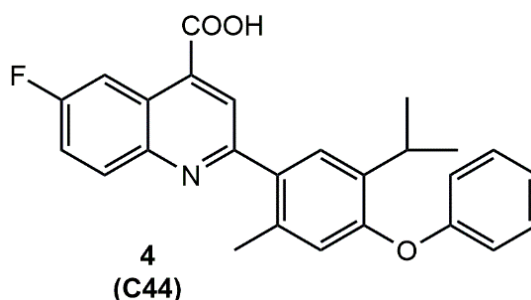
Слика 26. Инхибитор дихидрооротат дехидрогеназе PTC299.

Xiong и сарадници су представили два инхибитора *h*DHODH који такође испољавају антивиралну активност.<sup>125</sup> Једињења **S312** и **S416** (Слика 27), показују широк спектар антивирусних ефеката против различитих РНК вируса попут вируса грипа А (H1N1, H3N2, H9N2), Ebola вируса, Zika вируса и коронавируса SARS-CoV-2.



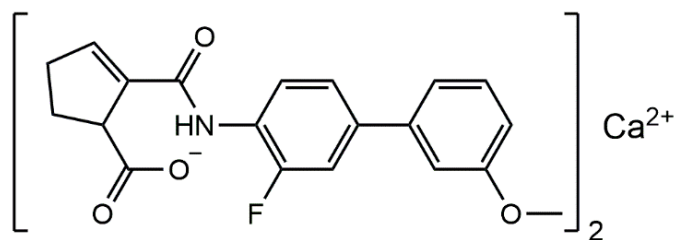
**Слика 27.** Инхибитори дихидрооротат дехидрогеназе са снажним антивирусним ефектима.

Инхибитор дихидрооротат дехидрогеназе који испољава антивирусно дејство према VSV (енг. Vesicular stomatitis viruses) и WSN (енг. Waisman syndrome) вирусима је **C44** приказан на **Слици 28**. Ово једињење у својој структури садржи диарил-етарски фрагмент који повећава хидрофобност молекула и доприноси остваривању интеракција са хидрофобним џепом ензима у коме је смештено активно место и тако га инхибира при  $IC_{50} = 1 \text{ nM}$ .<sup>126</sup>



**Слика 28.** Инхибитор DHODH са снажним антивиралним дејством.

Антивирални агенс који показује добру активност у *in vitro* и *in vivo* експериментима је и IMU-838 (Vidofludimus), који је показао добру активност и код аутоимуних болести (Слика 29). Инхибиторна моћ овог једињења изражена преко  $IC_{50}$  вредности износи 134 nM.<sup>118</sup> Овај агенс који се може дати *per os* се тренутно налази у другој фази клиничких испитивања за лечење мултипле склерозе, улцерозног колитиса и примарног склерозирајућег холангитиса.<sup>127</sup> Такође, ово једињење има велики антивирусни потенцијал према SARS-CoV-2 вирусу као и према патогеним вирусима код човека, попут цитомегаловируса (енг. human cytomegalovirus, HCMV), ХИВ вируса тип 1 (енг. human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) и хепатитис С вируса (енг. hepatitis C virus, HCV).<sup>127</sup>



83  
(IMU-838)

Слика 29. Антивирални агенс IMU-838.

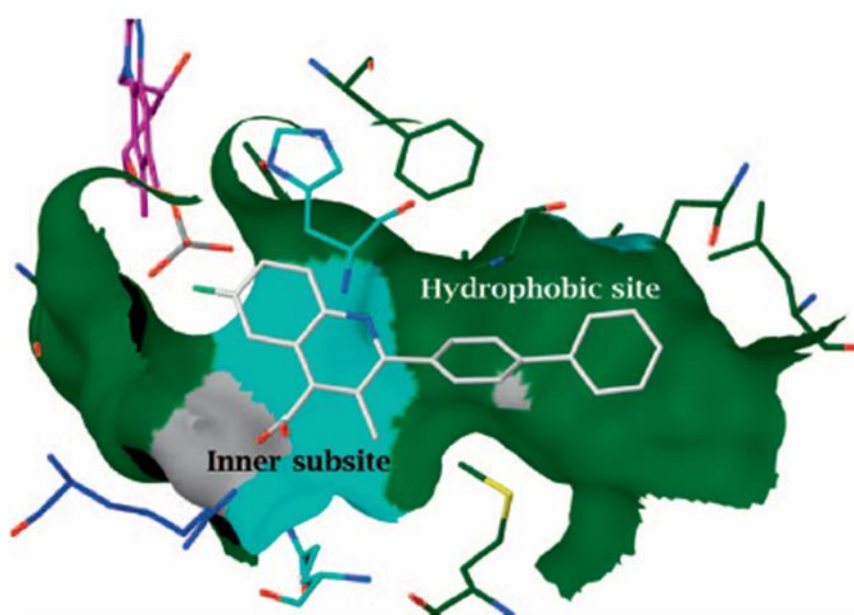
Поред наведених једињења, постоји још много потенцијалних агенаса који инхибицијом дихидрооротат дехидрогеназе испољавају свој терапеутски потенцијал.

Главни циљ истраживачких група које се баве синтезом биолошки активних једињења је да новосинтетизовани молекули поседују неке од карактеристика добрих инхибитора. Поред тога, од великог значаја је и да такви агенси постигну добру селективност, као и да њихови токсични ефекти буду сведени на минимум.

#### 1.4.6. Структурне карактеристике потенцијалних инхибитора

Како би неко једињење показало добру инхибиторну активност, неопходно је да оствари одређене интеракције са аминокиселинским остацима у хидрофобном џепу ензима. На основу до сада синтетизованих једињења, проучавањем њихових структура и начина везивања за ензим, научници осмишљавају структуре потенцијалних инхибитора које поседују неке од најважнијих фрагмената добрих инхибитора. Тако, на основу кристалографске структуре ензима у комплексу са Brequinar-ом (Слика 30), изведени су закључци о структуралним елементима које би потенцијални будући аналози Brequinar-а требало да поседују да би инхибирали *hDHODH*:

- бифенилни фрагмент;
- хинолински фрагмент који се некад замењује и нафталенским системом;
- карбоксилну групу на хинолину или осталим ароматичним прстеновима.<sup>128</sup>



Слика 30. Кристалографска структура везивања Brequinar-а.<sup>129</sup>

Хидрофобни остаци и површине су обојене зеленом бојом, док су молекули воде обојени сивом бојом. Редокс место које је богато поларним остацима и површинама представљено је плавом бојом, док је редокс кофактор флавин мононуклетид означен љубичастом бојом.

Ово место везивања је представљено као погодно услед присуства хидрофобне средине која је формирана од бочних ланаца аминокиселина које окружују канал.<sup>130</sup> Имајући то у виду, овај део ензима омогућава хидрофобне интеракције са неполарним групама као што су бифенилна у Brequinar-овој структури или *p*-(трифлуорометил)фенилна присутна код Teriflunomid-а. Уколико се посматра Brequinar-ова структура и његов начин везивања, могу се уочити два структурна сегмента заслужна за формирање интеракција: хидрофобни и поларни. Заправо, бифенилни прстен доприноси инхибицији остваривањем хидрофобних интеракција са аминокиселинским остацима Leu42, Met43, Leu46, Ala55, Phe58, Leu62, Leu68, Phe98 и Leu359. Са друге стране, поларни део молекула представља 6-флуоро-3-метил-4-хинолин карбоксилна киселина чија је оријентација према ланцу Arg136 веома повољна, а карбоксилна група учествује у стварању водоничне везе са Gln47. Ова

структура одлично одговара месту везивања, јер је распоред аминокиселинских остатака јасно подељен, тако да сам почетак тунела формирају искључиво хидрофобни аминокиселински остаци, док уски крај тунела карактерише прилично поларна средина затворена малим хидрофобним џепом формираним од бочних ланаца Val134 и Val143.<sup>80</sup> Самим тим, није изненађујућа инхибиторна моћ овог једињења чија IC<sub>50</sub> вредност досеже веома ниске концентрације (5–10 nM).<sup>103</sup>

Поред структурних предуслова које треба да садрже добри инхибитори, пожељно је да испуне и одређене фармаколошке особине. Уколико поседују задовољавајући фармаколошки профил, оваква једињења се даље могу разматрати и као потенцијални терапеутски агенси.

### 1.5. ADMET особине

Апсорпција, дистрибуција, метаболизам, екскреција и токсичност (ADMET) супстанци представљају веома важне параметре у фармацеутској индустрији током дизајна и развоја потенцијалних лекова.<sup>131</sup> Уско повезане са ADMET особинама, липофилност и растворљивост представљају два важна фактора у еволуционом путу терапеутских агенаса.

Једна од веома значајних фармакокинетичких особина лекова заснива се на апсорпцији лека кроз фосфолипидни двослој ћелијске мембране путем пасивне дифузије. Како би дифузија била лакша, лекови треба да поседују липофилне карактеристике и самим тим успешно продру кроз ћелијску мембрану. Међутим, претерана липофилност може имати негативан утицај јер би се у том случају лекови задржали у мембрани.

Постоје два коефицијента којима се може одредити липофилност: партициони коефицијент (logP) и дистрибуциони коефицијент (logD). Заправо, липофилност се може мерити расподелом једињења између неполарне органске фазе (*n*-октанол) и водене фазе (фосфатни пуфер, рН = 7,4). Када је јонизовано једињење расподељено у овом двофазном систему, његова концентрација је директно повезана са коефицијентом дистрибутивности D који заправо представља партициони коефицијент једињења како у неутралној тако и јонизованој форми на некој рН вредности. Овај коефицијент је одговарајући у случају једињења која имају јонизујуће групе јер представља расподелу и јонизованих и нејонизованих форми. LogD на рН = 7,4 има најважнији значај услед своје физиолошке релевантности са реалним биолошким условима. У Табели 1 дате су особине једињења дефинисане на основу logD<sub>7,4</sub> вредности.<sup>132</sup>

Табела 1. Фармакокинетичке особине једињења на основу logD<sub>7,4</sub> вредности.

logD <sub>7,4</sub>	Особине једињења
> 3	Јако липофилна једињења; слаба растворљивост у води; добра растворљивост у липидима и неполарним растварачима; отежана екскреција из организма; токсична својства.
0–3	Идеална равнотежа између пропустљивости и растворљивости једињења у фосфолипидном двослоју ћелијске мембране.
< 0	Хидрофилна једињења; велика растворљивост у води; лака екскреција из организма; слаба пропустљивост кроз фосфолипидни двослој ћелијске мембране.



Како би се одредила ова вредност, постоји доста метода од којих је најпознатија *shake flask*<sup>133</sup> о којој ће бити више речи у *Експерименталном делу (3.8. Одређивање липофилности)*.

Са друге стране, растворљивост има три веома важне улоге током проучавања потенцијалних лекова јер од ње зависе, иницијално, биолошки експерименти, доза и формулација лека као и начин апликације.<sup>134</sup> Услед слабе растворљивости једињења, долази до слабе апсорпције и биодоступности, док у фази испитивања и развоја лека долази до отежаног извођења *in vitro* и *in vivo* експеримената.<sup>135</sup> Ова особина је дефинисана максималном концентрацијом растворене супстанце под специфичним физичким и хемијским условима.<sup>136</sup> Концентрација једињења у раствору зависи од физичко-хемијских особина тестираног једињења као и од компоненти раствора и његових физичких особина. Уколико говоримо о особинама раствора које утичу на растворљивост потенцијалног лека то могу бити: рН вредност, примарни растварач (нпр. вода), ко-растварачи (нпр. DMSO), адитиви (нпр. сурфактанти, албумин...), јонске силе, време инкубације и температура. Из овог разлога је веома важно навести конкретне услове под којима је извршена студија одређеног лека.

Постоје две врсте растворљивости које су могу мерити код једињења: кинетичка и термодинамичка.<sup>137</sup> Кинетичка растворљивост представља највећу концентрацију тестираног лека која се може растворити до прве појаве талога. Врста талога која се може јавити у овом случају није дефинисана и може се јавити у аморфном стању, кристалном, кокристалном или у облику соли, али и као комбинација ових наведених могућности. Имајући у виду да се једињење и након прве појаве талога може растварати, кинетичка растворљивост је строго зависна од времена, па вредности које се добију су углавном веће од одговарајућих вредности за равнотежну растворљивост.<sup>138</sup> Са друге стране, термодинамичка, односно равнотежна растворљивост, представља максималну количину лека који се раствара у одређеној запремини растварача при познатим условима притиска и температуре. За ову врсту растворљивости је карактеристично да се процеси растварања и таложена одвијају константном брзином. Термодинамичка растворљивост се често сматра „правом“ растворљивошћу једињења.

Постоји доста метода за одређивање растворљивости, а једна од њих је *shake flask*.<sup>136-137,139</sup> Ова метода подразумева додавање супстанце у вишку у запремини растварача која не мора бити тачно одмерена, а затим се узорак раствара мешањем на собној температури 24h. Након тога се концентрација растворене супстанце одређује из филтрата помоћу погодне инструменталне методе, а то је најчешће HPLC. Ова метода се користи јер може да детектује јако мале концентрације супстанце, као и примесе, уколико су присутне. Термодинамичка растворљивост је постигнута када концентрација супстанце остаје непромењена након што је вршено више мерења између којих се изнова додају нове количине чврсте супстанце.

Свакако, треба нагласити да су липофилност и растворљивост важни фактори, али ипак представљају само два од многих који утичу на биолошки потенцијал једињења. Имајући све чињенице у виду, један од проблема током дизајна лека је успоставити баланс између добре биолошке активности једињења и његових фармаколошких особина.



## ***2. НАШИ РАДОВИ***

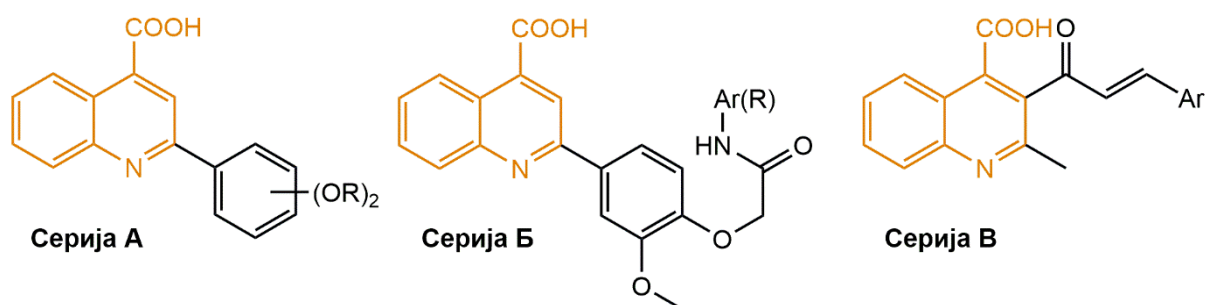


## 2.1. Увод

Захваљујући широком спектру биолошких активности хинолинских деривата, ова класа једињења добија све већи значај.<sup>140</sup> Њихов фармаколошки потенцијал је посебно значајан у медицинској хемији, с обзиром да велики број терапеутских агенаса у својој структури садржи хинолински систем.

Један од циљева научно-истраживачких група јесте синтеза биолошки активних једињења која би се потенцијално применила у медицинске сврхе. Такви агенси доприносе стварању нових идеја и развоју медицинске хемије. Такође, једињења са потенцијалном ензимском инхибиторном активношћу могу се даље проучавати као потенцијални лекови. На основу досадашњег научног достигнућа постављени су нови циљеви у органској синтези који доводе до једињења са бољим фармаколошким особинама од већ постојећих. Тако на пример, комбинацијом хинолина са другим биоактивним фармакофорама настају нови деривати, који би, као резултат њихових синергистичких ефеката, показивали бољу биолошку активност. Имајући у виду значај хинолина и његову распрострањеност у природи, циљ је да се функционизацијом хинолинског прстена добију деривати са бољим фармаколошким профилем. Биолошки потенцијал хинолин-4-карбоксилних киселина заузима посебно место у медицинској хемији.<sup>141</sup>

Самим тим, у оквиру ове дисертације синтетизоване су три нове серије хинолин-4-карбоксилних киселина (**Слика 31**) и испитана њихова биолошка активност. Као што је приказано на слици, серије **А** и **Б** представљају деривате 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине, док серију **В** чине деривати 2,3-дисупституисане хинолин-4-карбоксилне киселине.



**Слика 31.** Серије нових деривата хинолин-4-карбоксилне киселине.

Сви синтетизовани деривати структурно су окарактерисани применом NMR и IR спектроскопских метода. Такође, за све деривате је урађена и елементарна анализа. Додатно, хинолин-халконски хибриди који припадају **В** серији су окарактерисани помоћу масене спектрометрије високе резолуције (*енг.* High-resolution mass spectrometry, HRMS), а њихова чистоћа додатно потврђена хроматографијом високих перформанси (*енг.* High-performance liquid chromatography, HPLC). Као репрезентативни примери дати су <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR спектри одабраних једињења из сваке серије, док су за једињење које припада серији **В** додатно приложени масени спектар и HPLC хроматограм (**100ђ-е**, **104и** и **107г**, видети *Прилог*).

Биолошки потенцијал свих добијених деривата огледа се у инхибицији ензима дихидрооротат дехидрогеназе. Самим тим, одређена је инхибиторна активност свих новосинтетизованих деривата хинолин-4-карбоксилне киселине и добијени резултати су упоређени са референтним једињењима Вреқинаг-ом и/или Leflunomide-ом.

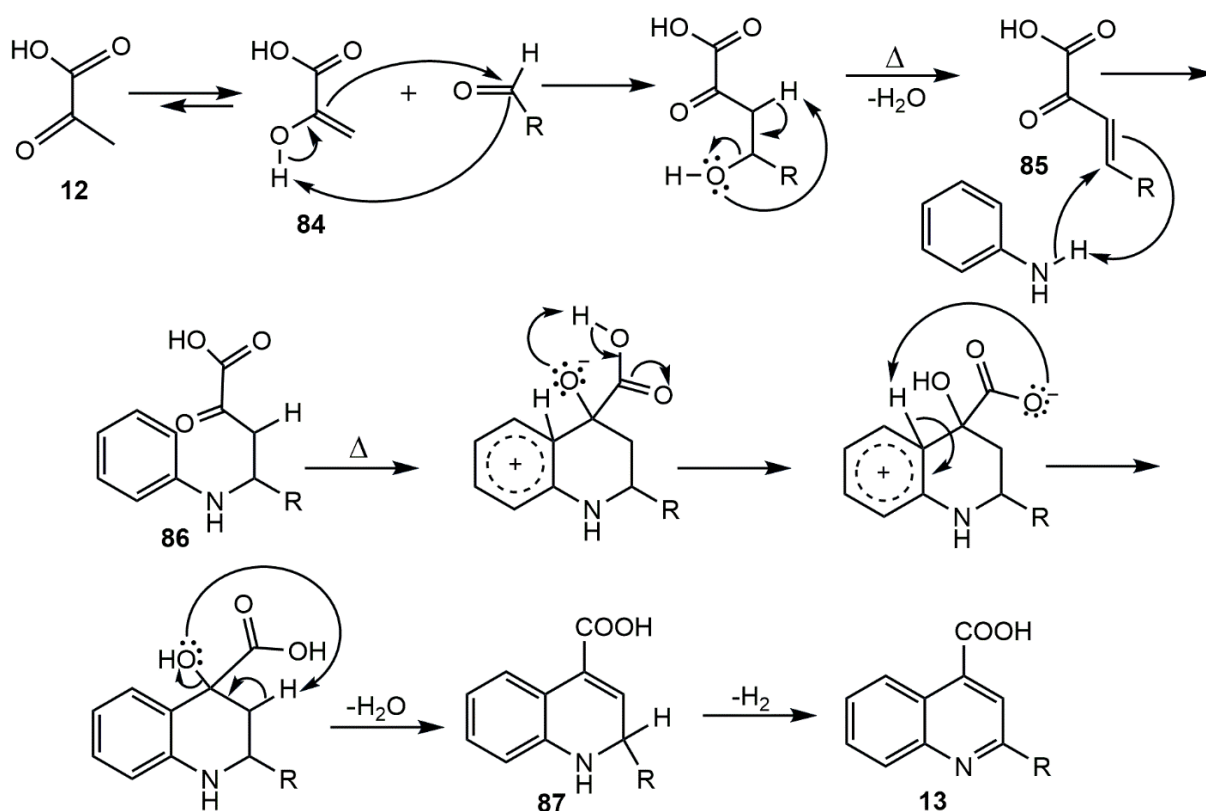
Цитотоксична активност добијених једињења серија **A** и **B** је испитана *in vitro* на ћелијским линијама карцинома дојке (MCF-7), плућа (A549) и меланома (A375), док је у случају серије **B** антитуморско дејство испитано на MCF-7 и ћелијама акутне моноцитне леукемије (THP-1). У циљу одређивања селективности и терапеутског потенцијала ових једињења испитана је и њихова токсичност на здравој ћелијској линији кератиноцита коже (HaCaT).

Такође, као додатна студија, у ову дисертацију је укључена и липофилност која представља фармакокинетичке и метаболичке особине лека изражене преко  $\log D_{7,4}$ , при чему је за сва једињења ова вредност одређена експерименталном *shake flask* методом. Поред тога, за деривате серије **B** одређена је и растворљивост као додатни фармакокинетички и фармакодинамички параметар, која је, као и липофилност, уско повезана са ADMET карактеристикама.

У оквиру овог рада, финални деривати 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине серије **A** и **B** добијени су помоћу Doebner-ове реакције, док је прекурсор у трећој серији добијен Pfitzinger-овом реакцијом циклизације. Самим тим, о карактеристикама и механизмима ових двеју метода биће више речи у овом поглављу. Финални хинолин-халкон хибриди серије **B** добијени су Claisen-Schmidt-овом реакцијом кондензације.

## 2.1.1. Доебнер-ова реакција: карактеристике и механизам

Као што је напоменуто у *Општем делу* (1.2.2. Доебнер-ова метода синтезе хинолина), ова трокомпонентна реакција анилина, бензалдехида и пирогрожђане киселине доводи до формирања 2-супституисаних хинолин-4-карбоксилних киселина. Постоје два могућа механизма по којима се одвија ова реакција. На **Схеми 19** приказан је један од механизма, где најпре долази до енолизације пирогрожђане киселине, чија енолна форма (**84**) реагује са алдехидом формирајући  $\beta,\gamma$ -незасићену- $\alpha$ -кетокиселину (**85**). Добијена киселина у реакцији Michael-ове адисије са анилином гради анилински дериват (**86**). Након циклизације деривата са бензеновим прстеном, премештањем и дехидратацијом добија се дихидро-форма производа (**87**), која подлеже спонтаној оксидацији до финалног једињења (**13**).



**Схема 19.** Механизам Доебнер-ове реакције преко енолизације пирогрожђане киселине.

Поред овог, постоји и алтернативни механизам<sup>17</sup> где најпре настаје Schiff-ова база (**88**) у реакцији анилина и алдехида која затим реагује са енолном формом пирогрожђане киселине (**84**) градећи анилински адукт који аналогно претходно приказаном механизму даје финални производ (**Схема 20**). Који је од ових механизма вероватнији још увек није утврђено, јер механизам варира од реакције до реакције. Не постоје ни експериментални, а ни квантно-механички резултати који би дефинитивно показали који је механизам фаворизован, нити које промене у условима реакције одређују механизам.

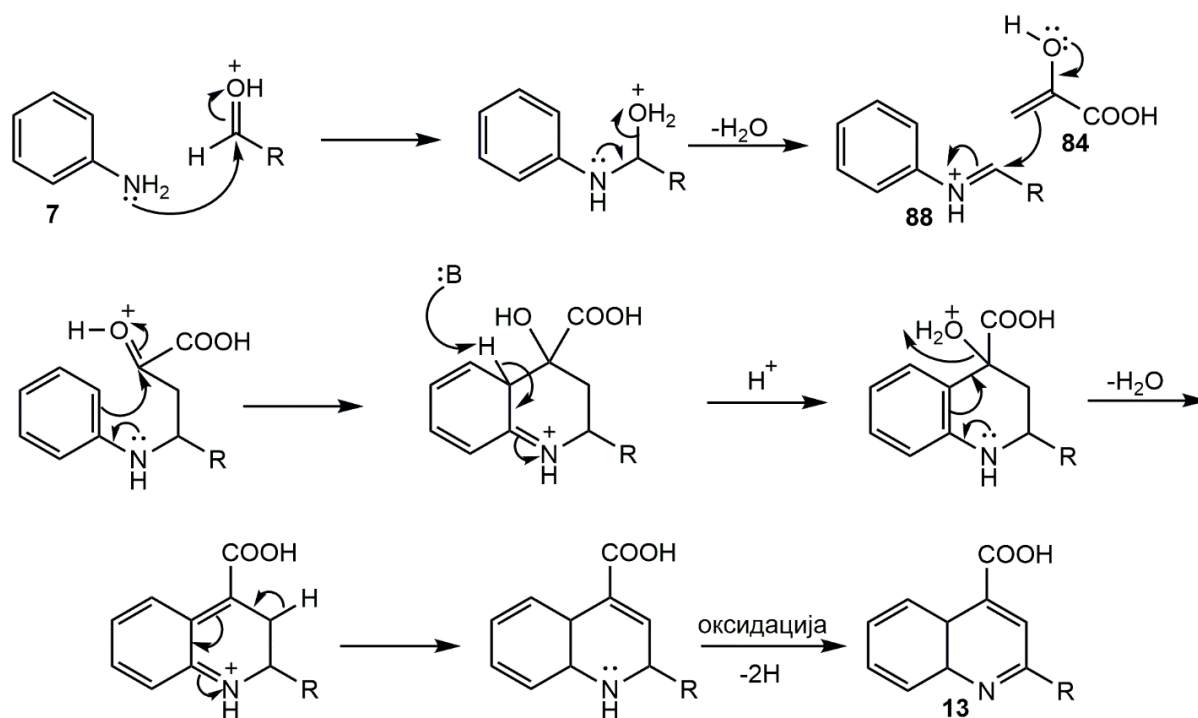


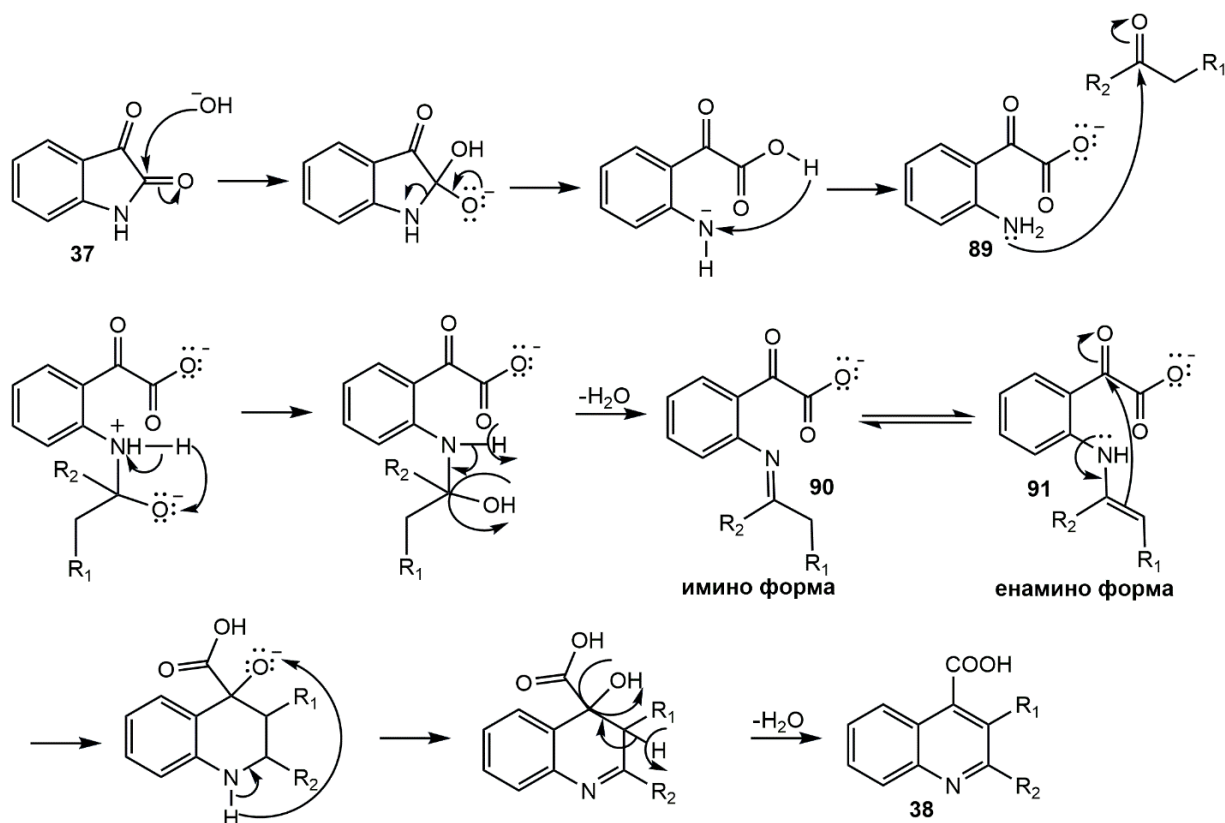
Схема 20. Алтернативни механизам Doebner-ове реакције преко формирања Schiff-ове базе.

### 2.1.2. Pfitzinger-ова реакција циклизације: карактеристике и механизам

Pfitzinger-ова реакција, као што је раније поменуто, доводи до формирања 2,3-дисупституисаних хинолин-4-карбоксилних киселина. У овој реакцији, полазни супстрат је изатин који реагује са карбонилним једињењима, при чему, у зависности од реакционих услова, могу настати 3-хидроксииндоли<sup>32</sup> што је раније објашњено у *Општем делу* (1.2.8. Pfitzinger-ова метода синтезе хинолина) или хинолин-4-карбоксилне киселине. У случају настајања хинолинских карбоксилата у литератури су описана два могућа реакциона механизма: први се заснива на формирању Schiff-ове базе између amino групе изатинске киселине и keto групе карбонилног једињења (Схема 21), док се други механизам одвија по принципу Claisen-ове кондензације, при чему keto група изатината реагује са активном метиленском групом 1,3-дикарбонилног једињења и води настајању финалних хинолин-4-карбоксилних киселина (Схема 22).<sup>142</sup> Према првом механизму овог типа реакције (Схема 21) најпре долази до напада нуклеофила на карбонилни угљеник изатина при чему се отвара прстен и настаје изатинат (89) који даље реагује са кетоном. Ова конверзија изатина у изатинат је од изузетне важности јер изатин у форми отвореног прстена може ступити у даљу реакцију.

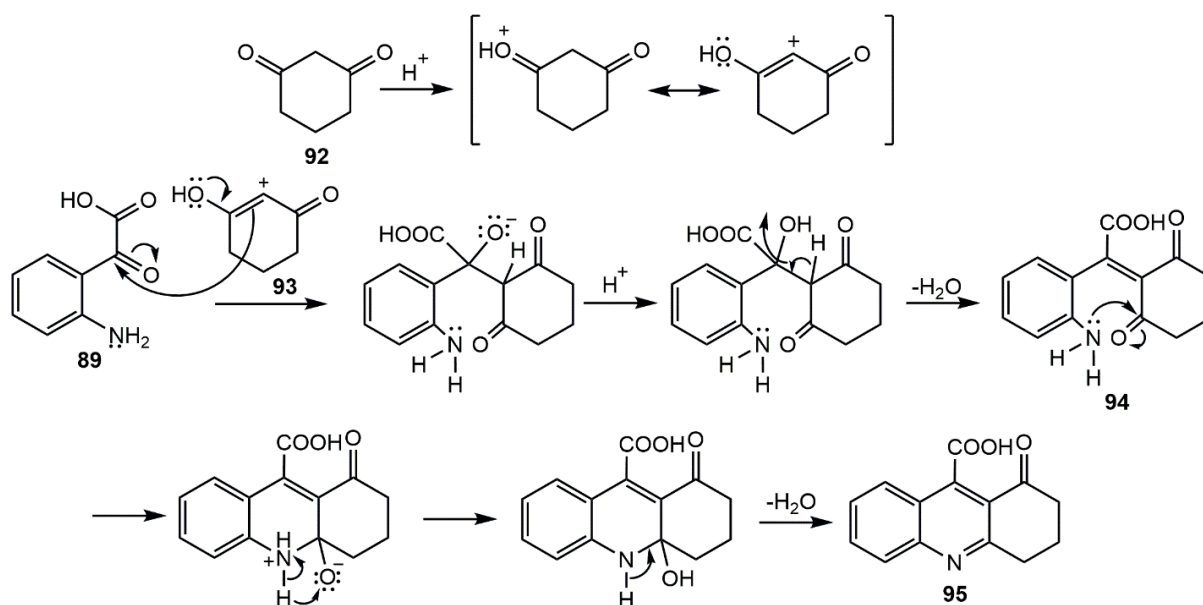
Casey и сарадници су у својој студији детаљно образложили утицај pH вредности раствора на присуство ових форми.<sup>143</sup> Уколико је pH раствора изнад 6, доминантан облик је изатинат, при pH = 4 присутне су обе форме, док при pH испод 3, стабилнији облик је изатин. Након адиције карбонилног једињења и дехидратације, долази до формирања иминског адукта (90) који подлеже таутомеризацији до енамина (91). Даљом циклизацијом, премештањем и дехидратацијом настају финални производи, деривати хинолин-4-карбоксилне киселине (38).





**Схема 21.** Претпостављени механизам Pfitzinger-ове реакције преко формирања Schiff-ове базе.

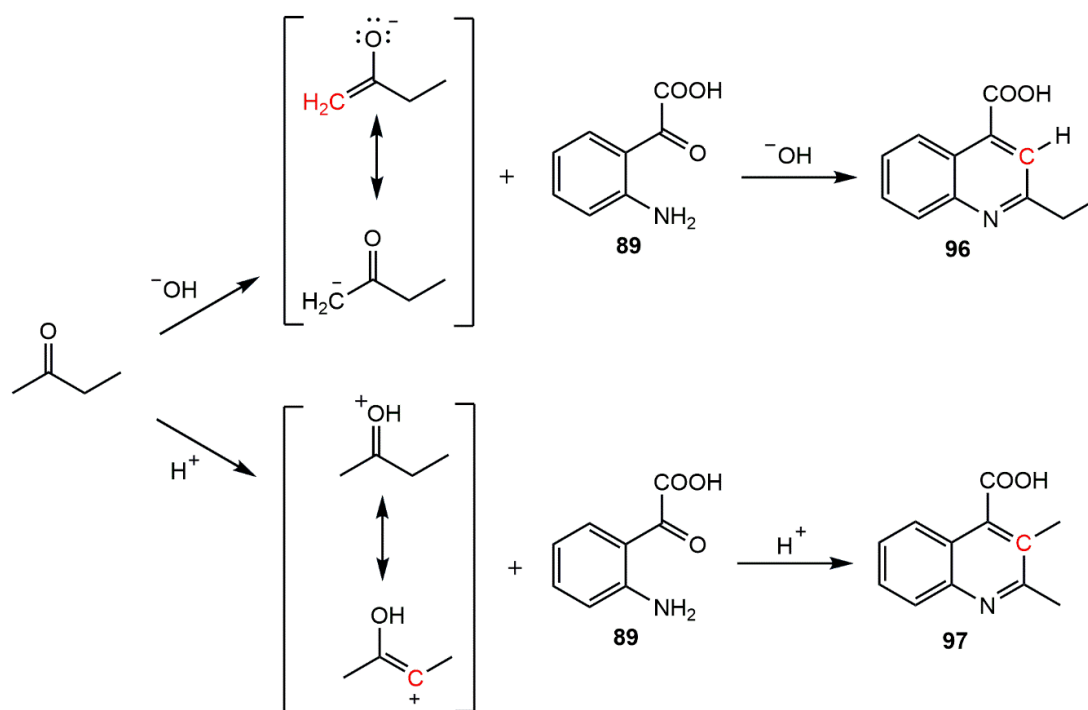
Механизам који се одвија по принципу Claisen-ове кондензације приказан је на примеру изатина и 1,3-циклохексадиона (**11**, **Схема 22**) у киселој средини. Заправо, енолна форма циклохексадиона (**93**) напада карбонилни угљеник keto киселине (**89**), при чему након закисељавања и дехидратације настали адукт (**94**) подлеже интрамолекулском нападу амино групе на карбонилни угљеник. Даљом циклизацијом, премештањем и дехидратацијом добија се финални производ (**95**).



**Схема 22.** Претпостављени механизам Pfitzinger-ове реакције преко енолизације дикарбонилног једињења.

Као и у случају Доебнер-ове реакције, није познато који је од ова два механизма вероватнији.

У оригиналној процедури Pfitzinger-ове реакције, кондензација изатина и одговарајућег кетона се одвија у базној средини, а након закисељавања настају финални хинолини.<sup>144</sup> Међутим, даље модификације ове реакције подразумевале су киселе реакционе услове.<sup>142</sup> На **Схеми 23** приказане су хинолин-4-карбоксилне киселине као производи реакције између изатина и карбонилног једињења, како при базним, тако и при киселим условима.



**Схема 23.** Pfitzinger-ова реакција при базним и при киселим условима.

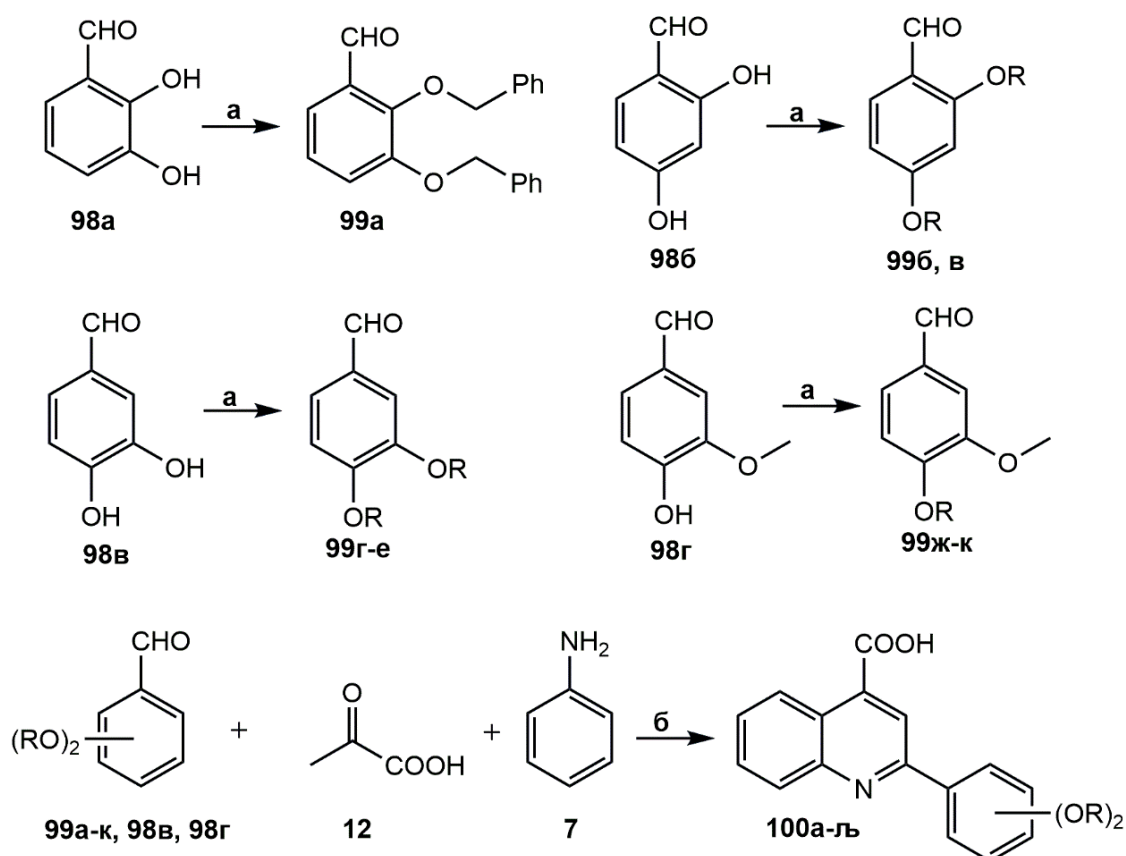
Као што је приказано на **Схеми 23**, различито супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине настају у зависности од реакционих услова, уколико полазни супстрат није симетричан кетон. У Pfitzinger-овој реакцији могу учествовати алифатични, алициклични, ароматични и хетероциклични кетони.<sup>145</sup> Прекурсори из серије **B** добијени су применом ове реакције која је послужила за увођење ацетил групе на хинолински прстен што је омогућило даљу дериватизацију о чему ће бити више речи касније.

## 2.2. Серија А

У оквиру серије А синтетизовано је 14 нових деривата 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине. На основу досадашњих литературних података, претпостављено је да ће, као резултат синергистичких ефеката, комбинација хинолинског прстена и етарског фрагмента допринети доброј ензимској инхибицији и бољем фармаколошком профилу једињења. Аналогно инхибитору **C44** (Слика 28) у чијој је структури присутан диарил-етарски систем ( $IC_{50} = 1 \text{ nM}$  према *hDHODH*), наше финалне хинолин-4-карбоксилне киселине садрже алкил/арил етарске фрагменте који доприносе хидрофобности молекула, неопходној за остваривање интеракција са ензимом. Самим тим, први корак у синтези се састајао у алкиловању протокатехуинског алдехида и ванилина, који су даље реаговали са анилином и пирогрожђаном киселином у трокомпонентној Доебнер-овој реакцији при чему су настале 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине као крајњи производи. Обзиром на то да су сва синтетизована једињења препозната као потенцијални инхибитори *hDHODH*, испитана је њихова инхибиторна активност према ензиму, док су докинг студије показале најважније интеракције тестираних једињења са протеином. Додатно, одређен је и цитотоксични потенцијал изражен преко  $IC_{50}$  вредности *in vitro*. Такође, у оквиру овог истраживања, студија липофилности је окарактерисала фармакокинетички профил свих деривата.

### 2.2.1. Синтеза једињења серије А

Синтеза деривата 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине у оквиру ове серије је изведена у два корака. Као што је приказано на **Схеми 24**, први корак се састајао у алкиловању комерцијално доступног протокатехуинског алдехида и ванилина, при чему су коришћени различити алкил халогениди. Ова реакција је изведена према претходно описаној процедури.<sup>146</sup> Као растварач је коришћен *N,N*-диметилформаид (DMF), а ослобођена хлороводонична киселина је неутралисана додатком калијум карбоната ( $K_2CO_3$ ). У следећем кораку, припремљени алкиловани алдехиди су у трокомпонентној Доебнер-овој реакцији реаговали са анилином и пирогрожђаном киселином при чему су деривати 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине добијени у приносима од 24% до 51%. Како би се упоредио утицај супституената на биолошки потенцијал финалних деривата, поред алкилованих прекурсора у реакцији су учествовали и неалкиловани 3,4-дихидроксибензалдехид и ванилин. С обзиром на то да је финална реакција изведена у апсолутном етанолу, углавном је већина синтетизованих аналога након рефлукса лако кристалисала из етанолског раствора, док је у неким случајевима таложје било иницирано трећем зидова балона стакленим штапићем. Сви сирови деривати су добијени са задовољавајућом чистоћом, међутим како би се постигла веома висока чистоћа, подвргнути су прекристализацији. Неки од деривата су растворени у хлороформу и поново таложени хексаном, док су други прекристалисани из етанола. 2-Супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине у оквиру серије А су синтетизоване први пут и њихове структуре су потврђене спектралним подацима (IR,  $^1H$  и  $^{13}C$  NMR) и елементарном анализом.



(OR)<sub>2</sub> : 99б, 100б: 2-OCH<sub>2</sub>Ph и 4-OCH<sub>2</sub>Ph  
 99в, 100в: 2-OCH<sub>3</sub> и 4-OCH<sub>3</sub>  
 99г, 100г: 3-OCH<sub>2</sub>Ph и 4-OCH<sub>2</sub>Ph  
 99д, 100д: 3-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> и 4-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 99е, 100е: 3-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> и 4-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>  
 99ж, 100ж: 3-OCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и 4-OCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
 99з, 100з: 3-OCH<sub>3</sub> и 4-OCH<sub>3</sub>  
 99и, 100и: 3-OCH<sub>3</sub> и 4-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 99ј, 100ј: 3-OCH<sub>3</sub> и 4-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>  
 99к, 100к: 3-OCH<sub>3</sub> и 4-OCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
 98в, 100л: 3-OH и 4-OH  
 98г, 100љ: 3-OCH<sub>3</sub> и 4-OH

**Схема 24.** Синтеза деривата 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине серије А. Реагенси и услови: а) алкил халогенид (MeI, <sup>n</sup>PrBr, <sup>n</sup>BuBr, <sup>t</sup>BuBr или BnCl), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 5 h, рефлукс, HCl; б) EtOH, 3 h, рефлукс.

### 2.2.2. Инхибиција hDHODH једињењима серије А

Инхибиторна активност свих деривата серије А одређена је помоћу hDHODH биохемијског експеримента који представља индиректну колориметријску методу засновану на оксидацији L-дихидрооротичне киселине (L-DHO) која је праћена редукцијом децилубихинона (DUQ), што је стехиометријски еквивалентно редукцији 2,6-дихлороиндофенола (DCIP) и резултује смањењем апсорбанце мереној на 610 nm.<sup>147</sup> Резултати инхибиције ензима су изражени као IC<sub>50</sub> вредности, односно концентрације једињења које су неопходне за 50 % инхибиције *in vitro* (Табела 2).

На основу приложених резултата, може се закључити да је већина тестираних једињења показала нижу  $IC_{50}$  вредност од референтног једињења Leflunomide-a. Хинолински деривати из серије протокатехуинског алдехида (**100г-е**) показали су бољу активност од деривата који су добијени полазећи од алкилованог ванилина (**100ж-к**).

**Табела 2.**  $IC_{50}$  вредности ензимске инхибиције добијене након третмана са хинолин-4-карбоксилним киселинама **100а-љ**.

Једињење	$IC_{50} \pm SD$ ( $\mu M$ )	Једињење	$IC_{50} \pm SD$ ( $\mu M$ )
<b>100а</b>	0,27 $\pm$ 0,02	<b>100з</b>	1,39 $\pm$ 0,73
<b>100б</b>	0,34 $\pm$ 0,03	<b>100и</b>	0,45 $\pm$ 0,04
<b>100в</b>	2,55 $\pm$ 0,19	<b>100ј</b>	0,34 $\pm$ 0,03
<b>100г</b>	0,27 $\pm$ 0,02	<b>100к</b>	0,44 $\pm$ 0,03
<b>100д</b>	0,38 $\pm$ 0,03	<b>100л</b>	1,07 $\pm$ 0,10
<b>100ђ</b>	0,15 $\pm$ 0,01	<b>100љ</b>	0,94 $\pm$ 0,05
<b>100е</b>	0,15 $\pm$ 0,01	<b>Leflunomide</b>	0,90 $\pm$ 0,07
<b>100ж</b>	0,47 $\pm$ 0,04	<b>Brequinar</b>	0,01 $\pm$ 0,00

Ипак,  $IC_{50}$  вредности показују да тестирана једињења не инхибирају ензим јачином којом то чини Brequinar чија је  $IC_{50} = 5-10$  nM.<sup>103</sup> Претпоставља се да је слабија активност новосинтетизованих деривата последица флексибилности алкокси група, које су подложне ротацији, што није случај са терминалним 2-флуорофенилом који се налази у Brequinar-овој структури. Штавише, конформационе промене су код крутог Brequinar-овог система сведене на минимум, што доводи до лакшег продирања таквог молекула кроз ћелијску мембрану. Слична запажања забележена су у случају хинолин-4-карбоксилата који садрже терминални 2-супституисани пиридински прстен.<sup>148</sup> Такође, атом флуора на С6 позицији хинолинског прстена у Brequinar-овој структури додатно доприноси инхибиторној активности.

### 2.2.3. Цитотоксична активност једињења серије А

Цитотоксична активност новосинтетизованих деривата серије А испитана је на хуманим малигним ћелијским линијама аденокарцинома дојке (MCF-7), аденокарцинома плућа (A549) и меланома (A375). У циљу одређивања селективности и терапеутског потенцијала ових једињења, *in vitro* је испитана и њихова токсичност МТТ тестом (енг.3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) на здравој ћелијској линији кератиноцита коже (HaCaT). Резултати су изражени као  $IC_{50}$  вредности и приказани су у **Табели 3**.

**Табела 3.** *In vitro* цитотоксична активност деривата 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине **100а-љ** према MCF-7, A549, A375 и HaCaT ћелијским линијама.

Једињење	IC <sub>50</sub> ± SD (µM)*			
	MCF-7	A549	A375	HaCaT
<b>100а</b>	3,44 ± 0,80	19,88 ± 0,02	5,67 ± 2,07	21,19 ± 8,32
<b>100б</b>	3,21 ± 1,08	19,36 ± 0,03	4,67 ± 1,55	15,80 ± 6,51
<b>100в</b>	19,54 ± 8,90	30,11 ± 0,03	34,08 ± 11,82	54,49 ± 13,87
<b>100г</b>	3,29 ± 0,75	12,49 ± 0,07	3,50 ± 0,73	20,08 ± 9,97
<b>100д</b>	6,78 ± 2,15	13,26 ± 0,04	7,91 ± 3,31	30,90 ± 9,34
<b>100ђ</b>	3,47 ± 0,91	10,75 ± 0,07	5,42 ± 1,14	22,62 ± 7,76
<b>100е</b>	2,52 ± 0,72	13,79 ± 0,05	1,52 ± 0,44	11,93 ± 5,47
<b>100ж</b>	6,61 ± 2,79	24,86 ± 0,05	6,79 ± 2,70	69,50 ± 15,45
<b>100з</b>	12,56 ± 5,86	37,90 ± 0,06	23,23 ± 7,08	41,62 ± 11,42
<b>100и</b>	7,28 ± 2,91	15,07 ± 0,05	2,69 ± 0,58	36,13 ± 10,63
<b>100ј</b>	4,14 ± 1,72	24,03 ± 0,02	4,88 ± 1,81	107,50 ± 20,49
<b>100к</b>	1,77 ± 0,57	8,96 ± 0,05	3,48 ± 1,38	32,85 ± 13,97
<b>100л</b>	12,21 ± 5,20	9,37 ± 0,05	14,74 ± 6,36	43,44 ± 11,37
<b>100љ</b>	10,06 ± 4,70	22,71 ± 0,02	6,15 ± 2,34	57,48 ± 13,06
<b>Brequinar</b>	21,43 ± 1,33	45,79 ± 0,42	0,81 ± 0,22	72,29 ± 0,09
<b>Leflunomide</b>	245,60 ± 3,40	228,40 ± 4,60	138,70 ± 6,00	249,60 ± 6,20

\* Резултати представљају средње вредности ± SD добијене након 72 сата третмана из три независна експеримента урађена у трипликату.

На основу приказаних резултата у **Табели 3** може се закључити да су тестирана једињења била активнија на ћелијским линијама MCF-7 и A375 у односу на ћелијску линију A549. Како би се испитала цитотоксичност према здравим ћелијама, за деривате хинолин-4-карбоксилне киселине израчунат је индекс селективности (*енг.* Selectivity index, SI) који представља однос IC<sub>50</sub> вредности добијених за здраву ћелију и IC<sub>50</sub> вредности добијених за малигно трансформисану ћелију (**Табела 4**).

**Табела 4.** Индекс селективности (SI) једињења **100а-љ**.

Једињење	Индекс селективности (SI)		
	MCF-7	A549	A375
<b>100а</b>	6,16	1,07	3,74
<b>100б</b>	4,92	0,82	3,38
<b>100в</b>	2,79	1,81	1,60
<b>100г</b>	6,10	1,61	5,74
<b>100д</b>	4,56	2,33	3,91
<b>100ђ</b>	6,52	2,10	4,17
<b>100е</b>	4,73	0,87	7,85
<b>100ж</b>	10,51	2,80	10,24
<b>100з</b>	3,31	1,10	1,79
<b>100и</b>	4,96	2,40	13,43
<b>100ј</b>	25,97	4,47	22,03
<b>100к</b>	18,56	3,67	9,44
<b>100л</b>	3,56	4,64	2,95
<b>100љ</b>	5,71	2,53	9,35

Највише вредности показало је једињење из ванилинске серије, **100j**, чији SI индекс износи 22,0 за A375 ћелијску линију, док за MCF-7 износи 26,0. Уколико је ова вредност  $> 10$  једињење се може сматрати селективним, подвргнути се даљем испитивању и потенцијално користити у терапеутске сврхе. Деривати чије су вредности  $< 10$  не поседују задовољавајућу селективност услед њихове токсичности како према малигним, тако и према нормалним ћелијама.<sup>149</sup>

#### 2.2.4. SAR студије

На основу сазнања из досадашње литературе, уочено је да код деривата хинолин-4-карбоксилне киселине постоје три региона у молекулу која утичу на ензимску инхибицију. Како би једињења показала добру инхибиторну активност неопходно је да хинолински део молекула садржи неке од следећих супституената:

- карбоксилну групу на **C4** позицији;
- бензенов прстен на **C2** позицији који садржи хидрофобне супституенте;
- флуор или јаку електрон-привлачну трифлуорметил групу на **C6** позицији.<sup>150</sup>

Избор структуралних фрагмената треба бити такав да допринесе биолошкој активности, а при том не наруши фармаколошке особине једињења. Заправо, у структури потенцијалних лекова је често заступљен атом флуора који поспешује ензимску инхибицију, међутим новија истраживања су показала његов негативан утицај и нежељене ефекте које испољава.<sup>151</sup> Након апсорпције таквих једињења могућа је оксидативна дефлуоринација при чему долази до ослобађања флуорида који испољавају разне токсичне ефекте, а веома често хемиотерапеутици који садрже овај атом показују лошу селективност, односно токсичност на здравим ћелијским линијама.<sup>152</sup> Имајући у виду наведене чињенице, финални деривати у оквиру серије **A** не садрже флуор на **C6** позицији хинолинског прстена, како би се побољшала селективност, а евентуални споредни токсични ефекти смањили на минимум.

У оквиру синтетизованих једињења, најпре је истражено како положај двеју бензилокси група у случају једињења **100a-b** и **100g** утиче на цитотоксичност и *h*DHODH инхибиторну активност (Табела 2). Обзиром да је аналог **100g** показао веће антитуморско дејство према A549 и A375 ћелијским линијама као и бољи индекс селективности у поређењу са **100a** и **100b**, протокатехуински и ванилински прекурсори (**98v** и **98g**) су подвргнути даљој дериватизацији. Интересантно је да су једињења **100a** (2,3-дисупституција на крајњем ароматичном прстену) и **100g** (3,4-дисупституција) показала исту инхибиторну активност према ензиму, при чему IC<sub>50</sub> вредност износи 0,27  $\mu$ M. Знатан губитак инхибиторног и антитуморског дејства је примећен када је бензилокси група замењена метокси групом (**100v**). Даље истраживање је било усмерено ка 3,4-дисупституисаним дериватима, при чему је природа супституената имала велики утицај на цитотоксичну и ензимску активност. Аналози **100h-e** који садрже *n*-бутил и *iso*-бутил групе у *meta* и *para* положајима крајњег прстена показали су се као најмоћнији инхибитори *h*DHODH у оквиру ове серије, при IC<sub>50</sub> = 0,15  $\mu$ M. Поред инхибиторне активности, добро антитуморско дејство је примећено код ових деривата, при чему су IC<sub>50</sub> вредности за **100h** износиле 3,47  $\mu$ M (MCF-7) и 5,42  $\mu$ M (A375), док су IC<sub>50</sub> вредности у случају **100e** износиле 2,52  $\mu$ M (MCF-7) и 1,52  $\mu$ M (A375). Нажалост, индекс селективности ових аналога није задовољавајући; **100e** који садржи волуминозну хидрофобну *iso*-бутил групу је показао токсичније ефекте према здравој ћелијској линији од **100h** који садржи *n*-бутил групу. На основу антитуморског дејства ових деривата, може се закључити да величина супституента, као и стерни



ефекти, представљају факторе који утичу на конформационе промене у молекулу, а самим тим и на њихову активност.

Хинолински дериват **100ј**, који је добијен полазећи од *n*-бутил ванилина као прекурсора, је показао ниску токсичност према здравој ћелији ( $IC_{50} = 107,50 \mu M$ ), благу антитуморску активност према MCF-7 ( $IC_{50} = 4,14 \mu M$ ) и A375 ( $IC_{50} = 4,88 \mu M$ ) ћелијама и одличну ензимску инхибицију  $IC_{50} = 0,34 \mu M$ . Деривати који су добијени од неалкилованих фенолних алдехида као прекурсора, **100л-љ**, показали су значајно смањене цитотоксичне и инхибиторне активности. Једињење **100к**, чији је прекурсор *iso*-бутил ванилин, је показало нижу *h*DHODH активност ( $IC_{50} = 0,44 \mu M$ ) у поређењу са **100е**, чији је прекурсор *iso*-бутил протокатехуински алдехид ( $IC_{50} = 0,15 \mu M$ ). Ипак, дериват **100к** је испољио добро антитуморско дејство према MCF-7 ( $IC_{50} = 1,77 \mu M$ ) и A375 ( $IC_{50} = 3,48 \mu M$ ) ћелијским линијама, при чему је задржао добру селективност (18,6 (MCF-7) и 9,4 (A375)). У односу на једињење **100к**, које садржи само један хидрофобни супституент, **100е** је показало већу цитотоксичност према NaCaT-у услед присуства две хидрофобне групе. Генерално, сви деривати хинолина из ванилинске серије (**100ж**, **100и-к**), осим **100з**, су показали бољи фармаколошки профил од деривата из протокатехуинске серије (**100г-е**) услед боље селективности. Метокси групе у случају једињења **100з**, које су заузеле *мета* и *пара* положаје, нису допринеле доброј инхибиторној активности при чему је и индекс селективности био низак. Штавише, ни поларна хидроксилна група у структурама деривата **100л-љ**, није остварила неопходне интеракције у хидрофобном цепо протеина.

На основу резултата приказаних у Табелама 2 и 3, може се закључити да боља инхибиција ензима доводи до боље цитотоксичности, што је посебно изражено на MCF-7 и A375 ћелијским линијама.

## 2.2.5. Студија липофилности једињења серије А

Као што је већ напоменуто у *Општем делу (1.5. ADMET особине)*, липофилност представља једну од важних фармакокинетичких особина потенцијалних лекова. Самим тим,  $\log D_{7,4}$  вредности свих деривата серије А су одређене и представљене у **Табели 5**.

**Табела 5.**  $\log D_{7,4}$  вредности једињења **100а-љ** добијене експериментално *shake-flask* методом у двофазном систему *n*-октанол/фосфатни пуфер.

<i>n</i> -октанол/пуфер Једињење	C <sub>1</sub> (M)	$\lambda$ (nm)	C <sub>2</sub> (M)	$\log D_{7,4} \pm SD$
<b>100а</b>	$3,9675 \times 10^{-5}$	329	$3,7866 \times 10^{-5}$	$1,32 \pm 0,01$
<b>100б</b>	$3,9675 \times 10^{-5}$	348	$3,8030 \times 10^{-5}$	$1,36 \pm 0,01$
<b>100в</b>	$3,4484 \times 10^{-5}$	348	$1,0314 \times 10^{-5}$	$-0,37 \pm 0,01$
<b>100г</b>	$3,9675 \times 10^{-5}$	350	$3,7931 \times 10^{-5}$	$1,34 \pm 0,02$
<b>100д</b>	$2,9190 \times 10^{-5}$	356	$2,8608 \times 10^{-5}$	$1,69 \pm 0,01$
<b>100ђ</b>	$2,7109 \times 10^{-5}$	348	$2,6267 \times 10^{-5}$	$1,49 \pm 0,01$
<b>100е</b>	$2,7109 \times 10^{-5}$	348	$2,6162 \times 10^{-5}$	$1,44 \pm 0,02$
<b>100ж</b>	$2,6440 \times 10^{-5}$	348	$2,4323 \times 10^{-5}$	$1,06 \pm 0,01$
<b>100з</b>	$3,4484 \times 10^{-5}$	348	$6,7710 \times 10^{-6}$	$-0,61 \pm 0,01$
<b>100и</b>	$3,0014 \times 10^{-5}$	356	$2,0401 \times 10^{-5}$	$0,33 \pm 0,02$
<b>100ј</b>	$2,8187 \times 10^{-5}$	352	$2,3835 \times 10^{-5}$	$0,74 \pm 0,01$
<b>100к</b>	$3,0355 \times 10^{-5}$	348	$2,7265 \times 10^{-5}$	$0,95 \pm 0,01$
<b>100л</b>	$1,1377 \times 10^{-4}$	368	$7,5245 \times 10^{-6}$	$-1,15 \pm 0,02$
<b>100љ</b>	$3,3093 \times 10^{-5}$	368	$4,2299 \times 10^{-6}$	$-0,83 \pm 0,02$

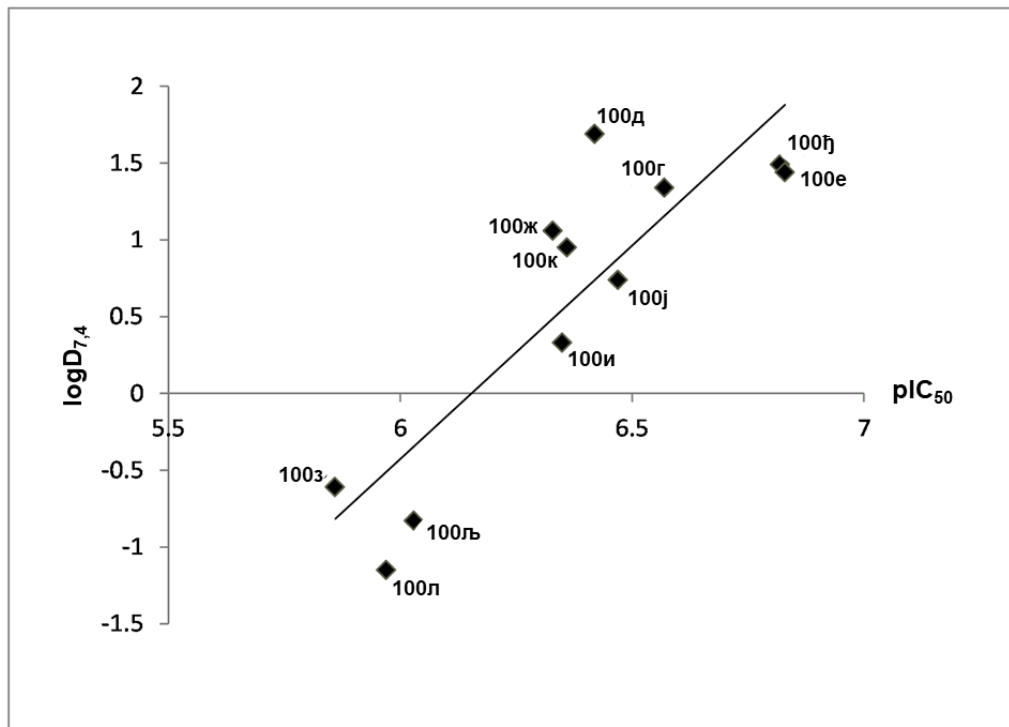
C<sub>1</sub> – концентрација тестираног једињења у *n*-октанол фази пре расподеле ( $\text{mol L}^{-1}$ );

$\lambda$  – таласна дужина апсорпционог максимума (nm);

C<sub>2</sub> – концентрација тестираног једињења у *n*-октанол фази после расподеле ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

Резултати приказани у **Табели 5** показују да једињења која садрже хидроксилне и/или метокси супституенте имају негативне  $\log D_{7,4}$  вредности (**100в**, **100з**, **100л** и **100љ**). Као што је очекивано, увођење хидрофобних група у структуру молекула повољно утиче на липофилност, као и на ензимску инхибицију. Аналоги **100ђ-е** који садрже *n*-бутил и *iso*-бутил групе показали су најбоље липофилне особине при чему вредности  $\log D_{7,4}$  износе 1,49 (**100ђ**) и 1,44 (**100е**). Сматра се да је овај ранг вредности оптималан за одличну *h*DHODH инхибицију. Интересантно је да  $\log D_{7,4}$  за **100д**, који садржи две *n*-пропил групе износи 1,69, што указује на израженије липофилне особине од **100ђ** који садржи *n*-бутил групе, као и од деривата **100е** код кога су присутни *iso*-бутил супституенти. Овакве вредности се приписују конформационим променама, јер хидрофобност молекула који садрже волуминозније алкил групе (у овом случају **100ђ-е**) у *n*-октанолу се смањује услед интеракција које остварују вицинални алкил низови.<sup>153</sup> Једињења која припадају ванилинској серији осим **100з** (**100ж**, **100и-к**) показала су нешто ниже  $\log D_{7,4}$  вредности у рангу од 0,33 до 1,06, али су успешно задржала добру инхибиторну активност (IC<sub>50</sub> = 0,34  $\mu\text{M}$  до 0,47  $\mu\text{M}$ ).

Утицај липофилних особина једињења на њихову инхибиторну ензимску активност је графички представљен на **Слици 32**. На основу графика негативне логаритамске IC<sub>50</sub> вредности ензимске инхибиције (pIC<sub>50</sub>) у зависности од  $\log D_{7,4}$  вредности које се односе на 3,4-дисупституисане деривате, може се закључити да липофилност није пресудна када је реч о ензимској активности узимајући у обзир да корелациони фактор износи  $r = 0,76$ .



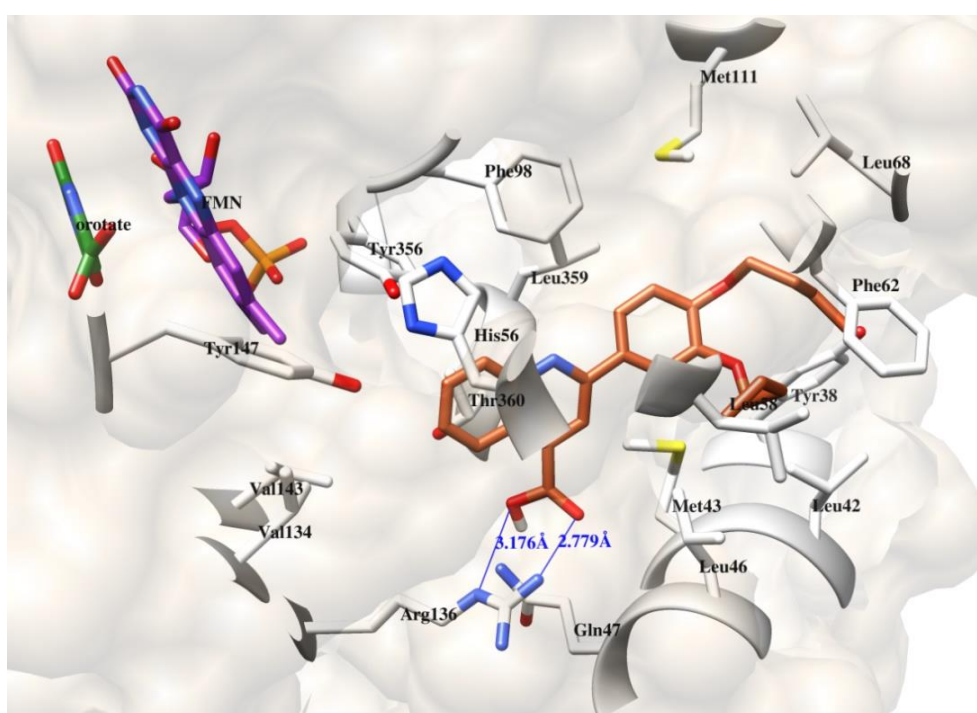
Слика 32. График зависности  $-\log IC_{50}$  ( $pIC_{50}$ ) од  $\log D_{7,4}$ .

Уколико се упореди утицај липофилности на антитуморско деловање, запажено је да је код одређених деривата (**100а-б**, **100г**, **100ђ-е** и **100к**) цитотоксична активност у релацији са липофилним карактеристикама.  $\log D_{7,4}$  вредности таквих једињења су у рангу од 0,95 до 1,49, што указује да оптималне липофилне особине доприносе ћелијској смрти, услед лакшег дифундовања једињења кроз ћелијску мембрану. Упркос томе, најлипофилније једињење **100д**,  $\log D_{7,4} = 1,69$ , је показало ниску антитуморску активност према свим тестираним ћелијским линијама. Са друге стране, **100л** које је показало негативну вредност  $\log D_{7,4} = -1,15$ , испољило је веома сличну цитотоксичност према А549 ћелијској линији као **100к** чија је  $\log D_{7,4} = 0,95$ . На основу приложених резултата и изведених чињеница, може се закључити да липофилност само делимично утиче на цитотоксичност и инхибиторну активност тестираних једињења.

### 2.2.6. Молекулски докинг одабраних једињења серије А

Како би се боље разумело на који начин новосинтетизовани деривати инхибирају *hDHODH*, студије молекулског докинга су показале најзначајније интеракције потенцијалних инхибитора са ензимом. У поглављу 1.4.2. *Структура hDHODH* је објашњено који аминокиселински остаци испуњавају хидрофобни тунел ензима, као и интеракције које се могу остварити са супстратом. Самим тим, за биолошки најактивније деривате, **100ђ** и **100е**, је сликовито приказано који положај заузимају у хидрофобној шупљини протеина, и које формиране везе доприносе ензимској инхибицији.

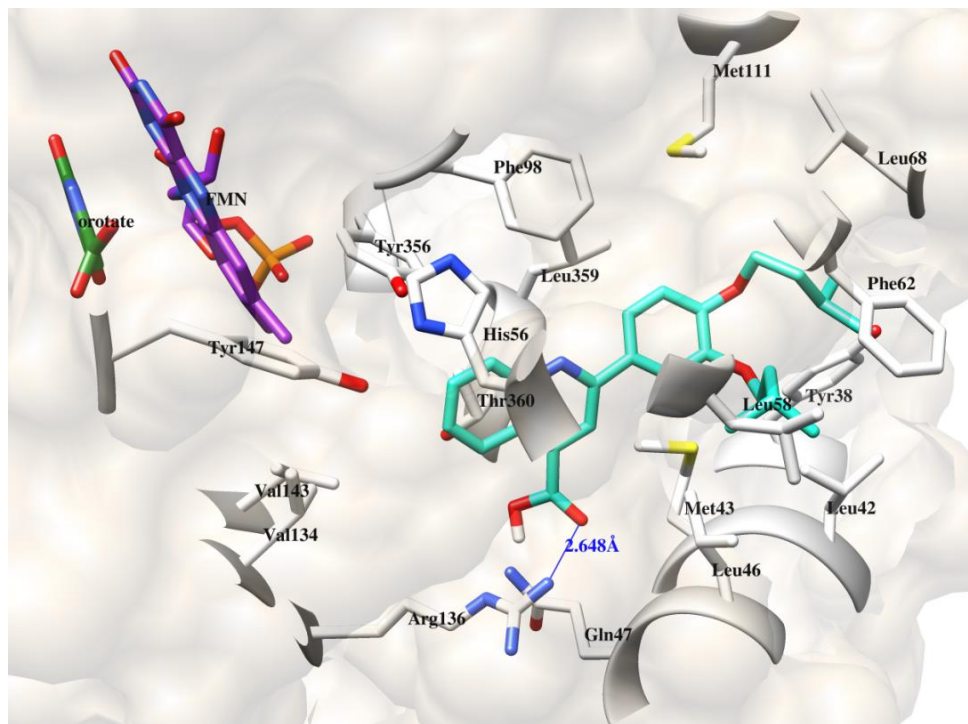
Биоконформација **100ђ** (Слика 33) је веома слична биоконформацији једињења **100е** (Слика 34). У случају једињења **100ђ**, гуанидни  $\omega$ -*N* остварује водоничну везу која је нешто слабија у односу на **100е** ( $d_{\text{HВ}} = 2,779 \text{ \AA}$ ). Поред ове водоничне везе, **100ђ** остварује и везу са  $\delta$ -*N* азотом Arg136 ( $d_{\text{HВ}} = 3,176 \text{ \AA}$ ).



**Слика 33.** Биоактивна конформација једињења **100ђ**. На слици су представљени аминокиселински остаци amino краја протеина, оротат као *hDHODH* супстрат и FMN као *hDHODH* коензим. Водоничне везе представљене су плавом бојом.

На **Слици 34** представљен је дериват **100е** у комплексу са ензимом. Ово једињење заузима скоро цео тунел, при чему карбоксилна група на положају С4 хинолинског система преко карбонилног дела остварује јаку водоничну везу ( $d_{\text{HВ}} = 2,648 \text{ \AA}$ ) са већ поменутиим гуанидним  $\omega$ -азотом ( $\omega$ -*N*) који потиче из Arg136. Овај исти  $\omega$ -*N* представља донора за формирање водоничне везе и код других једињења у оквиру ове серије. Хидроксилна група која је део карбоксилне, учествује у стварању електростатичке интерференције са амидним азотом Gln47. Хинолински прстен је заузео ортогоналну позицију у односу на FMN и делује као да затвара пролаз ка коензиму. Оваква оријентација хинолинског система је додатно условљена *T-shaped* (тј. *edge to face*) хидрофобним интеракцијама са Val134, Val143 и Tyr356 (преко

ароматичног система) и паралелно–помереним (енг. parallel-displaced) хидрофобним интеракцијама са His56.



**Слика 34.** Биоактивна конформација једињења **100e**. На слици су представљени аминокиселински остаци amino краја протеина, оротат као *hDHODH* супстрат и FMN као *hDHODH* коензим. Водоничне везе представљене су плавом бојом.

Хинолински азот слабом диполном интеракцијом привлачи метил групу бочног ланца Thr98. Продужење хинолина додатним ароматичним прстеном има значајан утицај на активност **100e**, јер остварује еклипсне хидрофобне интеракције са Leu359, као и паралелно–померене хидрофобне интеракције са Phe98. Ароматични прстен код свих једињења у оквиру ове серије је углавном задржао такав положај да се *meta iso*-бутил група налази у близини Leu58 и Phe62, док се *para iso*-бутил сужава ка Phe62 и Leu68. Етарски кисеоник је у оба случаја привучен електростатичким интеракцијама од стране Tyr38.

Све добијене биоконформације деривата **100a-љ** остварују веома сличне интеракције са ензимом, као и биоконформације претходно експериментално одређених кристалних структура попут Leflunomide-а и других деривата хинолин-4-карбоксилне киселине.

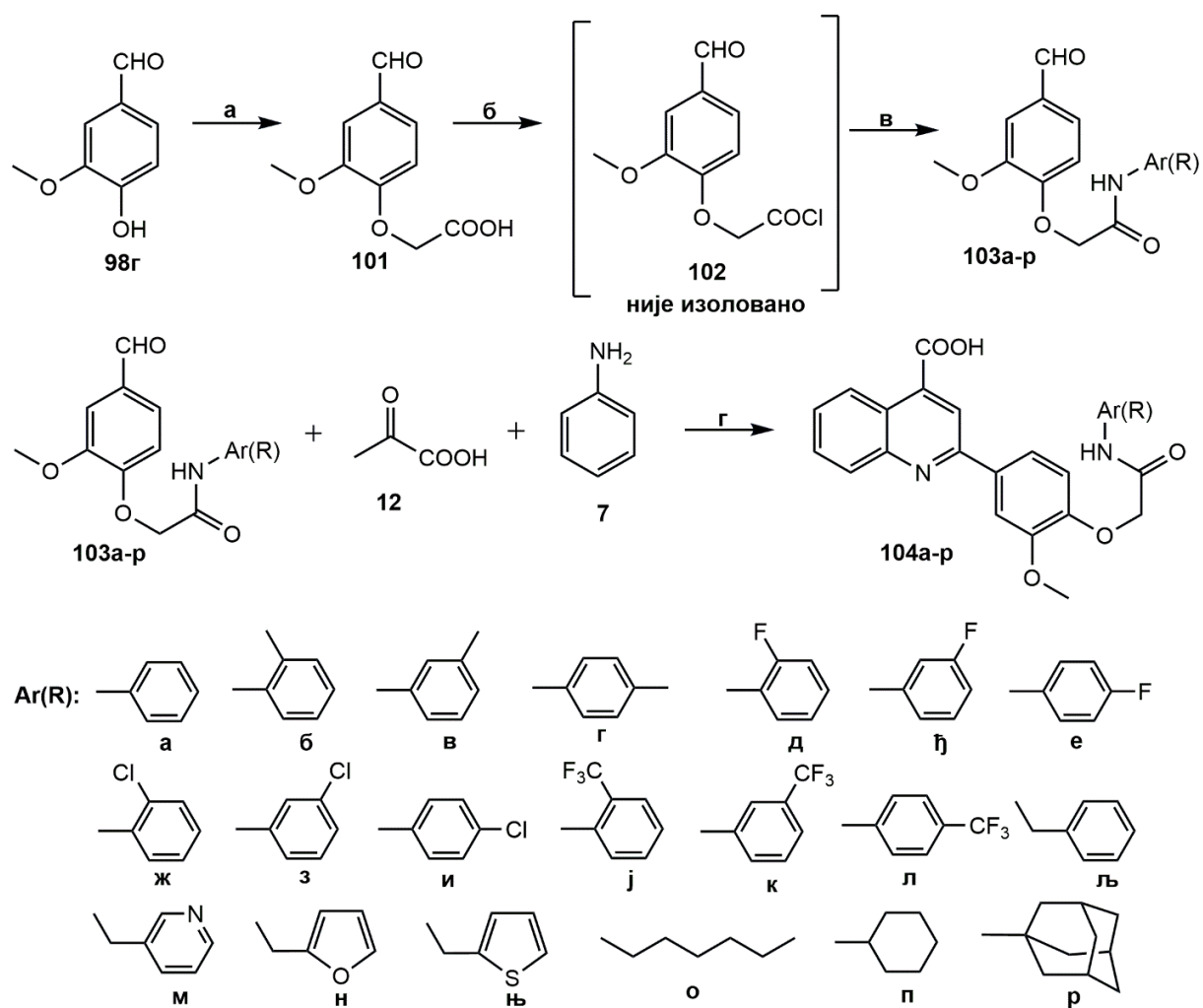
## 2.3. Серија Б

У оквиру серије **Б** синтетизовано је 20 нових деривата 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине помоћу Доебнер-ове реакције као и у претходном случају. У оквиру серије **А** је приказано да су хидрофобни супституенти у *мета* и *пара* положајима на крајњем ароматичном прстену молекула допринели доброј ензимској инхибицији. Међутим једињења у оквиру прве серије нису показала задовољавајућу селективност осим пар изузетака. Самим тим, синтеза деривата 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине серије **Б** конципирана је на идеји да новосинтетизована једињења задрже добру инхибиторну активност и при том покажу ниску цитотоксичност према здравој ћелији. Као и у претходној серији, ароматично језгро у положају 2 хинолинског прстена је одржало хидрофобне интеракције са ензимом, док је амидни фрагмент у положају 4, везан преко етарско-метилenske групе, допринео поларности целог молекула.

Свих 20 једињења у оквиру ове серије је подвргнуто биолошким испитивањима. Одређена је ензимска инхибиција за финалне деривате, а  $IC_{50}$  вредности упоређене са референтним једињењима Leflunomide-ом и Brequinar-ом. Такође, испитана је цитотоксична активност према хуманим малигним ћелијама и здравој ћелијској линији *in vitro*. Као и у претходној серији, одређена је липофилност свих новосинтетизованих деривата 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине.

### 2.3.1. Синтеза једињења серије Б

Синтеза финалних 2-супституисаних хинолин-4-карбоксилних киселина серије **Б** је изведена у два корака и приказана на **Схеми 25**. У првом кораку је ванилин алкилован монохлорсирћетном киселином према већ познатој процедури.<sup>154</sup> Производ ове реакције је у присуству тионил хлорида ( $SOCl_2$ ) и каталитичке количине DMF-а преведен у киселински хлорид **102** који није изолован, већ је реаговао са примарним аминима до жељених амида **103а-р** у присуству натријум бикарбоната ( $NaHCO_3$ ), додатог ради неутралисања ослобођене хлороводоничне киселине.<sup>155</sup> Сви добијени амиди (осим **103м** који је добијен са високом чистоћом) су прекристалисани из воденог раствора етанола (50–65%-ни). На овај начин је од двеју присутних супстанци запажених на танкослојној хроматографији, изолована само једна са изузетно високом чистоћом. Као што је већ напоменуто, финални деривати су добијени помоћу Доебнер-ове реакције у којој су учествовали прекурсор **103а-р**, пирогрођана киселина и анилин (**Схема 25**). Како би се добила једињења високе чистоће, сви производи су прекристалисани из етанола, осим **104н** који је пречишћен из тетраhydroфурана (THF). Сви финални деривати, као и прекурсор у оквиру ове серије су окарактерисани помоћу спектроскопских метода (NMR и IR), као и елементарном анализом.



**Схема 25.** Синтеза деривата 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине серије Б.  
 Реагенси и услови: а)  $\text{ClCH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 100 min., рефлукс,  $\text{HCl}$ ; б)  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{DMF}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 12 h, с.т.;  $\text{Ar(R)NH}_2$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 4,5 h, с.т.; г)  $\text{EtOH}$ , 3 h, рефлукс.

### 2.3.2. Инхибиција hDHODH једињењима серије Б

Истом колориметријском методом као у претходној серији, одређена је јачина ензимске инхибиције деривата серије Б. Инхибиторна активност финалних деривата је изражена преко IC<sub>50</sub> вредности које су приказане у Табели 6. На основу приложених резултата се може закључити да је пар деривата, чије су IC<sub>50</sub> вредности у рангу од 0,349–0,734 μМ, показало израженију моћ инхибиције од референтног једињења Leflunomide-a (0,755 μМ).

**Табела 6.** IC<sub>50</sub> вредности ензимске инхибиције добијене након третмана са хинолин-4-карбоксилним киселинама **104а-р**.

Једињење	IC <sub>50</sub> ± SD (μМ)	Једињење	IC <sub>50</sub> ± SD (μМ)
<b>104а</b>	3,92 ± 0,13	<b>104к</b>	0,48 ± 0,12
<b>104б</b>	5,92 ± 0,92	<b>104л</b>	2,36 ± 0,17
<b>104в</b>	1,92 ± 0,74	<b>104љ</b>	3,73 ± 0,55
<b>104г</b>	3,77 ± 0,71	<b>104м</b>	0,73 ± 0,29
<b>104д</b>	0,50 ± 0,40	<b>104н</b>	1,02 ± 0,15
<b>104ђ</b>	2,14 ± 0,41	<b>104њ</b>	3,09 ± 0,90
<b>104е</b>	1,61 ± 0,46	<b>104о</b>	2,69 ± 0,56
<b>104ж</b>	1,32 ± 0,15	<b>104п</b>	1,74 ± 0,35
<b>104з</b>	0,47 ± 0,28	<b>104р</b>	1,74 ± 0,48
<b>104и</b>	0,46 ± 0,13	<b>Leflunomide</b>	0,75 ± 0,12
<b>104ј</b>	0,35 ± 0,15	<b>Brequinar</b>	0,01 ± 0,00

Ипак, IC<sub>50</sub> вредности већине деривата су веће од референтног једињења. Претпоставка је да присуство амидног фрагмента код ових једињења није допринело остваривању неопходних интеракција са аминокиселинским остацима, што је резултовало слабијој инхибицији. Такође, етарски део молекула је подложен ротацији, самим тим се нарушава ригидност целог молекула, што отежава позиционирање у хидрофобном џепу протеина.

### 2.3.3. Цитотоксична активност једињења серије Б

Потенцијал новосинтетизованих деривата серије Б да индукују смрт ћелија испитан је на хуманим малигним ћелијским линијама аденокарцинома дојке (MCF-7) и акутне моноцитне леукемије (THP-1), као и на кератиноцитима човека (HaCaT). Резултати МТТ теста су показали да ова једињења не испољавају задовољавајућу цитотоксичност на тестираним малигним ћелијским линијама. У Табели 7 су приказане IC<sub>50</sub> вредности и може се закључити да је најактивнији дериват једињење **104ј** које је према MCF-7 ћелијској линији показало IC<sub>50</sub> вредност од 14,12 μМ. Такође, добијене IC<sub>50</sub> вредности на HaCaT ћелијама показују да деривати 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине серије Б немају изражену токсичност према овој здравој ћелијској линији што је од великог значаја.



**Табела 7.** *In vitro* цитотоксична активност деривата 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине **104а-р** према МСФ-7, ТНР-1 и НаСаТ ћелијским линијама.

Једињење	IC <sub>50</sub> ± SD (μМ)*		
	МСФ-7	ТНР-1	НаСаТ
<b>104а</b>	278,80 ± 5,60	135,10 ± 0,99	> 300
<b>104б</b>	121,20 ± 4,03	139,90 ± 3,08	230,40 ± 3,90
<b>104в</b>	139,50 ± 4,24	120,10 ± 6,08	225,30 ± 5,60
<b>104г</b>	126,90 ± 3,78	143,20 ± 1,48	> 300
<b>104д</b>	147,00 ± 3,05	121,30 ± 3,36	161,50 ± 4,60
<b>104ђ</b>	120,60 ± 2,76	116,90 ± 2,87	148,50 ± 5,50
<b>104е</b>	175,50 ± 5,65	130,60 ± 1,83	285,80 ± 10,70
<b>104ж</b>	32,75 ± 6,76	115,80 ± 3,33	209,90 ± 7,90
<b>104з</b>	64,43 ± 4,28	50,83 ± 2,84	191,80 ± 3,90
<b>104и</b>	142,00 ± 8,66	66,17 ± 4,27	> 300
<b>104ј</b>	14,12 ± 3,03	64,34 ± 1,57	102,10 ± 6,40
<b>104к</b>	20,08 ± 2,78	64,24 ± 3,43	159,60 ± 2,70
<b>104л</b>	71,59 ± 2,97	53,42 ± 3,63	150,50 ± 5,30
<b>104љ</b>	55,93 ± 1,99	195,80 ± 0,30	> 300
<b>104м</b>	50,93 ± 2,49	256,20 ± 1,35	> 300
<b>104н</b>	94,46 ± 7,15	277,00 ± 3,55	> 300
<b>104њ</b>	103,50 ± 6,97	115,50 ± 12,91	> 300
<b>104о</b>	59,37 ± 4,32	108,10 ± 4,34	> 300
<b>104п</b>	147,00 ± 2,86	136,20 ± 1,43	> 300
<b>104р</b>	64,51 ± 2,79	50,43 ± 4,18	180,54 ± 7,40
<b>Leflunomide</b>	190,54 ± 8,29	330,8 ± 6,56	> 300

\* Резултати представљају средње вредности ± SD добијене након 72 сата третмана из три независна експеримента урађена у трипликату.

#### 2.3.4. SAR студије

У оквиру ове серије, синтетизовани су деривати који у својој структури на крајњем ароматичном прстену садрже супституенте одабране тако да испољавају електрон-донорске или електрон-акцепторске особине. Самим тим, испитан је утицај природе и положаја супституената на ензимску инхибицију и цитотоксични потенцијал. Амидни и етарско-метиленски фрагмент повезују овај део молекула са другим ароматичним прстеном. Овакав структурни део, везан је за хинолински систем у положају 2, при чему се добија један сложен молекул који садржи сегменте различите хидрофобности.

На основу резултата у **Табели 6** може се закључити да супституција бензеновим прстеном (**104а**) није показала изражену ензимску активност при чему је IC<sub>50</sub> = 3,92 μМ, нити је узроковала смрт МСФ-7 и ТНР-1 ћелија. Побољшање инхибиторне активности није запажено увођењем електрон-донорских метил група (**104б-г**), док је боља активност примећена у случају супституције крајњег бензеновог прстена електрон-акцепторским супституентима. У случају деривата **104д-е** код којих је присутан атом флуора, може се закључити да он доприноси ензимској инхибицији, што је посебно изражено уколико заузима *ortho* положај при чему је једињење **104д** (IC<sub>50</sub> = 0,50 μМ према *hDHODH*) показало бољу инхибиторну активност од референтног једињења Leflunomide-а. Такође, овај дериват је показао јако ниску цитотоксичност према здравој ћелији (IC<sub>50</sub> = 161,50 μМ). Важно је напоменути да положај

супституената у великој мери утиче на ензимску активност, па је самим тим запажена смањена активност код деривата **104e** ( $IC_{50} = 1,61 \mu M$ ), код кога се флуор налази у *пара* положају, док је у случају *мета* супституције (**104ђ**,  $IC_{50} = 2,14 \mu M$ ) ова активност била још мање испољена. Присуство електрон-акцепторских супституената је и у случају хлора показало позитиван утицај на инхибиторни потенцијал једињења, па су самим тим деривати код којих је атом хлора у *мета*, односно *пара* положају, показали јако сличну ензимску активност ( $IC_{50} = 0,47 \mu M$  за **104з** и  $IC_{50} = 0,46 \mu M$  за **104и**). Штавише, једињење **104и** је показало најбољи фармаколошки профил, где је поред добре инхибиције ензима, испољило и ниску цитотоксичност према здравом кератиноциту  $IC_{50} > 300 \mu M$ . Најбољу инхибиторну активност према *hDHODH* показао је аналог **104ј** чија је  $IC_{50} = 0,35 \mu M$  код кога је присутна  $CF_3$  група у *орто* положају. Уколико се упореди активност **104д** и **104ј**, може се закључити да трифлуорметил група има већи утицај на инхибицију *hDHODH* од самог флуора на истој позицији бензеновог прстена. Ипак, цитотоксичност према здравој ћелијској линији једињења **104ј** је израженија у односу на **104и**, па самим тим овај дериват није показао задовољавајући фармаколошки профил. Очигледно је да је трифлуорметил група допринела хидрофобним интеракцијама које су неопходне за инхибицију ензима, а поред тога и благо утицала на цитотоксични потенцијал. У складу са тим, најизраженију цитотоксичну активност је показао дериват **104ј** према MCF-7 ћелијској линији ( $IC_{50} = 14,12 \mu M$ ).

У односу на претходне деривате у оквиру ове серије, једињења **104љ-њ** су за амидни фрагмент везана преко метиленске групе. Ова метиленска група доприноси флексибилности молекула, самим тим је омогућена ротација која код претходних деривата није била присутна. Међутим, у случају **104љ** ( $IC_{50} = 3,73 \mu M$ ), ова слободна ротација је допринела једва приметном побољшању активности у односу на први синтетизовани дериват **104а** ( $IC_{50} = 3,92 \mu M$ ), чији је терминални бензен прстен директно везан за амидни азот. Хетероароматична супституција и додатна метиленска група у случају **104м** је резултовала у бољој инхибиторној активности од референтног једињења ( $IC_{50} = 0,73 \mu M$ ), док то није био случај код фуранског (**104н**,  $IC_{50} = 1,02 \mu M$ ) и тиофенског аналога (**104њ**,  $IC_{50} = 3,09 \mu M$ ). Као и у случају електрон-донорске метил групе, једињења супституисана *n*-хексил, циклохексил и адамантил групама нису испољила инхибиторну активност, као ни значајан цитотоксични потенцијал према малигним ћелијама.

На основу приложених резултата, може се закључити да су једињења са електрон-акцепторским супституентима углавном показала добру моћ инхибиције и веома ниску токсичност према здравим, малигно неизмењеним ћелијама, док је антитуморски потенцијал у случају свих тестираних деривата био слабо изражен.

### 2.3.5. Студија липофилности једињења серије Б

Липофилност свих деривата 2-супституисане хиолин-4-карбоксилне киселине у оквиру серије **Б** је одређена експериментално, при чему су вредности  $\log D_{7,4}$  представљене у **Табели 8**. На основу приложених резултата може се закључити да се  $\log D_{7,4}$  вредности налазе у оптималном рангу од 0,45 до 2,32 што улази у идеалан опсег (0–3), осим у пар изузетака.

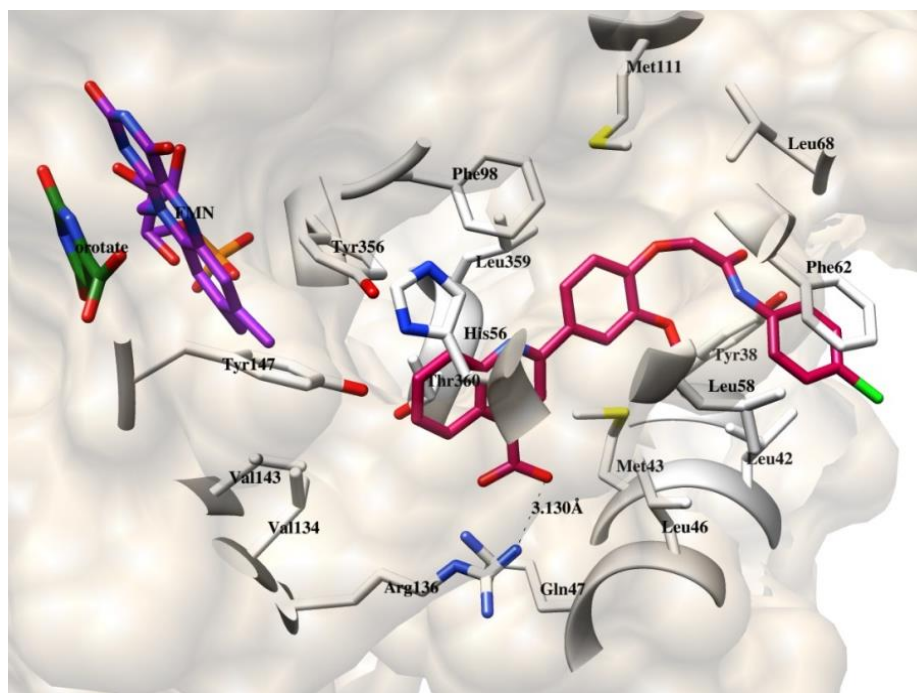
**Табела 8.**  $\log D_{7,4}$  вредности једињења **104а-р** добијене експериментално *shake-flask* методом у двофазном систему *n*-октанол/фосфатни пуфер.

Једињење	$\log D_{7,4} \pm SD$	Једињење	$\log D_{7,4} \pm SD$
<b>104а</b>	0,72 ± 0,02	<b>104к</b>	1,35 ± 0,01
<b>104б</b>	0,84 ± 0,02	<b>104л</b>	1,64 ± 0,02
<b>104в</b>	1,54 ± 0,01	<b>104љ</b>	0,45 ± 0,01
<b>104г</b>	1,16 ± 0,02	<b>104м</b>	-0,80 ± 0,01
<b>104д</b>	0,87 ± 0,01	<b>104н</b>	-0,33 ± 0,01
<b>104ђ</b>	1,59 ± 0,01	<b>104њ</b>	-0,01 ± 0,01
<b>104е</b>	1,09 ± 0,01	<b>104о</b>	1,01 ± 0,01
<b>104ж</b>	1,59 ± 0,02	<b>104п</b>	0,79 ± 0,02
<b>104з</b>	2,32 ± 0,02	<b>104р</b>	1,04 ± 0,02
<b>104и</b>	1,52 ± 0,01	<b>Brequinar</b>	1,81 ± 0,05
<b>104ј</b>	1,30 ± 0,01		

Одличне липофилне особине су показали углавном деривати код којих је присутан електрон-акцепторски супституент. Самим тим, деривати код којих је флуор у *мета* (**104ђ**) и хлор у *орто* (**104ж**) положају на крајњем ароматичном делу молекула су показали одличне липофилне особине, при чему имају једнаке  $\log D_{7,4}$  вредности (1,59). Ипак, ови деривати нису задржали добру инхибиторну активност, за разлику од аналога **104и** (Cl присутан у *пара* положају) који је поред добрих липофилних особина ( $\log D_{7,4} = 1,52$ ), задржао и задовољавајућу активност ( $IC_{50} = 0,46 \mu M$  према *hDNODH*). Оптималне липофилне особине показали су и други деривати са електрон-привлачним супституентима, као што су **104ј-л** аналози који садрже *орто*, *мета* и *пара*  $CF_3$  групу чије су  $\log D_{7,4}$  вредности 1,30 (**104ј**), 1,35 (**104к**) и 1,64 (**104л**). Поред ових једињења са халогеним супституентима, електрон-донорска метил група у *мета* положају је такође допринела добрим фармаколошким особинама деривата **104в** ( $\log D_{7,4} = 1,54$ ). Ипак, на основу претходних резултата (**Табеле 6 и 7**), добру ензимску инхибицију ( $IC_{50} = 0,46 \mu M$  према *hDNODH*), ниску цитотоксичност према здравим ћелијама ( $IC_{50} > 300 \mu M$ ) и идеалну вредност  $\log D_{7,4}$  (1,52) има дериват код кога је Cl у *пара* положају, **104и**. Негативне вредности  $\log D_{7,4}$  су показали хетероароматични аналози **104м-њ**, па сходно томе, растворљивост ових једињења у води је повећана што доводи до слабе пропустљивости кроз липофилне ћелијске мембране.

### 2.3.6. Молекулски докинг одабраног једињења серије Б

Као и у случају серије А, и у оквиру ове серије студија молекулског докинга је расветлила начин везивања одабраног инхибитора са ензимом. У овом случају је то једињење које је показало најбољи фармаколошки профил, **104и**. На **Слици 35**, је приказан положај овог деривата у хидрофобном џепу ензима као и интеракције које остварује са аминокиселинским остацима који окружују овај тунел.



**Слика 35.** Биоактивна конформација једињења **104и**. На слици су представљени аминокиселински остаци amino краја протеина, оротат као *hDHODH* супстрат и FMN као *hDHODH* коензим, док због јасноће слике водоникови атоми нису приказани.

Водоничне везе представљене су црном бојом.

Слично дериватима 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине серије А, карбоксилна група која се налази на С4 атому хинолинског система остварује јаку водоничну везу преко карбонилног угљеника са гуанидним  $\omega$ -азотом ( $d_{\text{HВ}} = 2,648 \text{ \AA}$ ) из Arg136. Хинолински прстен својим положајем ствара просторну баријеру за приступ убихинона. Као у случају деривата серије А, хетероциклична оријентација је додатно условљена *T-shaped* хидрофобним интеракцијама са Val134, Val143 и Tyr356 (преко ароматичног дела) и паралелно-помереним хидрофобним интеракцијама са His56. Хинолински азот је успоставио електростатичку интеракцију са фенолним фрагментом Tyr356, а поред тога остварује и индуковане-дипол интеракције са *hPhe98* и *hLeu359*. Хлор, који је у *para* положају на бензеновом прстену амидног фрагмента, заузима одлично место на периферији тунела ензима и остварује диполну интеракцију са аминокиселинским остатком Leu42.

## 2.4. Серија В

У односу на претходне две серије где су деривати хинолин-4-карбоксилне киселине били супституисани у положају 2, у оквиру серије **В** синтетизовано је 14 нових деривата 2,3-дисупституисане хинолин-4-карбоксилне киселине, при чему је први пут извршена дериватизација хинолинског прстена у положају 3, тако да финална једињења садрже халконску јединицу. Такође, хинолин-4-карбоксилне киселине у серијама **А** и **Б** добијене су помоћу Doebner-ове реакције, док је 2,3-дисупституисана хинолин-4-карбоксилна киселина као прекурсор у овој серији добијена помоћу Pfitzinger-ове реакције циклизације. Финални хинолин-халконски хибриди добијени су Claisen-Schmidt-овом реакцијом кондензације.

Као што је већ познато, халкони представљају класу једињења која је присутна у многим природним производима, при чему испољавају широк спектар биолошких активности.<sup>156</sup> Са друге стране, прстен хинолин-4-карбоксилне киселине представља чести структурни фрагмент код потенцијалних *hDNODN* инхибитора, што је већ раније описано. Имајући то у виду, идеја за синтезу финалних деривата у оквиру ове серије била је да комбинацијом хинолина са другим биоактивним фармакофорама, настану деривати који би као резултат синергистичких ефеката показали одличну биолошку активност. Ово је потврђено и у литератури, при чему хинолин-халконски коњугати инхибирају различите ензиме и испољавају друге, медицински значајне, биолошке активности.<sup>157</sup>

У оквиру серије **В** одређена је  $IC_{50}$  вредност ензимске инхибиције свих 14 деривата, антитуморско дејство на MCF-7, A549 и A375 туморским ћелијама као и на здравом кератиноциту човека (HaCaT). Додатно, студијама липофилности и растворљивости окарактерисане су фармакокинетичке особине ових једињења.

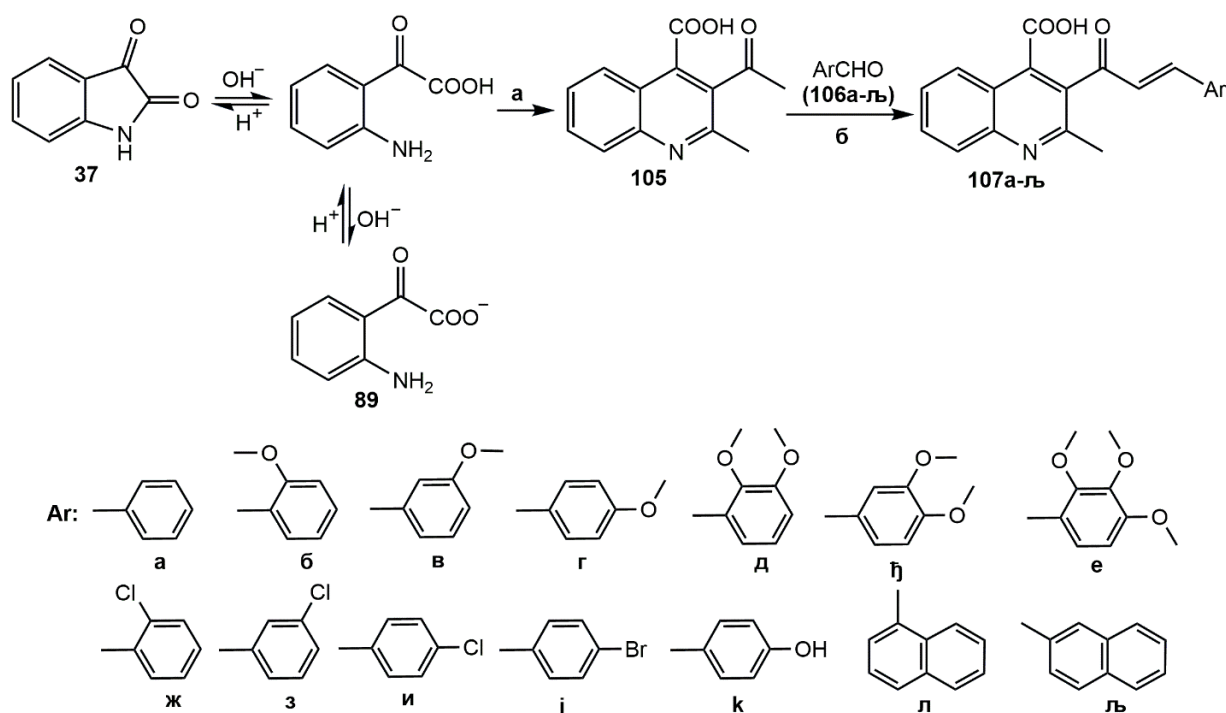
### 2.4.1. Синтеза једињења серије В

Синтеза финалних хинолин-халконских хибрида у оквиру серије **В** изведена је у два корака (**Схема 26**). Као што је раније наведено, прекурсор је добијен помоћу Pfitzinger-ове реакције циклизације, према већ познатој, али измењеној процедури.<sup>141</sup> Заправо, идеја је била да се у реакцији изатина са дикарбонилним једињењем добије 2,3-дисупституисана хинолин-4-карбоксилна киселина са ацетил групом у положају 3 која би даље могла да реагује са алдехидима. Qinghua и сарадници су у свом раду представили метод по ком су добили ово једињење, коришћењем  $CuSO_4 \times 5H_2O$  као катализатор.<sup>142</sup> Међутим, у приказаној процедури (**Схема 26**) је прекурсор **105** добијен на ефикаснији начин и без коришћења катализатора. Први корак представљао је добијање изатината (**89**), при чему је раствор закисељен коришћењем 6M HCl до  $pH = 2$ , а након тога је додат ацетилацетон. Заправо, реакција започиње отварањем прстена изатина при чему се добија изатинат у воденом раствору калијум хидроксида. Како би форма изатината била једина присутна у овом раствору, реакција се одвија у вишку базе. Заправо, литературни подаци су показали да однос ових двеју форми, односно затвореног (изатина) и отвореног прстена (изатината) зависи од  $pH$  раствора. Као што је већ раније било поменуто, када је  $pH$  изнад 6, изатинат представља доминантну форму, на  $pH = 4$  оба ова система су присутна у раствору, док на  $pH$  вредности испод 3, стабилнија форма је изатин.<sup>158</sup>

Прва претпоставка је да се циклизација изатината до изатина не одвија брзо и да форма протонованог изатината може постојати на нижим  $pH$  вредностима. Међутим, током реакције долази до промене, при чему  $pH$  раствора порасте до  $\sim 4,5$ , док је за

одвијање реакције неопходно одржавати  $\text{pH} \sim 2$ , а самим тим је принос добијеног прекурсора 92%, док је у супротном значајно нижи (51%). У следећем кораку, добијени дериват **105** је реаговао са алдехидима у присуству  $\text{KOH}$ , Claisen-Schmidt-овом реакцијом кондензације при чему су настали финални деривати 2,3-дисупституисане хинолин-4-карбоксилне киселине. За добијање ових деривата, примењене су три методе. За деривате **107а-б**, **107г**, **107ж**, **107и-ј** и **107љ** коришћена је метода без растварача, третманом прекурсора **105**, алдехида и  $\text{KOH}$  у порцеланском авану све до видљивог престанка издвајања воде и стварања хомогене прашкасте супстанце (метода **А**). Како би се добили **107в**, **107д**, **107з** и **107л** било је неопходно променити реакционе услове, па су наведени деривати добијени мешањем на собној температури 15 сати у метанолу (метода **Б**). Ригорозније реакционе услове захтевали су деривати **107ђ-е** и **107к** услед присуства позитивног резонантног ефекта хидрокси и метокси група на ароматичном прстену полазних алдехида, које су утицале на смањење електрофилности карбонилног угљеника. Самим тим, **107ђ-е** добијени су након 5 h рефлукса у етанолу, док је за **107к** било потребно дупло више времена, односно 10 h (метода **В**).

Структуре свих новосинтетизованих халкона потврђене су спектралним методама (IR и NMR), као и елементарном анализом. Употребом деутеро диметилсулфооксида ( $\text{DMSO-}d_6$ ) добијени сигнали су били преклопљени или лоше резолуисани, самим тим су за потребе NMR спектроскопије сва једињења растворена у деутеро пиридину након чега су добијени сигнали били задовољавајућег квалитета. Сви деривати су показали очекивана хемијска померања у  $^1\text{H}$  као и у  $^{13}\text{C}$  NMR спектрима, при чему је константа купловања АБ система у  $^1\text{H}$  спектрима износила  $J = 16,0 - 16,4$  Hz, што указује да добијени халкони имају *trans* конфигурацију. Додатно, сви деривати у оквиру ове серије су окарактерисани помоћу масене спектрометрије високе резолуције (HRMS), а њихова чистоћа додатно потврђена хроматографијом високих перформанси (HPLC).



**Схема 26.** Синтеза деривата 2,3-дисупституисане хинолин-4-карбоксилне киселине серије **B**.

Реагенси и услови: а)  $\text{KOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 30 мин.;  $\text{HCl}$ , с.т., 1 h; б)  $\text{KOH}$ , 20 мин., без растварача, за **107а-б**, **107г**, **107ж**, **107и-ј** и **107љ**;  $\text{KOH}$ ,  $\text{MeOH}$ , с.т., 15 h за **107в**, **107д**, **107з** и **107л**;  $\text{KOH}$ ,  $\text{EtOH}$ , рефлукс, 5 h за **107ђ-е** (10 h за **107к**).

#### 2.4.2. Инхибиција *hDHODH* једињењима серије **B**

Користећи исту методу као и за претходне две серије једињења, и за деривате 2,3-дисупституисане хинолин-4-карбоксилне киселине **B** серије је одређена ензимска инхибиторна активност, а  $\text{IC}_{50}$  вредности приказане су у **Табели 9**. Из приложених резултата се може закључити да је шест деривата показало бољу ензимску инхибицију од референтног једињења Leflunomide-a. Најбољи инхибитори у оквиру ове серије су **107г**, **107з**, **107ј** и **107л** чије су  $\text{IC}_{50}$  вредности у рангу од 0,12 – 0,14  $\mu\text{M}$ , док су деривати **107ж**, који садржи терминални *орто*-хлорофенилни део и **107љ**, који садржи полицикличну ароматичну јединицу везану за хинолински прстен, такође показали јако добре инхибиторне активности при чему су њихове  $\text{IC}_{50}$  вредности 0,37  $\mu\text{M}$  и 0,58  $\mu\text{M}$ . У случају ди- и поли-супституисаних деривата **107д-е** инхибиторна активност је слабо изражена ( $\text{IC}_{50}$  = 3,42  $\mu\text{M}$  (**107д**), 5,68  $\mu\text{M}$  (**107ђ**) и 4,10  $\mu\text{M}$  (**107е**)).

**Табела 9.** IC<sub>50</sub> вредности ензимске инхибиције добијене након третмана са хинолин-халконским хибридама **107а-љ**.

Једињење	IC <sub>50</sub> ± SD (μM)	Једињење	IC <sub>50</sub> ± SD (μM)
<b>107а</b>	3,44 ± 0,16	<b>107з</b>	0,12 ± 0,02
<b>107б</b>	5,38 ± 0,02	<b>107и</b>	10,51 ± 0,08
<b>107в</b>	1,93 ± 0,12	<b>107ј</b>	0,13 ± 0,03
<b>107г</b>	0,14 ± 0,01	<b>107к</b>	4,68 ± 0,23
<b>107д</b>	3,42 ± 0,16	<b>107л</b>	0,12 ± 0,01
<b>107ђ</b>	5,68 ± 0,28	<b>107љ</b>	0,58 ± 0,06
<b>107е</b>	4,10 ± 0,36	<b>Leflunomide</b>	0,75 ± 0,12
<b>107ж</b>	0,37 ± 0,07	<b>Brequinar</b>	0,01 ± 0,00

### 2.4.3. Цитотоксична активност једињења серије В

Цитотоксична активност свих новосинтетизованих деривата **107а-љ** према ћелијским линијама MCF-7, A549 и A375 и HaCaT је, као и у претходним случајевима, урађена помоћу МТТ теста, након 72 h третмана. Резултати су приказани у **Табели 10**. A375 ћелијска линија је била најосетљивија након третмана са **107г** (IC<sub>50</sub> = 5,0 μM) и **107ж** (IC<sub>50</sub> = 6,8 μM). Остали деривати су показали слаб антитуморски потенцијал, док је код неких једињења он изостао **107ђ-е** и **107к**.

**Табела 10.** *In vitro* цитотоксична активност хинолин-халконских хибрида **107а-љ** према MCF-7, A549, A375 и HaCaT ћелијским линијама.

Једињење	IC <sub>50</sub> ± SD (μM)*			
	MCF-7	A549	A375	HaCaT
<b>107а</b>	> 300	> 300	180,80 ± 3,62	227,30 ± 3,61
<b>107б</b>	149,70 ± 5,92	154,70 ± 1,04	273,01 ± 4,72	203,42 ± 5,88
<b>107в</b>	> 300	170,10 ± 8,67	96,49 ± 2,84	> 300
<b>107г</b>	97,20 ± 5,12	52,47 ± 6,71	5,00 ± 0,99	67,50 ± 6,62
<b>107д</b>	63,84 ± 4,90	137,90 ± 5,31	139,80 ± 4,11	215,79 ± 4,70
<b>107ђ</b>	> 300	> 300	> 300	> 300
<b>107е</b>	> 300	> 300	> 300	> 300
<b>107ж</b>	13,83 ± 3,89	18,28 ± 4,65	6,77 ± 1,09	23,54 ± 2,42
<b>107з</b>	22,88 ± 2,81	47,60 ± 5,55	22,70 ± 1,42	27,42 ± 2,91
<b>107и</b>	> 300	> 300	35,57 ± 3,83	> 300
<b>107ј</b>	100,30 ± 3,29	37,02 ± 4,42	25,17 ± 3,43	38,39 ± 7,53
<b>107к</b>	> 300	> 300	> 300	> 300
<b>107л</b>	44,06 ± 3,04	23,23 ± 3,41	12,15 ± 2,32	13,30 ± 6,49
<b>107љ</b>	49,68 ± 2,04	41,46 ± 4,91	18,35 ± 3,97	20,20 ± 4,18
<b>Brequinar</b>	21,43 ± 1,33	45,79 ± 0,42	0,81 ± 0,22	72,29 ± 0,09
<b>Leflunomide</b>	245,63 ± 3,37	228,40 ± 4,63	138,71 ± 6,05	249,59 ± 6,18

\*Резултати представљају средње вредности ± SD добијене након 72 сата третмана из три независна експеримента урађена у трипликату.



За све деривате у оквиру серије **B** је израчунат индекс селективности при чему је **107г** показао најбоље резултате за А375 ћелијску линију, где је  $SI = 13,44$ .

#### 2.4.4. SAR студије

Као што је наведено у претходним SAR студијама, инхибиторна и антитуморска активност једињења једним делом зависе од положаја и природе супституената, па је и у случају новосинтетизованих хинолин-халкон деривата серије **B** ова студија предочила ефекте свих електрон-донорских и електрон-акцепторских група на терминалном бензеновом прстену, као и утицај полицикличних ароматичних јединица везаних за хинолински прстен у случају једињења **107л-љ**.

У оквиру ове серије, **107а** је први синтетизовани дериват који садржи несупституисану фенил групу везану за хинолински прстен, док је синтеза других аналога подразумевала увођење електрон-донорских и електрон-акцепторских група при чему су добијени моносупституисани (**107б-г**, **107ж-к**), дисупституисани (**107д-ћ**) и полисупституисани (**107е**) хинолин-халконски хибриди. Први синтетизовани хинолин-халконски конјугат **107а** није показао значајну инхибиторну активност према *hDNODN* ( $IC_{50} = 3,44 \mu M$ , Табела 9). Поред слабе ензимске инхибиције, на основу резултата приложених у Табели 10, може се закључити да овај дериват није испољио ни антитуморску активност према одабраним ћелијским линијама.

Према досадашњим литературним подацима, већина халкона који садрже метокси групе показују добру цитотоксичну активност према малигним ћелијским линијама, међу којима су и MCF-7, A549 и A375.<sup>159</sup> Увођење електрон-донорске метокси групе на бензенов прстен показало је да цитотоксична активност и ензимска инхибиција доста зависе од положаја метокси групе. Штавише, значајан пораст инхибиторне активности је примећен када се метокси група налази у *para* положају (**107г**) при чему је  $IC_{50} = 0,14 \mu M$ . Такође, **107г** је показао благу антитуморску активност према А375 ћелијама, ( $IC_{50} = 5,00 \mu M$ ). Са друге стране, аналози **107б-в** са метокси групом у *ortho* и *meta* положају показали су слабу инхибиторну активност, као и цитотоксичност. Најнижу цитотоксичност према здравим кератиноцитима човека показао аналог **107в** ( $IC_{50} > 300 \mu M$ ) код кога је метокси група у *meta* положају. Присуство више метокси група на крајњем бензеновом прстену није допринело бољој биолошкој активности, самим тим деривати **107д** (две метокси групе у *ortho* и *meta* положајима) и **107ћ** (две метокси групе у *meta* и *para* положајима) нису показали јаку инхибиторну активност ( $IC_{50} = 3,42 \mu M$  (**107д**) и  $5,68 \mu M$  (**107ћ**)). Такође, слаба цитотоксичност је забележена код ових једињења, посебно у случају **107ћ-е** (Табела 10). Увођењем халогена, као и у случају метокси група, је показало да је њихова позиција веома значајна за биолошку активност. Заправо, када се хлор налази у *ortho* и *meta* положају, инхибиторна активност се креће од веома добре до одличне,  $IC_{50} = 0,37 \mu M$  (**107ж**) и  $0,12 \mu M$  (**107з**). Оба ова аналога, заједно са **107г**, показали су бољу инхибиторну активност од референтног једињења Leflunomide-а. Додатно, резултати МТТ теста су показали да је преживљавање ћелија било смањено након третмана са **107ж** ( $IC_{50} = 6,8 \mu M$ ) у случају А375 ћелијске линије. Значајно смањење инхибиторне активности примећено је када је хлор на бензеновом прстену у *para* положају (**107и**), што овај дериват чини најслабијим инхибитором од свих испитиваних ( $IC_{50} = 10,51 \mu M$  према *hDNODN*). Имајући у виду велику разлику у инхибиторној активности између деривата код којих је присутна *para* супституција на крајњем ароматичном прстену, тестирана су додатна два једињења која садрже хидроксилну групу и бром у том положају. Насупрот **107и**, када Br заузме *para* положај (**107ј**) долази до јако повољног

утицаја на ензимску инхибицију при чему је  $IC_{50} = 0,13 \mu M$ . Очигледно је да поред природе супституената и положаја истих, интеракције са хидрофобним џепом ензима зависе и од величине атома. Присуство хидроксилне групе у *para* положају (**107к**) није допринело бољој инхибиторној, а ни цитотоксичној активности. Претпоставка је да је узрок слабе активности природа поларне хидроксилне групе која није у могућности да оствари хидрофобне интеракције са ензимом.

Поред деривата код којих је бензенев прстен везан за хинолински систем, у оквиру серије **В**, синтетизована су два додатна хинолин-халконска деривата који садрже нафталенску јединицу (**107л-љ**). У односу на **107а**, који садржи један бензенев прстен, увођење још једног бензеновог прстена је показало позитиван утицај на инхибиторну активност. Штавише, крута структура кондензованих бензенових прстена, као и њихова планарна конформација, допринеле су бољој ефикасности према *hDNODH*. Као што је приказано у Табели 9, оба ова деривата (**107л-љ**) показала су одличну ензимску инхибицију при чему су  $IC_{50}$  вредности  $0,12 \mu M$  (**107л**) и  $0,58 \mu M$  (**107љ**). Интересантно је напоменути да **107л** инхибира ензим истом јачином као и **107з**, показујући исту вредност  $IC_{50} = 0,12 \mu M$ . Најосетљивија ћелија у случају ових деривата је A375,  $IC_{50} = 12,5 \mu M$  (**107л**) и  $IC_{50} = 22,7 \mu M$  (**107з**).

#### 2.4.5. Студија липофилности и растворљивости једињења серије В

Поред инхибиторне и цитотоксичне активности, за све деривате серије **В** одређене су  $\log D_{7,4}$  вредности као и растворљивост на физиолошком  $pH = 7,4$  (Табела 11). На основу приложених резултата очигледно је да дериват са несупституисаним бензеновим прстеном (**107а**) није показао задовољавајући фармаколошки профил, док ни присуство метокси група (**107б-е**) није побољшало липофилне карактеристике, при чему су  $\log D_{7,4}$  вредности ових деривата негативне и крећу се у опсегу од  $-0,20$  до  $-0,56$ . Насупрот слабо израженим липофилним особинама, деривати који садрже метокси групе (**107д-е**) су показали најбољу растворљивост у фосфатном пуферу (*eng. phosphate buffered saline, PBS*). Самим тим, ови хинолин-халконски хибриди су показали бољу биодоступност од Вrequinar-а ( $80 \text{ mg/L}$ ) у истим условима, иако он поседује добре липофилне карактеристике при чему је  $\log D_{7,4} = 1,81$ , што је практично идентично вредности коју су објавили Sainas и сарадници у својој студији.<sup>160</sup> Сви остали хинолин-халконски хибриди, осим **107к**, показали су умерене до одличне липофилне особине,  $\log D_{7,4} = 0,34-1,80$ . Дериват **107ј**, који садржи *para* Br на крајњем бензеновом прстену, испољио је најбољи фармакокинетички профил ( $\log D_{7,4} = 1,80$ ), слично вредности Вrequinar-а, показавши притом и одличну инхибиторну активност ( $IC_{50} = 0,13 \mu M$ ). Поред овог једињења, **107ж-з** и **107л-љ** су такође испољили добре липофилне особине, као и добру инхибиторну активност.

**Табела 11.** Експериментално одређене  $\text{LogD}_{7,4}$  вредности и растворљивост у  $\text{mg/L}$  једињења **107а-љ**.

Једињење	$\text{logD}_{7,4} \pm \text{SD}$	Растворљивост ( $\text{mg/L}$ ) у $\text{PBS-у}^*$
<b>107а</b>	$-0,38 \pm 0,07$	97,41
<b>107б</b>	$-0,20 \pm 0,05$	43,77
<b>107в</b>	$-0,37 \pm 0,08$	27,44
<b>107г</b>	$-0,51 \pm 0,10$	18,96
<b>107д</b>	$-0,42 \pm 0,07$	169,13
<b>107ђ</b>	$-0,54 \pm 0,08$	130,52
<b>107е</b>	$-0,56 \pm 0,08$	148,71
<b>107ж</b>	$0,93 \pm 0,10$	75,28
<b>107з</b>	$0,34 \pm 0,07$	60,42
<b>107и</b>	$0,91 \pm 0,27$	19,64
<b>107ј</b>	$1,80 \pm 0,19$	28,96
<b>107к</b>	$-1,05 \pm 0,12$	40,95
<b>107л</b>	$0,36 \pm 0,06$	39,66
<b>107љ</b>	$1,04 \pm 0,13$	12,46
<b>Brequinar</b>	$1,81 \pm 0,05$	80,05

\*Мерења су извршена на  $25^\circ\text{C}$ .

На основу резултата у **Табелама 9** и **11**, може се закључити да је већина једињења са добрим инхибиторним активностима показала и добре липофилне особине, осим пар изузетака. Самим тим, као што је већ поменуто, липофилност и растворљивост само делимично могу утицати на биолошки профил једињења. Такође, може се закључити да су ове две карактеристике међусобно независне, што потврђује и слаба линеарна корелација. Оваква запажања су примећена и у другим литературним подацима где су вредности растворљивости и липофилности у слабој линеарној корелацији.<sup>161</sup>

#### 2.4.6. Молекулски докинг одабраног једињења серије **B**

У односу на две претходне серије, у случају серије **B** је додатно функционализован и положај  $\text{C3}$  хинолинског система. Штавише,  $\text{C3}$  карбонилни део који потиче од полазних арилалдехида остварује електростатичке интеракције са хидроксилном групом тирозина Thr360 и на тај начин остаци молекула долазе до хидрофобног џепа који је оивичен Tyr38, Leu42, Met43, Leu46, Leu58, и Phe62. У склопу овог џепа, *trans* оријентисана двострука веза халкона, која спаја главно језгро са ароматичним деловима молекула је одговорна за стварање стерних интеракција са Met43 и Leu46.

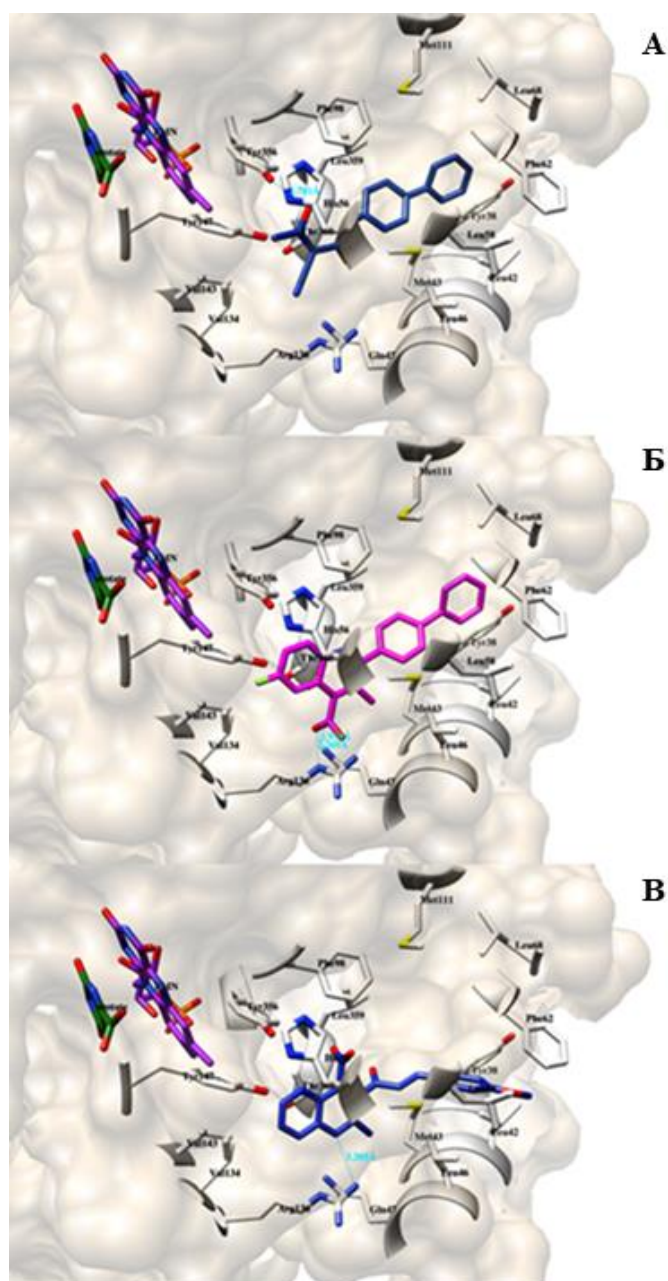
На **Слици 36** приказане су биоконформације лиганата преузетих из *Protein Data Bank* података; експериментално одређена кристална структура Leflunomide-а (тј. његовог активног метаболита ко-кристализованог у PDB ID: 3F1Q) (**Слика 36, А**) и структура Brequinar-а (PDB ID: 1D3G), (**Слика 36, Б**). Поред ових познатих биоконформација, на слици је приказана и структура једињења **107г** које је у оквиру ове серије показало најбољи фармаколошки профил (**Слика 36, В**). Сва једињења са слике заузела су уски тунел ензима унутар аминокраја протеина спречавајући тако

убихинону да се лако приближи FMN-у. Биоактивне конформације једињења су испуниле подлокацију 1 тунела, која је скоро искључиво формирана од  $\alpha$  хеликса састављених од хидрофобних остатака Leu42, Met43, Leu46, Gln47, Ala55, Leu58, Phe62, Leu85 и Leu68, као и редокс место и подместо формирано од Gln47, Arg136, Val134, Val143, Tyr356 и Thr360.

Дакле, биоактивна конформација лиганда пронађена у комплексу 3F1Q настала је као последица водоничних веза посредованих молекулом воде између нитрилног дела и Arg136 и Gln47, као и директне водоничне везе ( $d_{\text{HB}} = 2,781 \text{ \AA}$ ) између карбонилног дела и хидроксилне групе Tyr356 (Слика 36, А). Метил група једињења је остварила Van der Waals-ове интеракције са Val134 и Val143. Овај лиганд у хидрофобној шупљини остварује стерне интеракције са аминокиселинским остацима Tyr38, Leu42, Met43, Leu46, Leu58 и Phe62 који окружују хидрофобни расцеп.

Са друге стране, најважнији део Вреquinaг-ове структуре (Слика 36, Б) представља 6-флуоро-3-метил-4-хинолин карбоксилна киселина; карбоксилна група је остварила водоничне везе са бочним ланцима Gln47 ( $d_{\text{HB}} = 2,269 \text{ \AA}$ ) и Arg136 ( $d_{\text{HB}} = 2,954 \text{ \AA}$ ). Флуорохинолински прстен је електростатички привукао имидазолски прстен His56 и фенолни део Tyr47, индукујући диполне интеракције са Val134 и Val143, при чему је флуор на C6 атому позициониран тако да се приближава ка FMN-у. Метил група на C3 позицији хинолинског система стерно интерферира са бочним ланцима Met43 и Leu46. Продужетак главног језгра бифенилном групом је довео до сличног понашања као што је пронађено у комплексу 3F1Q.

Моносулституисани аналози који садрже метокси групу показали су велику разлику у инхибицији ензима што сугерише да положај метокси групе доводи до драстичних промена; аналог **107в** (OCH<sub>3</sub> заузима *мета* положај) је показао 13,79 пута слабију инхибиторну активност, што се може приписати немогућности овог деривата да оствари стерне интеракције са Leu42, Leu58 и Phe62. Увођењем метокси групе у *пара* положај бензеновог прстена (**107г**; IC<sub>50</sub> = 0,14  $\mu\text{M}$  према *hDHODH*) смањена је активност за 0,01 IC<sub>50</sub> јединицу у поређењу са **107ј** код кога је Br у *пара* положају (IC<sub>50</sub> = 0,13  $\mu\text{M}$  према *hDHODH*) и за 0,02 IC<sub>50</sub> јединицу у односу на **107з** где је Cl заузео *мета* позицију (IC<sub>50</sub> = 0,12  $\mu\text{M}$  према *hDHODH*) што се објашњава тенденцијом OCH<sub>3</sub> групе у *пара* положају да просторно мање интерферира са Phe62, а више са Leu42 и Leu58. Поред тога, изобутил групе Leu42 и Leu58 преферирају интеракције са електрон-акцепторским групама које садрже једињења **107з** и **107ј** што није случај са електрон-донорском групом присутној код **107г**. Ове чињенице потврђују и резултати ензимске инхибиције где су деривати **107ј** и **107з** показали мало израженију активност. Ипак, **107г** је дериват са најбољим фармаколошким профилем што је описано у студији изнад.



Слика 36. А) Биоактивна конформација Leflunomide-овог активног метаболита (PDB ID: 3F1Q); Б) Биоактивна конформација Brequinar-a (PDB ID: 1D3G); В) Биоактивна конформација 107г у активном месту ензима.



### ***3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО***





### 3.1. Физичка мерења

Тачке топљења свих синтетизованих деривата хинолин-4-карбоксилне киселине одређене су на Mel-Temp апарату, модел 1001 и нису кориговане. Елементарна анализа (C, H, N, S) једињења урађена је применом стандардних метода у Центру за Инструменталне анализе Хемијског факултета у Београду. Ултраљубичасти спектри снимљени су коришћењем Agilent Technologies UV-Vis спектрофотометра серије Cary 300. Инфрацрвени спектри снимљени су на Perkin Elmer Spectrum One FT-IR спектрофотометру са KBr диском. Сви  $^1\text{H}$  спектри нуклеарне магнетне резонанце снимани су на инструменту Varian Gemini на 200 MHz и Bruker Avance III 500 MHz, док су  $^{13}\text{C}$  NMR спектри снимљени на Varian Gemini на 50 MHz у деутерисаном диметил сулфоксиду (серије **A** и **B**) уз тетраметил силан као интерни стандард и деутерисаном пиридину (серија **B**). HPLC анализе урађене су на HPLC хроматографу (Shimadzu Prominence, Kyoto, Japan) са PDA детектором (SPD-M20A). Емисиона мерења извршена су на RF-1501 PC спектрофлуориметру (Shimadzu, Japan). Масени спектри високе резолуције (HESI) урађени су на Orbitrap Exploris 240 масеном спектрометру (Thermo Fisher) на Хемијском факултету у Београду при следећим условима: напон распршивања (V): 3500-4000; температура испаривача ( $^{\circ}\text{C}$ ): 65; брзина протока гаса у омотачу: 12; брзина протока помоћног гаса: 3; брзина протока гаса: 0; RF објектива (%): 35 -70; резолуција Orbitrap-а (на  $m/z$  200): 45000.

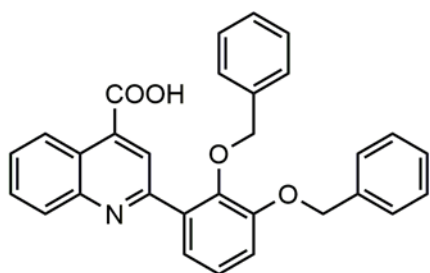
### 3.2. Поступак за синтезу једињења **99a-k**

Раствору алдехида **98a-g** (2,2 mmol) у DMF-у (5 mL) додат је  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,216 g, 8,8 mmol за **98a-b**; 0,608 g, 4,4 mmol за **98g**), а затим и одговарајући алкил халогенид (MeI, *n*-PrBr, *n*-BuBr, *i*-BuBr или  $\text{BnCl}$ ) (за **98a-b** 5,07 mmol, за **98g** 2,53 mmol).<sup>147</sup> Овако припремљена реакциона смеша је рефлукутована током 5 сати. Након тога, добијена суспензија је процеђена, талог одбачен, а филтрату је додато 25 mL воде. Додатком разблажене HCl (2 M) у филтрат, pH вредност је подешена на 4, при чему се у случају једињења **99a-g**, **99e** и **99j** формирао талог. Овако формирана суспензија је мешана на собној температури током сат времена, процеђена на Büchner-овом левку и талог испран са малом количином хладне воде након чега је сушен у ексикатору изнад анхидрованог  $\text{CaCl}_2$ . У случају једињења **99d**, **99h**, **99z** и **99и-к**, раствор је након закисељавања екстрахован етил ацетатом ( $2 \times 30$  mL) и органски слој осушен помоћу анхидрованог  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Након тога, растварач је упарен под сниженим притиском и добијена једињења **99d**, **99h**, **99z** и **99и-к** су осушена у ексикатору изнад анхидрованог  $\text{CaCl}_2$ . Алкиловани алдехиди **99h-j** и **99и-к** су пречишћени помоћу хроматографије на колони (стационарна фаза: силика гел, елуент: хлороформ), док су **99a-d** и **99z** добијени са задовољавајућом чистоћом и коришћени за следећи корак без даљег пречишћавања.

### 3.3. Поступак за синтезу једињења 100а-љ

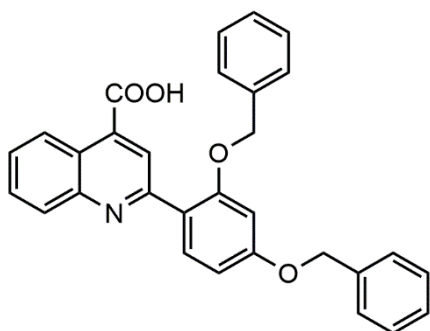
Смеса одговарајућег алдехида **98а**, **98г** и **99а-к** (1 mmol) и свеже дестиловане пирогрожђане киселине (0,132 g, 1,5 mmol) је у апсолутном етанолу (2 mL) рефлугована током 15 минута. После рефлукса, балон је охлађен до собне температуре, затим додат раствор анилина (0,093 g, 1 mmol) у апсолутном етанолу (1 mL), након чега је смеса рефлугована додатна 3 сата. Реакциони балон је преко ноћи остављен у фрижидеру (4°C), при чему се формирао талог финалних једињења **100а-љ**. Овако настали талог је процеђен, испран са малом количином хладног етанола и осушен у ексикатору изнад анхидрованог CaCl<sub>2</sub>. Сва једињења су добијена са задовољавајућом чистоћом, а да би се добили деривати веома високе чистоће, **100а-г**, **100ђ**, **100е**, **100з** и **100и-к** су подвргнути даљем пречишћавању растварањем у малој количини хлороформа са благим загревањем и поновним таложењем помоћу хексана. За разлику од наведених деривата, **100љ** је растворен у ацетону и поново сталожен на исти начин, док је **100ж** прекристалисан из 70%-ног воденог раствора етанола.

#### 3.3.1. 2-[2,3-Бис(бензилокси)фенил]хинолин-4-карбоксилна киселина (100а):



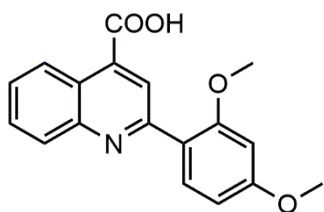
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,27 g (24%); Т.Т. 191-192 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3431, 1703, 1463, 1263, 1209, 1039, 754; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 4,93 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,27 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,14 (s, 5H, Ar-H), 7,25 (d, 1H, J = 8,4 Hz, Ar-H), 7,31-7,47 (m, 5H, Ar-H), 7,54-7,57 (m, 2H, Ar-H), 7,69-7,76 (m, 1H, Ar-H), 7,81-7,88 (m, 1H, Ar-H), 8,13 (d, 1H, J = 8,4 Hz, Ar-H), 8,39 (s, 1H, Ar-H), 8,73 (d, 1H, J = 8,4 Hz, Ar-H), 13,89 (bs, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 70,45, 74,92, 275,55, 122,67, 123,44, 123,84, 124,53, 125,46, 127,88 (4C), 127,98 (4C), 128,24 (2C), 128,49 (2C), 129,84 (2C), 134,07, 135,88, 136,91, 146,03, 148,46, 152,09, 155,83, 167,58; Израчунато за C<sub>30</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> (461,51 g/mol): C, 78,07; H, 5,02; N, 3,04; Нађено: C, 77,85; H, 4,99; N, 3,05.

#### 3.3.2. 2-[2,4-Бис(бензилокси)фенил]хинолин-4-карбоксилна киселина (100б):



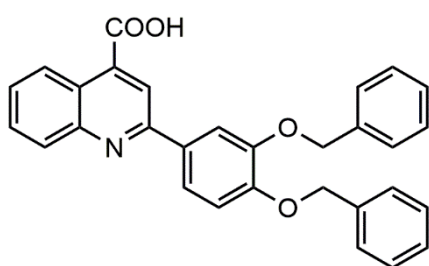
Жута прашкаста супстанца; принос: 0,24 g (51%); Т.Т. 231-232 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3432, 1702, 1604, 1507, 2787, 1002, 698; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 5,22 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5,27 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,84 (d, 1H, J = 8,6 Hz, Ar-H), 7,00 (s, 1H, Ar-H), 7,33-7,52 (m, 10H, Ar-H), 7,63-7,70 (m, 1H, Ar-H), 7,76-7,84 (m, 1H, Ar-H), 7,90 (d, 1H, J = 8,6 Hz, Ar-H), 8,27 (d, 1H, J = 8,2 Hz, Ar-H), 8,55 (s, 1H, Ar-H), 8,68 (d, 1H, J = 8,2 Hz, Ar-H), 13,78 (bs, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 69,72, 70,27, 100,97, 107,30, 121,12, 123,10, 124,05, 125,37, 127,38, 127,49 (2C), 127,82, 127,88 (2C), 128,00, 128,43 (2C), 128,53 (2C), 129,62, 129,71, 132,16, 135,35, 136,64, 136,86, 148,58, 155,64, 157,40, 160,92, 167,73; Израчунато за C<sub>30</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> (461,51 g/mol): C, 78,07; H, 5,02; N, 3,04; Нађено: C, 77,92; H, 5,00; N, 3,05.

## 3.3.3. 2-(2,4-Диметоксифенил)хинолин-4-карбоксилна киселина (100в):



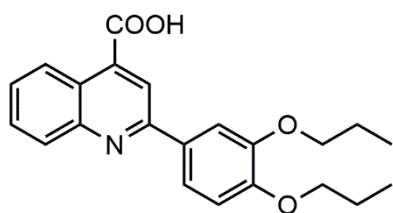
Светложута прашкаста супстанца; принос: 0,27 g (36%); Т.Т. 181-182 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3431, 1705, 1601, 1309, 1202, 1035, 821;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 3,86 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,90 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,73 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 6,75 (s, 1H, Ar-H), 7,63-7,71 (m, 1H, Ar-H), 7,77-7,90 (m, 2H, Ar-H), 8,27 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 8,39 (s, 1H, Ar-H), 8,67 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 13,84 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 55,58, 56,03, 98,89, 106,17, 120,52, 123,05, 123,78, 125,38, 127,33, 129,62, 129,69, 132,09, 135,48, 148,54, 155,72, 158,51, 161,96, 167,82; Израчунато за  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_4$  (309,32 g/mol): C, 69,89; H, 4,89; N, 4,53; Нађено: C, 69,61; H, 4,91; N, 4,52.

## 3.3.4. 2-[3,4-Бис(бензилокси)фенил]хинолин-4-карбоксилна киселина (100г):

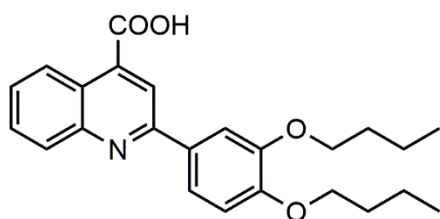


Жута прашкаста супстанца; принос: 0,18 g (38%); Т.Т. 174-175 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3432, 1713, 1599, 1267, 2741, 1023, 734;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 5,24 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 5,30 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,24 (d, 1H,  $J = 8,6$  Hz, Ar-H), 7,30-7,56 (m, 10H, Ar-H), 7,62-7,70 (m, 1H, Ar-H), 7,79-7,89 (m, 2H, Ar-H), 8,04 (s, 1H, Ar-H), 8,12 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 8,41 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 13,99 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 70,16, 70,55, 273,26, 274,32, 278,86, 120,84, 123,22, 125,44, 127,40, 127,62 (2C), 127,79 (2C), 127,90 (2C), 128,47 (4C), 129,66, 130,15, 131,10, 137,27, 137,35, 137,68, 148,36, 148,65, 150,25, 155,42, 167,79; Израчунато за  $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{NO}_4$  (461,51 g/mol): C, 78,07; H, 5,02; N, 3,04; Нађено: C, 78,13; H, 5,01; N, 3,03.

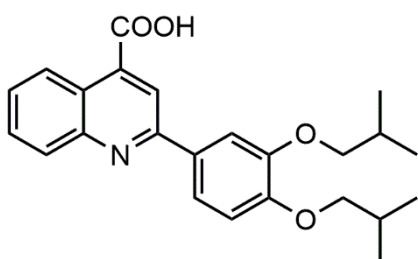
## 3.3.5. 2-(3,4-Дипропоксифенил)хинолин-4-карбоксилна киселина (100д):



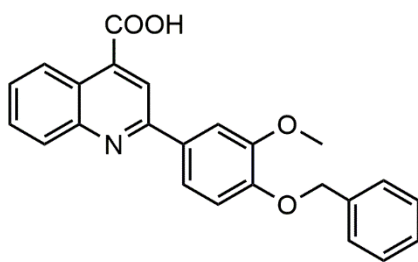
Жута прашкаста супстанца; принос: 0,27 g (30%); Т.Т. 134-135 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3431, 2964, 1710, 1599, 1272, 2743, 977;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 1,01 (t, 3H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,03 (t, 3H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,69-1,88 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4,02 (t, 2H,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 4,08 (t, 2H,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 7,12 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 7,62-7,70 (m, 1H, Ar-H), 7,78-7,90 (m, 3H, Ar-H), 8,13 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 8,42 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 13,97 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 10,54, 10,63, 22,30, 22,45, 69,94, 70,29, 272,51, 273,54, 278,80, 120,58, 123,15, 125,38, 127,28, 129,62, 130,07, 130,66, 137,54, 148,36, 148,88, 150,63, 155,54, 167,74; Израчунато за  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_4$  (365,42 g/mol): C, 72,31; H, 6,34; N, 3,83; Нађено: C, 72,18; H, 6,36; N, 3,82.

**3.3.6. 2-(3,4-Дибутоксифенил)хинолин-4-карбоксилна киселина (100ђ):**

Жута прашкаста супстанца; принос: 0,15 g (38%); mp 146-147 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3431, 2957, 1704, 1599, 1272, 2743, 856; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 0,95 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>3</sub>), 0,96 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,38-1,59 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,67-1,82 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,05 (t, 2H, *J* = 6,4 Hz, OCH<sub>2</sub>), 4,27 (t, 2H, *J* = 6,4 Hz, OCH<sub>2</sub>), 7,12 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz, Ar-H), 7,62-7,70 (m, 1H, Ar-H), 7,78-7,90 (m, 3H, Ar-H), 8,13 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 8,42 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 13,97 (bs, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 13,84 (2C), 18,90 (2C), 30,97, 31,10, 68,21, 68,54, 272,58, 273,58, 278,78, 120,58, 123,14, 125,36, 127,26, 129,61, 130,04, 130,68, 137,53, 148,35, 148,90, 150,67, 155,54, 167,71; Израчунато за C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub> (393,48 g/mol): C, 73,26; H, 6,92; N, 3,56; Нађено: C, 72,99; H, 6,94; N, 3,55.

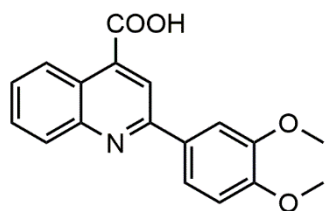
**3.3.7. 2-(3,4-Диизобутоксифенил)хинолин-4-карбоксилна киселина (100е):**

Жута прашкаста супстанца; принос: 0,17 g (42%); Т.Т. 160-161 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3439, 2958, 1716, 1598, 1272, 1025, 801; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 1,02 (d, 6H, *J* = 6,6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,04 (d, 6H, *J* = 6,6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,97-2,18 (m, 2H, CHCH<sub>3</sub>), 3,83 (d, 2H, *J* = 6,4 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3,90 (d, 2H, *J* = 6,4 Hz, OCH<sub>2</sub>), 7,27 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 7,62-7,70 (m, 1H, Ar-H), 7,78-7,88 (m, 3H, Ar-H), 8,13 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, Ar-H), 8,42 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, Ar-H), 13,97 (bs, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 19,14 (2C), 19,22 (2C), 28,09, 28,25, 74,63, 75,00, 272,44, 273,50, 278,78, 120,58, 123,15, 125,38, 127,28, 129,62, 130,08, 130,67, 137,60, 148,36, 149,05, 150,78, 155,56, 167,74; Израчунато за C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub> (393,48 g/mol): C, 73,26; H, 6,92; N, 3,56; Нађено: C, 73,53; H, 6,94; N, 3,57.

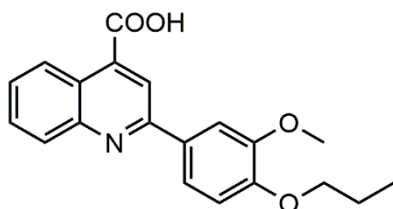
**3.3.8. 2-[4-(Бензилокси)-3-метоксифенил]хинолин-4-карбоксилна киселина × H<sub>2</sub>O (100ж):**

Жута прашкаста супстанца; принос: 0,10 g (25%); Т.Т. 182-183 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3438, 1708, 1600, 1373, 1272, 1024, 741; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3,93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5,20 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,22 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 7,32-7,52 (m, 5H, Ar-H), 7,62-7,70 (m, 1H, Ar-H), 7,79-7,93 (m, 3H, Ar-H), 8,14 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 8,44 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 13,98 (bs, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 55,90, 70,09, 270,72, 273,58, 278,83, 120,30, 123,19, 125,41, 127,33, 127,89 (2C), 127,95, 128,48 (2C), 129,64, 130,10, 131,01, 136,94, 137,65, 148,35, 149,54, 149,78, 155,51, 167,76; Израчунато за C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O (403,43 g/mol): C, 71,45; H, 5,25; N, 3,47; Нађено: C, 71,19; H, 5,23; N, 3,48.

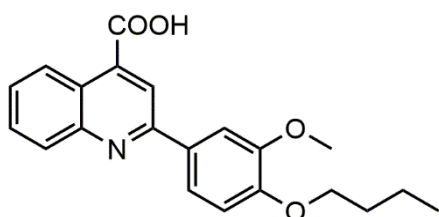
## 3.3.9. 2-(3,4-Диметоксифенил)хинолин-4-карбоксилна киселина (100з):



Жута прашкаста супстанца; принос: 0,08 g (26%); Т.Т. 235-236 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3438, 2936, 1704, 1594, 1254, 1019, 772;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 3,85 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,92 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,13 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz), 7,62-7,70 (m, 1H, Ar-H), 7,78-7,91 (m, 3H, Ar-H), 8,13 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 8,44 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 13,97 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 55,76, 55,79, 270,39, 271,87, 278,84, 120,39, 123,19, 125,42, 127,31, 129,64, 130,10, 130,64, 137,59, 148,37, 149,20, 150,79, 155,56, 167,78; Израчунато за  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_4$  (309,32 g/mol): C, 69,89; H, 4,89; N, 4,53; Нађено: C, 69,71; H, 4,88; N, 4,55.

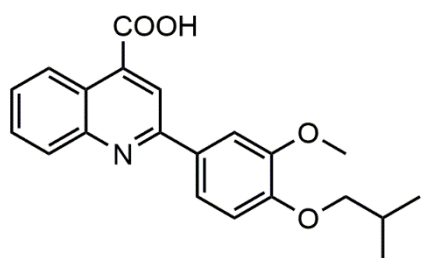
3.3.10. 2-(3-Метокси-4-пропоксифенил)хинолин-4-карбоксилна киселина  $\times \text{H}_2\text{O}$  (100и):

Жута прашкаста супстанца; принос: 0,16 g (44%); Т.Т. 175-176 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3439, 2965, 1715, 1600, 1270, 2744, 1026;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,00 (t, 3H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,69-1,87 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3,92 (s, 1H,  $\text{CH}_3$ ), 4,01 (t, 2H,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 7,27 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 7,62-7,69 (m, 1H, Ar-H), 7,78-7,91 (m, 3H, Ar-H), 8,13 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 8,43 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 13,65 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 10,56, 22,24, 55,87, 69,86, 270,67, 272,94, 278,73, 120,40, 123,14, 125,39, 127,25, 129,60, 130,06, 130,54, 137,70, 148,33, 149,35, 150,19, 155,54, 167,75; Израчунато за  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (355,38 g/mol): C, 67,59; H, 5,96; N, 3,94; Нађено: C, 67,35; H, 5,95; N, 3,95.

3.3.11. 2-(4-Бутокси-3-метоксифенил)хинолин-4-карбоксилна киселина  $\times 1,5\text{H}_2\text{O}$  (100ј):

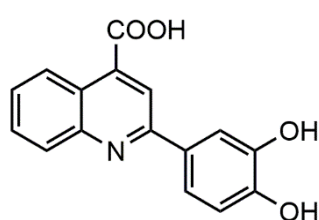
Наранџаста прашкаста супстанца; принос: 0,14 g (36%); mp 180-181 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3468, 2940, 1703, 1598, 1371, 1278, 1025;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 0,94 (t, 3H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,36-1,55 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1,67-1,80 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3,91 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,04 (t, 2H,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 7,27 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 7,62-7,69 (m, 1H, Ar-H), 7,78-7,90 (m, 3H, Ar-H), 8,13 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 8,43 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 13,93 (bs, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 13,84, 18,94, 30,98, 55,88, 68,08, 270,68, 272,89, 278,84, 120,41, 123,21, 125,42, 127,28, 129,64, 130,07, 130,56, 137,55, 148,40, 149,38, 150,25, 155,57, 167,78; Израчунато за  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4 \times 1,5\text{H}_2\text{O}$  (378,43 g/mol): C, 66,65; H, 6,39; N, 3,70; Нађено: C, 66,84; H, 6,37; N, 3,71.

## 3.3.12. 2-(4-Изобутокси-3-метоксифенил)хиолин-4-карбоксилна киселина (100к):

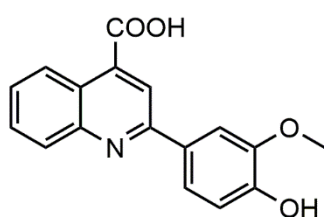


Жута прашкаста супстанца; принос: 0,10 g (29%); Т.Т. 184-185 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3439, 2959, 1722, 1600, 1255, 1022, 774;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 1,00 (*d*, 6H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,96-2,16 (*m*, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3,81 (*d*, 2H,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 3,92 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,10 (*d*, 1H,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 7,62-7,69 (*m*, 1H, Ar-H), 7,78-7,91 (*m*, 3H, Ar-H), 8,13 (*d*, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 8,43 (*s*, 1H, Ar-H), 8,60 (*d*, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 13,96 (*bs*, 1H,  $\text{COOH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 19,23 (2C), 27,96, 56,00, 74,66, 270,85, 273,04, 278,83, 120,45, 123,20, 125,42, 127,27, 129,64, 130,06, 130,58, 137,54, 148,39, 150,38, 155,55, 149,42, 167,77; Израчунато за  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_4$  (351,40 g/mol): C, 71,78; H, 6,02; N, 3,99; Нађено: C, 71,72; H, 6,03; N, 3,98.

## 3.3.13. 2-(3,4-Дихидроксифенил)хиолин-4-карбоксилна киселина (100л):



Наранџаста прашкаста супстанца; принос: 0,10 g (34%); Т.Т. > 250 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3289, 2620, 1644, 1586, 1339, 1220, 876;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 6,90 (*d*, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 7,57-7,67 (*m*, 2H, Ar-H), 7,76-7,84 (*m*, 2H, Ar-H), 8,07 (*d*, 1H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 8,32 (*s*, 1H, Ar-H), 8,62 (*d*, 1H,  $J = 8,0$  Hz, Ar-H), 9,30 (*bs*, 1H, OH), 9,43 (*bs*, 1H, OH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 274,53, 276,22, 278,97, 279,28, 123,29, 125,63, 127,24, 129,56, 129,66, 130,21, 137,30, 148,10, 146,05, 148,71, 156,09, 167,95; Израчунато за  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_4$  (281,26 g/mol): C, 68,32; H, 3,94; N, 4,98; Нађено: C, 68,17; H, 3,95; N, 4,96.

3.3.14. 2-(4-Хидрокси-3-метоксифенил)хиолин-4-карбоксилна киселина  $\times 1,5\text{H}_2\text{O}$  (100љ):

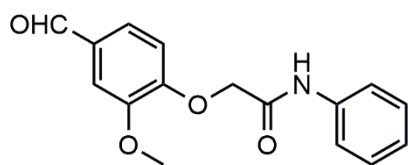
Браон прашкаста супстанца; принос: 0,27 g (35%); Т.Т. 233-234 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3438, 2624, 1715, 1564, 1390, 1031, 759;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 3,93 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6,95 (*d*, 1H,  $J = 8,2$  Hz, Ar-H), 7,60-7,68 (*m*, 1H, Ar-H), 7,74-7,89 (*m*, 3H, Ar-H), 8,27 (*d*, 1H,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 8,40 (*s*, 1H, Ar-H), 8,58 (*d*, 1H,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 9,57 (*s*, 1H, OH), 13,71 (*bs*, 1H,  $\text{COOH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 55,97, 271,01, 275,90, 278,74, 120,76, 123,08, 125,41, 127,12, 129,39, 129,56, 130,05, 137,56, 148,16, 148,40, 149,01, 155,82, 167,83; Израчунато за  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_4 \times 1,5\text{H}_2\text{O}$  (322,32 g/mol): C, 63,35; H, 5,00; N, 4,35; Нађено: C, 63,01; H, 5,01; N, 4,36.



### 3.4. Поступак за синтезу једињења 103а-р

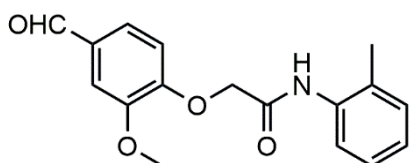
Воденом раствору NaOH-а (21,90 mmol у 3,8 mL дејонизоване H<sub>2</sub>O) додати су моноклорсирћетна киселина (10,94 mmol, 1 g) и ванилин (9,48 mmol, 1,442 g) и овако припремљена реакциона смеша рефлугована је 100 минута. Након тога, балон је охлађен до собне температуре, додато је 15 mL дејонизоване воде и раствор је закисељен са 2 M HCl до pH = 2, при чему се формирао талог беж боје. Суспензија је охлађена у фрижидеру током 2 сата, талог процеђен, испран малом количином хладне воде и осушен у ексикатору изнад CaCl<sub>2</sub>. Сиров производ је прекристалисан из топле дејонизоване воде, и након 2 сата у фрижидеру, формирали су се браон-жути кристали. Једињење **101** је процеђено, осушено изнад CaCl<sub>2</sub> и коришћено за даљу синтезу. У следећем кораку, у балону од 50 mL је смеси једињења **101** (2,86 mmol, 0,600 g) у анхидрованом метилен хлориду CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (14,30 mL), полако додаван тионил хлорид (28,57 mmol, 2,07 mL), а затим 4 капи DMF-а. Након 12 сати мешања на собној температури, растварач је упарен до сува под сниженим притиском, док је вишак SOCl<sub>2</sub> уклоњен азеотропном дестилацијом са толуеном. Формираном киселинском хлориду су, без претходног изоловања, додати одговарајући амини (2,86 mmol), NaHCO<sub>3</sub> (5,71 mmol, 0,479 g) и анхидровани CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (14,30 mL) и смеша је затим рефлугована додатна 4,5 сати. Након тога, растварач је поново упарен под сниженим притиском, остатку је додато 28,60 mL дејонизоване воде, а затим чврст Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> при чему је pH вредност подешена на 10. У случају једињења **103б**, **103з** и **103р**, формирана суспензија је била лепљива, самим тим остављена је преко ноћи на собној температури, следећег дана снажно мешана 20 минута и процеђена. У свим осталим случајевима, након додатка чврстог Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, суспензија је мешана 20 минута и одмах после тога процеђена. Осим **103м**, који је добијен са задовољавајућом чистоћом и коришћен за даљу синтезу без пречишћавања, сви остали деривати **103а-р** прекристалисани су из одговарајућег воденог раствора етанола и остављени преко ноћи у фрижидеру. Једињења **103а-е**, **103и**, **103к**, **103љ**, и **103о-р** су прекристалисана из 50%-ног воденог раствора EtOH-а, **103з** из 55%-ног, **103л** и **103н** из 60%-ног, док су **103ж** и **103ј** прекристалисани из 65%-ног EtOH-а.

#### 3.4.1. 2-(4-Формил-2-метоксифенокси)-N-фенилацетамид × 0,5 H<sub>2</sub>O (**103а**):



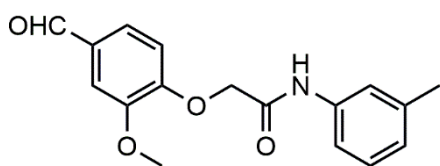
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,619g (76%); Т.Т. 148-149 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3437, 1680, 1601, 1561, 1278, 2735, 751; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,88 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,86 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,04-7,14 (*m*, 2H, Ar-H), 7,29-7,36 (*m*, 2H, Ar-H), 7,45 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 1,8 Hz), 7,52-7,63 (*m*, 3H, Ar-H), 9,85 (*s*, 1H, CHO), 10,20 (*s*, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 55,82, 67,88, 270,30, 272,95, 279,54 (2C), 123,80, 125,67, 128,90 (2C), 130,42, 138,45, 149,42, 152,88, 165,88, 191,39; Израчунато за C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub> × 0,5 H<sub>2</sub>O (294,29 g/mol): C, 65,30; H, 5,48; N, 4,76; Нађено: C, 65,54; H, 5,39; N, 4,78.

## 3.4.2. 2-(4-Формил-2-метоксифенокси)-N-(o-толил)ацетамид (103б):



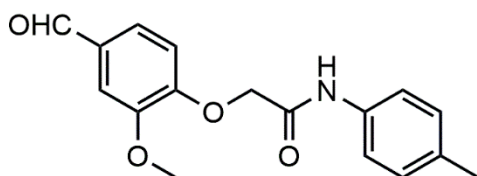
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,632g (74%); Т.Т. 133-134 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3438, 3396, 1685, 1596, 1507, 1278, 2735, 762;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 2,22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,89 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4,90 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,05-7,26 (m, 4H, Ar-H), 7,46 (d, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 7,55-7,60 (m, 2H, Ar-H), 9,44 (s, 1H, NH), 9,87 (s, 1H, CHO);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 17,66, 55,86, 67,75, 270,30, 273,04, 124,06, 125,34, 125,60, 126,20, 130,44, 130,51, 130,92, 135,57, 149,43, 152,57, 165,87, 191,49; Израчунато за  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_4$  (299,32 g/mol): C, 68,21; H, 5,72; N, 4,68; Нађено: C, 66,83; H, 5,46; N, 4,61.

## 3.4.3. 2-(4-Формил-2-метоксифенокси)-N-(m-толил)ацетамид (103в):

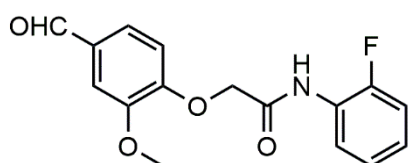


Беж прашкаста супстанца; принос: 0,538g (63%); Т.Т. 108-109 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3436, 3380, 1682, 1507, 1276, 2734, 1031, 733;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 2,27 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,88 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4,85 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,89 (d, 1H, Ar-H,  $J = 7,4$  Hz), 7,09-7,24 (m, 2H, Ar-H), 7,37-7,45 (m, 3H, Ar-H), 7,54 (dd, 1H, Ar-H,  $J = 8,3$  Hz и  $J = 1,9$  Hz), 9,85 (s, 1H, CHO), 10,12 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 21,33, 55,82, 67,90, 270,34, 272,97, 276,72, 120,05, 124,48, 125,64, 128,71, 130,42, 138,10, 138,36, 149,42, 152,89, 165,79, 191,34; Израчунато за  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_4$  (299,32 g/mol): C, 68,21; H, 5,72; N, 4,68; Нађено: C, 67,89; H, 5,54; N, 4,64.

## 3.4.4. 2-(4-Формил-2-метоксифенокси)-N-(p-толил)ацетамид (103г):



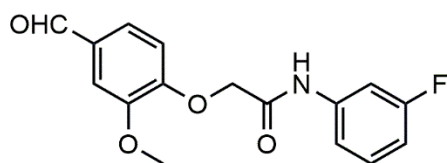
Браон прашкаста супстанца; принос: 0,572g (67%); Т.Т. 129-130 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3437, 3241, 1667, 1509, 1282, 2741, 1027, 813;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 2,25 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,87 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4,83 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,12 (m, 3H, Ar-H), 7,44-7,56 (m, 4H, Ar-H), 9,84 (s, 1H, CHO), 10,10 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 20,45, 55,78, 67,91, 270,31, 272,97, 279,51 (2C), 125,58, 129,20 (2C), 130,38, 132,71, 135,88, 149,39, 152,86, 165,56, 191,30; Израчунато за  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_4$  (299,32 g/mol): C, 68,22; H, 5,72; N, 4,68; Нађено: C, 67,81; H, 5,53; N, 4,68.

3.4.5. N-(2-Флуорофенил)-2-(4-формил-2-метоксифенокси)ацетамид  $\times$  0,5  $\text{H}_2\text{O}$  (103д):

Беж прашкаста супстанца; принос: 0,528g (61%); Т.Т. 130-131 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3381, 1701, 1657, 1545, 1278, 2734, 762;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 3,88 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4,94 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,13-7,85 (m, 4H, Ar-H), 7,45 (d, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 7,55 (dd, 1H,  $J = 8,2$  Hz и  $J = 1,8$  Hz), 7,90-7,98 (m, 1H, Ar-H), 9,86 (s, 1H, CHO), 9,91 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 55,86, 67,68, 270,36, 273,42, 275,58 ( $J_{\text{CF}} = 19,15$  Hz), 123,76 (C-F), 124,55 ( $J_{\text{CF}} = 3,55$  Hz), 125,40 (C-F), 125,57 (C-F), 125,76, 130,53, 149,42, 152,63, 153,53 ( $J_{\text{CF}} = 243,40$  Hz), 166,32, 191,27; Израчунато за  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{FNO}_4 \times 0,5 \text{H}_2\text{O}$  (312,28 g/mol): C, 61,54; H, 4,84; N, 4,49; Нађено: C, 61,70; H, 4,75; N, 4,53.

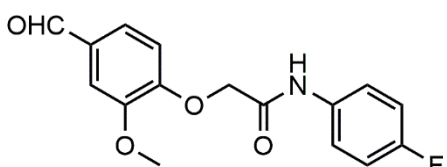


**3.4.6. *N*-(3-Флуорофенил)-2-(4-формил-2-метоксифенокси)ацетамид × 0,5 H<sub>2</sub>O (103ђ):**



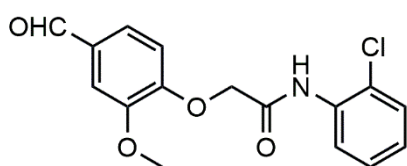
Браон прашкаста супстанца; принос: 0,641g (74%); Т.Т. 135-136 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3382, 3154, 1682, 1615, 1508, 1268, 2734, 853, 735; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,89 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,89 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,87-6,98 (*m*, 1H, Ar-H), 7,13 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,4 Hz), 7,35-7,40 (*m*, 2H, Ar-H), 7,44-7,46 (*m*, 1H, Ar-H), 7,53-7,65 (*m*, 2H, Ar-H), 9,86 (*s*, 1H, CHO), 10,46 (*s*, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 55,81, 67,83, 106,37 (*J*<sub>CF</sub> = 26,05 Hz), 270,03 (C-F), 270,40, 273,05, 275,29 (*J*<sub>CF</sub> = 2,20 Hz), 125,57, 130,48, 130,51 (*J*<sub>CF</sub> = 9,35 Hz), 140,14 (*J*<sub>CF</sub> = 27,10 Hz), 149,43, 152,79, 162,16 (*J*<sub>CF</sub> = 239,95 Hz), 166,29, 191,33; Израчунато за C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>4</sub> × 0,5 H<sub>2</sub>O (312,28 g/mol): C, 61,54; H, 4,84; N, 4,49; Нађено: C, 61,73; H, 4,76; N, 4,54.

**3.4.7. *N*-(4-Флуорофенил)-2-(4-формил-2-метоксифенокси)ацетамид × 0,5 H<sub>2</sub>O (103е):**



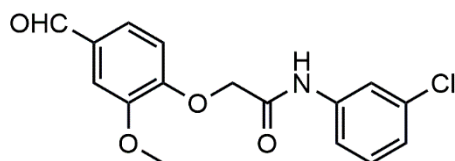
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,606g (70%); Т.Т. 139-140 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3346, 1686, 1508, 1285, 1031, 819; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,88 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,85 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,10-7,21 (*m*, 3H, Ar-H), 7,44 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 1,8 Hz), 7,54 (*dd*, 1H, Ar-H, *J* = 8,3 Hz и *J* = 1,9 Hz), 7,60-7,67 (*m*, 2H, Ar-H), 9,85 (*s*, 1H, CHO), 10,28 (*s*, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 55,78, 67,82, 270,29, 272,97, 275,43 (*J*<sub>CF</sub> = 22,15 Hz), 121,35 (*J*<sub>CF</sub> = 7,75 Hz), 125,61 (2C), 130,41, 134,81 (*J*<sub>CF</sub> = 2,55 Hz), 149,40, 152,61, 152,83, 158,27 (*J*<sub>CF</sub> = 238,50 Hz), 165,81, 191,35; Израчунато за C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>FNO<sub>4</sub> × 0,5 H<sub>2</sub>O (312,28 g/mol): C, 61,54; H, 4,84; N, 4,49; Нађено: C, 61,50; H, 4,74; N, 4,50.

**3.4.8. *N*-(2-Хлорофенил)-2-(4-формил-2-метоксифенокси)ацетамид × 0,5 H<sub>2</sub>O (103ж):**



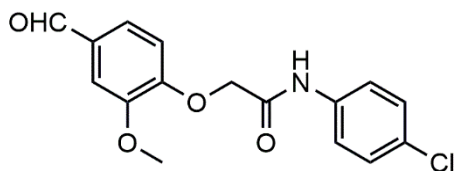
Розе прашкаста супстанца; принос: 0,638g (70%); Т.Т. 164-165 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3361, 1698, 1536, 1434, 1265, 2735, 1032, 733; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,90 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,94 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,17-7,25 (*m*, 2H, Ar-H), 7,33-7,42 (*m*, 1H, Ar-H), 7,47 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 1,8 Hz), 7,52-7,60 (*m*, 2H, Ar-H), 8,02 (*dd*, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz и *J* = 1,6 Hz), 9,64 (*s*, 1H, NH), 9,88 (*s*, 1H, CHO); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 55,90, 67,66, 270,28, 273,24, 123,87, 124,83, 125,57, 126,15, 127,81, 129,54, 130,69, 134,08, 149,41, 152,12, 166,19, 191,41; Израчунато за C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>4</sub> × 0,5 H<sub>2</sub>O (328,74 g/mol): C, 58,46; H, 4,60; N, 4,26; Нађено: C, 58,79; H, 4,46; N, 4,31.

**3.4.9. *N*-(3-Хлорофенил)-2-(4-формил-2-метоксифенокси)ацетамид × 0,5 H<sub>2</sub>O (103з):**



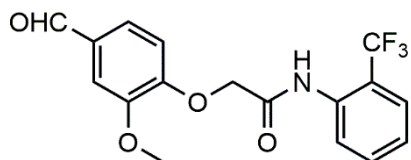
Жута прашкаста супстанца; принос: 0,710g (78%); Т.Т. 273-274 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3366, 1679, 1596, 1508, 1279, 2739, 1031, 676; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,88 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,89 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,27-7,18 (*m*, 2H, Ar-H), 7,36 (*m*, 1H, Ar-H), 7,45-7,57 (*m*, 3H, Ar-H), 7,83 (*t*, 1H, Ar-H, *J* = 2,0 Hz), 9,86 (*s*, 1H, CHO), 10,43 (*s*, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 55,79, 67,78, 270,37, 273,04, 277,91, 279,02, 123,44, 125,54, 130,46, 130,51, 133,16, 139,84, 149,40, 152,76, 166,30, 191,29; Израчунато за C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>4</sub> × 0,5 H<sub>2</sub>O (328,74 g/mol): C, 58,46; H, 4,60; N, 4,26; Нађено: C, 58,79; H, 4,53; N, 4,37.

**3.4.10. *N*-(4-Хлорофенил)-2-(4-формил-2-метоксифенокси)ацетамид × 0,5 H<sub>2</sub>O (103и):**



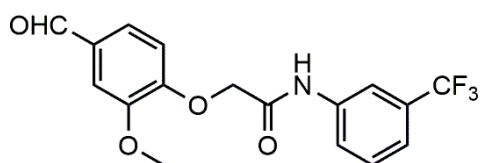
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,628g (69%); Т.Т. 135-136 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3389, 1683, 1589, 1507, 1277, 2737, 1028, 803; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,88 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,87 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,12 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,4 Hz), 7,36-7,46 (*m*, 3H, Ar-H), 7,54 (*dd*, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz и *J* = 1,8 Hz), 7,61-7,69 (*m*, 2H, Ar-H), 9,85 (*s*, 1H, CHO), 10,36 (*s*, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 55,78, 67,82, 270,31, 272,98, 121,07 (2C), 125,59, 127,35, 128,76 (2C), 130,42, 137,38, 149,39, 152,79, 166,05, 191,33; Израчунато за C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>4</sub> × 0,5 H<sub>2</sub>O (328,74 g/mol): C, 58,46; H, 4,60; N, 4,26; Нађено: C, 58,29; H, 4,44; N, 4,30.

**3.4.11. 2-(4-Формил-2-метоксифенокси)-*N*-[2-(трифлуорометил)фенил]ацетамид × 0,5 H<sub>2</sub>O (103ј):**



Бела прашкаста супстанца; принос: 0,735g (73%); Т.Т. 155-156 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3392, 3252, 1676, 1589, 1318, 2717, 770; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,88 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,91 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,17 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz), 7,41-7,49 (*m*, 2H, Ar-H), 7,57 (*dd*, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz и *J* = 1,8 Hz), 7,67-7,84 (*m*, 3H, Ar-H), 9,63 (*s*, 1H, NH), 9,87 (*s*, 1H, CHO); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 55,83, 67,49, 270,25, 273,12, 123,75 (*J*<sub>CF</sub> = 271,00 Hz), 122,69 (*J*<sub>CF</sub> = 28,95 Hz), 125,52, 126,36 (C-F), 126,46 (C-F), 127,59 (C-F), 133,31 (C-F), 130,70, 134,56 (C-F), 149,42, 152,15, 166,77, 191,43; Израчунато за C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>4</sub> × 0,5 H<sub>2</sub>O (362,29 g/mol): C, 56,36; H, 4,17; N, 3,87; Нађено: C, 56,04; H, 4,02; N, 3,90.

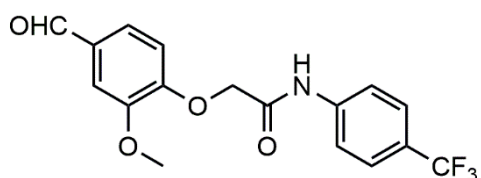
**3.4.12. 2-(4-Формил-2-метоксифенокси)-*N*-[3-(трифлуорометил)фенил]ацетамид × 0,5 H<sub>2</sub>O (103к):**



Светложута прашкаста супстанца; принос: 0,766g (76%); Т.Т. 120-121 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3387, 1690, 1590, 1545, 1338, 1271, 2717, 695; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,88 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,91 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,13 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz), 7,41-7,45 (*m*, 2H, Ar-H), 7,51-7,61 (*m*, 2H, Ar-H), 7,81 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8 Hz), 8,27 (*s*, 1H, Ar-H), 9,85

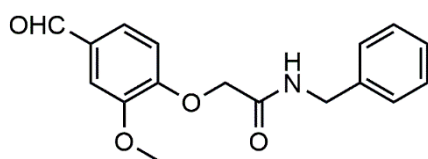
(*s*, 1H, CHO), 10,60 (*s*, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 55,80, 67,74, 270,37, 273,05, 275,61 ( $J_{\text{CF}} = 4,05$  Hz), 120,05 ( $J_{\text{CF}} = 3,55$  Hz), 123,08 (C-F), 124,09 ( $J_{\text{CF}} = 270,15$  Hz), 125,56, 129,57 ( $J_{\text{CF}} = 31,45$  Hz), 130,08, 130,47 (C-F), 139,21 (C-F), 149,41, 152,77, 166,57, 191,32; Израчунато за  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_4 \times 0,5 \text{H}_2\text{O}$  (362,29 g/mol): C, 56,36; H, 4,17; N, 3,87; Нађено: C, 56,40; H, 4,10; N, 3,93.

### 3.4.13. 2-(4-Формил-2-метоксифенокси)-*N*-[4-(трифлуорометил)фенил]ацетамид (103л):



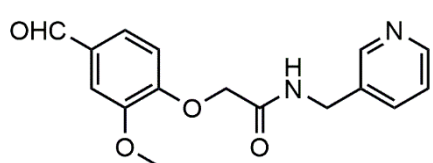
Бела прашкаста супстанца; принос: 0,736g (73%); Т.Т. 154-155 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3257, 1675, 1542, 1325, 2740, 1067, 841;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,88 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,91 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,13 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz), 7,45 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 7,54 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,3$  Hz и  $J = 1,9$  Hz), 7,69 (*d*, 2H, Ar-H,  $J = 8,8$  Hz), 7,83 (*d*, 2H, Ar-H,  $J = 8,6$  Hz), 9,85 (*s*, 1H, CHO), 10,60 (*s*, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 55,80, 67,77, 270,37, 273,02, 279,42 (2C, C-F), 123,15 ( $J_{\text{CF}} = 31,70$  Hz), 124,36 ( $J_{\text{CF}} = 269,60$  Hz), 125,56 (2C), 126,16 ( $J_{\text{CF}} = 3,47$  Hz), 130,46, 142,01 (C-F), 149,40, 152,76, 166,57, 191,33; Израчунато за  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_4$  (353,29 g/mol): C, 57,79; H, 3,99; N, 3,96; Нађено: C, 38,50; H, 2,67; N, 2,67.

### 3.4.14. *N*-Бензил-2-(4-формил-2-метоксифенокси)ацетамид (103љ):



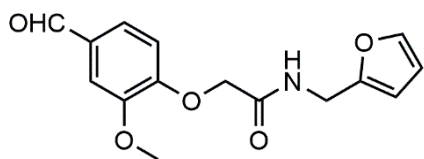
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,512g (60%); Т.Т. 105-106 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3423, 1678, 1590, 1514, 1274, 2723, 1028, 782;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,85 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,35 (*d*, 2H, NHCH<sub>2</sub>,  $J = 6,0$  Hz), 4,72 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,09 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8,4$  Hz), 7,19-7,37 (*m*, 5H, Ar-H), 7,44 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 7,53 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz и  $J = 1,8$  Hz), 8,56 (*t*, 1H, NH,  $J = 6,0$  Hz), 9,86 (*s*, 1H, CHO);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 42,27, 55,76, 67,87, 270,23, 273,15, 125,55, 126,91, 127,34 (2C), 128,32 (2C), 130,47, 139,13, 149,47, 152,74, 167,17, 191,38; Израчунато за  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_4$  (299,32 g/mol): C, 68,21; H, 5,72; N, 4,68; Нађено: C, 67,57; H, 5,32; N, 4,55.

### 3.4.15. 2-(4-Формил-2-метоксифенокси)-*N*-(пиридин-3-илметил)ацетамид (103м):

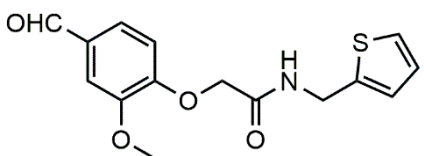


Бела прашкаста супстанца; принос: 0,583g (68%); Т.Т. 75-76 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3488, 3387, 3200, 1656, 1508, 1265, 2738, 732;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,85 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,35 (*d*, 2H, NHCH<sub>2</sub>,  $J = 6,0$  Hz), 4,72 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,08 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz), 7,31-7,38 (*m*, 1H<sub>пиридин</sub>), 7,44 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 1,6$  Hz), 7,52 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz и  $J = 1,8$  Hz), 7,64-7,68 (*m*, 1H<sub>пиридин</sub>), 8,44-8,50 (*m*, 2H<sub>пиридин</sub>), 8,68 (*t*, 1H, NH,  $J = 6,0$  Hz), 9,86 (*s*, 1H, CHO);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 39,91, 55,81, 67,86, 270,25, 273,14, 123,54, 125,63, 130,52, 134,75, 135,24, 148,23, 148,89, 149,50, 152,74, 167,52, 191,49; Израчунато за  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$  (300,31 g/mol): C, 63,99; H, 5,37; N, 9,33; Нађено: C, 54,48; H, 5,53; N, 7,87.

## 3.4.16. 2-(4-Формил-2-метоксифенокси)-N-(фуран-2-илметил)ацетамид (103н):

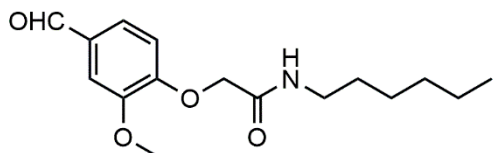


Браон прашкаста супстанца; принос: 0,347g (42%); Т.Т. 80-81 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3272, 1682, 1654, 1508, 1263, 2736, 1030, 735;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,86 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,34 (d, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ,  $J = 5,8$  Hz), 4,68 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,25 (dd, 1H<sub>фуран</sub>  $J = 3,2$  Hz и  $J = 0,8$  Hz), 6,40 (m, 1H<sub>фуран</sub>), 7,07 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,4$ ), 7,43 (d, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 7,53 (dd, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz и  $J = 1,8$  Hz), 7,59 (m, 1H<sub>фуран</sub>), 8,52 (t, 1H, NH,  $J = 5,8$  Hz), 9,85 (s, 1H, CHO);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 35,51, 55,77, 67,75, 107,03, 270,29, 270,52, 273,16, 125,50, 130,47, 142,16, 149,45, 151,90, 152,73, 167,04, 191,34; Израчунато за  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_5$  (289,28 g/mol): C, 62,28; H, 5,23; N, 4,84; Нађено: C, 62,19; H, 5,25; N, 4,79.

3.4.17. 2-(4-Формил-2-метоксифенокси)-N-(тиофен-2-илметил)ацетамид  $\times 0,5 \text{H}_2\text{O}$  (103њ):

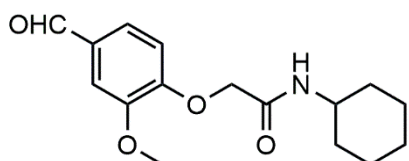
Бела прашкаста супстанца; принос: 0,636g (73%); Т.Т. 123-124 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3274, 1660, 1506, 1257, 2736, 1026, 704;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,85 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,50 (d, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ,  $J = 6,0$  Hz), 4,69 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,93-6,99 (m, 2H<sub>тиофен</sub>), 7,06 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz), 7,39-7,44 (m, 2H, Ar-H и H<sub>тиофен</sub>), 7,52 (dd, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz и  $J = 1,8$  Hz), 8,68 (t, 1H, NH,  $J = 6,0$  Hz), 9,85 (s, 1H, CHO);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 37,22, 55,78, 67,72, 270,20, 273,10, 125,24, 125,60, 125,73, 126,74, 130,46, 141,99, 149,45, 152,72, 167,06, 191,43; Израчунато за  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S} \times 0,5 \text{H}_2\text{O}$  (314,35 g/mol): C, 57,31; H, 5,13; N, 4,46; S, 10,20; Нађено: C, 56,87; H, 5,39; N, 4,47; S, 10,47.

## 3.4.18. 2-(4-Формил-2-метоксифенокси)-N-хексилацетамид (103о):



Бела прашкаста супстанца; принос: 0,485g (58%); Т.Т. 76-77 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3291, 2934, 1653, 1549, 1284, 2740, 1027, 737; ;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 0,85 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $J = 6,5$  Hz), 1,23-1,44 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 3,12 (q, 2H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $J = 6,4$  Hz), 3,86 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4,61 (s, 2H,  $-\text{OCH}_2-\text{CO}-$ ), 7,05 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz), 7,43 (d, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 7,53 (dd, 1H, Ar-H,  $J = 8,3$  Hz и  $J = 1,9$  Hz), 7,99 (t, 1H, NH,  $J = 5,5$  Hz), 9,85 (s, 1H, CHO);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 13,99, 22,16, 26,10, 29,07, 31,06, 38,46, 55,76, 67,91, 270,27, 273,08, 125,47, 130,42, 149,43, 152,75, 166,79, 191,28; Израчунато за  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_4$  (293,36 g/mol): C, 65,51; H, 7,90; N, 4,77; Нађено: C, 65,07; H, 7,63; N, 4,73.

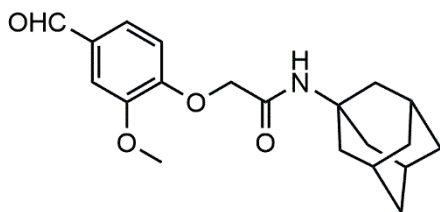
## 3.4.19. N-Циклохексил-2-(4-формил-2-метоксифенокси)ацетамид (103п):



Бела прашкаста супстанца; принос: 0,482g (58%); Т.Т. 137-138 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3418, 2933, 1683, 1508, 1265, 2748, 1034, 810;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1,02-1,75 (m, 10H<sub>ЦИКЛОХЕКСИЛ</sub>), 3,57 (m, 1H<sub>ЦИКЛОХЕКСИЛ</sub>), 3,86 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,60 (s, 2H,  $-\text{OCH}_2-$ ), 7,05 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz), 7,43 (d, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 7,53 (dd, 1H, Ar-H,  $J = 8,3$  Hz и  $J = 1,9$  Hz), 7,88 (d, 1H, NH,  $J = 8$  Hz), 9,85 (s, 1H, CHO);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,

DMSO- $d_6$ ): 24,53 (2C), 25,25, 32,31 (2C), 47,50, 55,77, 67,89, 270,27, 273,16, 125,50, 130,37, 149,40, 152,83, 165,89, 191,28; Израчунато за C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> (291,34 g/mol): C, 65,96; H, 7,27; N, 4,81; Нађено: C, 62,64; H, 6,76; N, 4,43.

### 3.4.20. *N*-[(1*s*,3*s*)-Адамантан-1-ил]-2-(4-формил-2-метоксифенокси)ацетамид (103*p*):

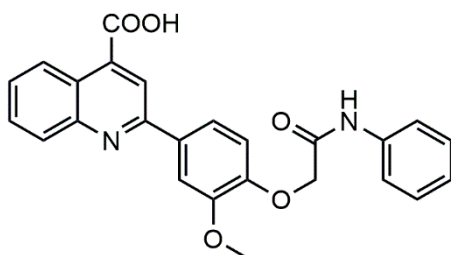


Светложута прашкаста супстанца; принос: 0,470g (48%); Т.Т. 137-138 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3382, 2912, 1683, 1590, 1276, 2764, 1039, 810; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1,62 (s, 6H<sub>адамантан</sub>), 1,95-2,02 (m, 9H<sub>адамантан</sub>), 3,86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,55 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,07 (d, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz), 7,41-7,43 (m, 2H, Ar-H, NH), 7,54 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz и *J* = 1,8 Hz), 9,85 (s, 1H, CHO); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 28,94 (3C), 36,04 (3C), 41,06 (3C), 51,10, 55,82, 67,86, 270,25, 273,13, 125,57, 130,34, 149,35, 152,76, 165,88, 191,29; Израчунато за C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> (343,42 g/mol): C, 69,95; H, 7,34; N, 4,08; Нађено: C, 67,56; H, 6,81; N, 3,88.

## 3.5. Поступак за синтезу једињења 104а-*p*

Смеса одговарајућег деривата **103а-*p*** (1 mmol) и свеже дестиловане пирогрожђане киселине (1,5 mmol, 0,132 g) у апсолутном етанолу (5,8 mL, осим **103ж**) је рефлугована током 15 минута. Услед слабе растворљивости полазног деривата **103ж**, у случају синтезе једињења **104ж** додато је 10,40 mL етанола. Након што је балон охлађен до собне температуре, додат је раствор анилина (1 mmol, 0,093 g) у апсолутном етанолу (1 mL) и смеша рефлугована додатна 3 сата (10 сати за **104ж**). Затим је реакциони балон остављен у фрижидеру на 4° C преко ноћи, при чему се формирао талог финалних деривата **104а-*p***, који је сутрадан процеђен и осушен у ексикатору. Како би се добила једињења високе чистоће, сви деривати **104а-*p*** (осим **104н**) пречишћени су прекристализацијом из етанола, док је **104н** прекристалисан из тетраhydroфурана (THF). С обзиром да су деривати **104п-*p*** након прекристализације из етанола инкорпорисали растварач, растворени су у малој количини THF-а, након чега је раствор упарен до сува под сниженим притиском, а суви остатак сушен на собној температури 3-5 дана.

### 3.5.1. 2-{3-Метокси-4-[2-оксо-2-(фениламино)етокси]фенил}хинолин-4-карбоксилна киселина (104а):

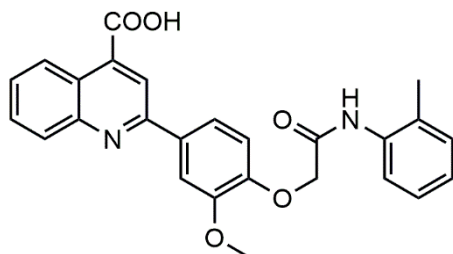


Светложута прашкаста супстанца; принос: 0,146g (34%); Т.Т. 205-206 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3299, 2959, 1707, 1657, 1596, 1424, 1227, 1034, 866, 761; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,81 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,05-7,15 (m, 2H, Ar-H), 7,30-7,38 (m, 2H, Ar-H), 7,62-7,72 (m, 3H, Ar-H), 7,80-7,90 (m, 2H, Ar-H), 7,96 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 8,17 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,4 Hz и *J* = 0,6 Hz), 8,45 (s, 1H, Ar-H), 8,60 (dd, 1H, Ar-H, *J* = 8,4 Hz и *J* = 1 Hz), 10,17 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 56,05, 68,52, 271,08, 274,32, 278,89, 279,64 (2C), 120,34, 123,24, 123,76, 125,41, 127,44, 128,84 (2C), 129,69, 130,15, 131,90, 137,71, 138,45,



148,36, 149,41, 149,60, 155,45, 166,40, 167,72; Израчунао за  $C_{25}H_{20}N_2O_5$  (428,44 g/mol): C, 70,08; H, 4,71; N, 6,54; Нађено: C, 71,77; H, 4,86; N, 6,68.

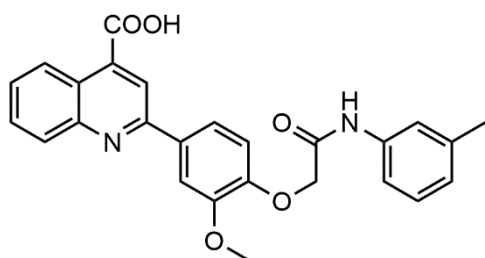
### 3.5.2. 2-{3-Метокси-4-[2-оксо-2-(*o*-толиламино)етокси]фенил}хинолин-4-карбоксилна киселина (104б):



Беж прашкаста супстанца; принос: 0,126g (28%); Т.Т. 246-247 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3446, 3372, 2921, 1719, 1644, 1598, 1519, 1245, 756;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,98 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,84 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,05-7,25 (m, 4H, Ar-H), 7,57-7,71 (m, 2H, Ar-H), 7,79-7,91 (m, 2H, Ar-H), 7,97 (d, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 8,15 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,0$  Hz), 8,46 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz), 9,42 (s, 1H, NH),

14,03 (bs, 1H, COOH);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 17,57, 56,03, 68,22, 270,96, 274,16, 278,83, 120,27, 123,21, 123,91, 125,24, 125,37, 126,18, 127,41, 129,65, 130,12, 130,39, 130,75, 131,91, 135,60, 137,71, 148,32, 149,09, 149,51, 155,38, 166,31, 167,68; Израчунао за  $C_{26}H_{22}N_2O_5$  (442,46 g/mol): C, 70,58; H, 5,01; N, 6,33; Нађено: C, 70,42; H, 5,01; N, 6,35.

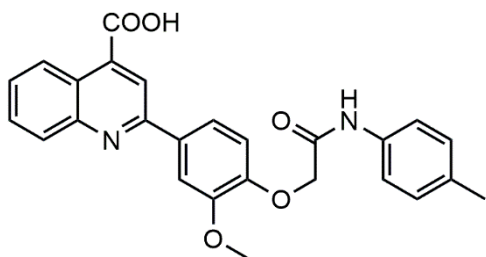
### 3.5.3. 2-{3-Метокси-4-[2-оксо-2-(*m*-толиламино)етокси]фенил}хинолин-4-карбоксилна киселина (104в):



Жута прашкаста супстанца; принос: 0,133g (30%); Т.Т. 225-226 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3384, 2921, 2599, 1717, 1643, 1561, 1520, 1421, 1237, 776; ;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,98 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,80 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,90 (d, 1H, Ar-H,  $J = 7,4$  Hz), 7,27 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,6$  Hz), 7,21 (t, 1H, Ar-H,  $J = 7,8$  Hz), 7,40-7,48 (m, 2H, Ar-H), 7,62-7,71 (m, 1H, Ar-H), 7,78-7,88 (m, 2H, Ar-H), 7,96 (d,

1H, Ar-H,  $J = 2$  Hz), 8,14 (dd, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz и  $J = 0,6$  Hz), 8,45 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (dd, 1H, Ar-H,  $J = 8,5$  Hz и  $J = 1,0$  Hz), 10,08 (s, 1H, NH), 13,99 (bs, 1H, COOH);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 21,25, 55,99, 68,45, 271,02, 274,23, 276,74, 278,82, 120,08, 120,27, 123,18, 124,39, 125,34, 127,37, 128,61, 129,62, 130,07, 131,81, 137,63, 138,00, 138,29, 148,29, 149,35, 149,53, 155,38, 166,25, 167,65; Израчунао за  $C_{26}H_{22}N_2O_5$  (442,46 g/mol): C, 70,58; H, 5,01; N, 6,33; Нађено: C, 70,25; H, 4,94; N, 6,37.

### 3.5.4. 2-{3-Метокси-4-[2-оксо-2-(*p*-толиламино)етокси]фенил}хинолин-4-карбоксилна киселина × H<sub>2</sub>O (104г):

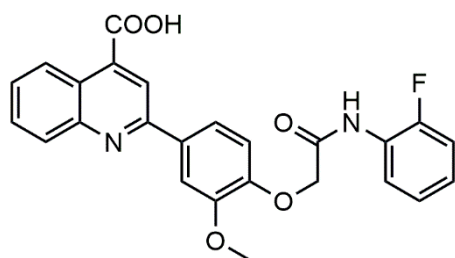


Беж прашкаста супстанца; принос: 0,150g (34%); Т.Т. 224-225 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3372, 2921, 2527, 1707, 1640, 1549, 1349, 1269, 2727, 1036, 808;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 2,26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,97 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,78 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,13 (m, 3H, Ar-H), 7,52 (d, 2H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz), 7,62-7,71 (m, 1H, Ar-H), 7,78-7,88 (m, 2H, Ar-H), 7,96 (d, 1H,

Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 8,14 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz), 8,44 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz), 10,06 (s, 1H, NH), 14,00 (bs, 1H, COOH);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 20,53,

55,97, 68,49, 270,99, 274,27, 278,80, 279,58 (2C), 120,26, 123,18, 125,34, 127,35, 129,14 (2C), 129,61, 130,06, 131,82, 132,66, 135,84, 137,67, 148,29, 149,35, 149,53, 155,37, 166,07, 167,65; Израчунато за  $C_{26}H_{22}N_2O_5 \times H_2O$  (460,48 g/mol): C, 67,82; H, 5,25; N, 6,08; Нађено: C, 68,18; H, 5,20; N, 6,15.

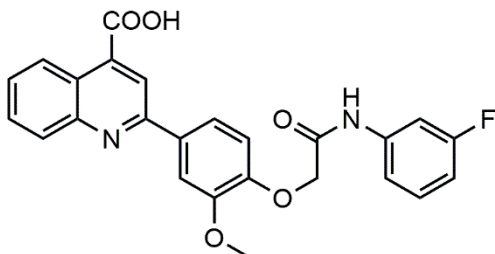
**3.5.5. 2-{4-[2-[(2-Флуорофенил)амин]-2-оксоетокси]-3-метоксифенил}хинолин-4-карбоксилна киселина  $\times 1,5 H_2O$  (104d):**



Беж прашкаста супстанца; принос: 0,192g (43%); Т.Т. 248-249 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3372, 2922, 1714, 1622, 1556, 1519, 1266, 1207, 1036, 749;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,98 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,89 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,13-7,36 (*m*, 4H, Ar-H), 7,63-7,71 (*m*, 1H, Ar-H), 7,79-7,90 (*m*, 2H, Ar-H), 7,93-8,02 (*m*, 2H, Ar-H), 8,14 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 7,8$  Hz), 8,46 (*s*, 1H, Ar-H), 8,60 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 7,8$  Hz), 9,86 (*s*, 1H, NH), 13,74 (*bs*, 1H, COOH);

$^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 56,05, 68,33, 271,05, 274,48, 275,51 ( $J_{CF} = 19,15$  Hz), 278,88, 120,30, 123,26, 123,69 (C-F), 124,51 ( $J_{CF} = 3,45$  Hz), 125,41 ( $J_{CF} = 1,2$  Hz), 125,52 (C-F), 125,66, 127,38, 129,65, 130,07, 132,09, 137,69, 148,35, 149,14, 149,58, 153,51 ( $J_{CF} = 243,15$  Hz), 155,38, 166,78, 167,70; Израчунато за  $C_{25}H_{19}FN_2O_5 \times 1,5 H_2O$  (473,46 g/mol): C, 63,42; H, 4,68; N, 5,92; Нађено: C, 63,21; H, 4,57; N, 5,91.

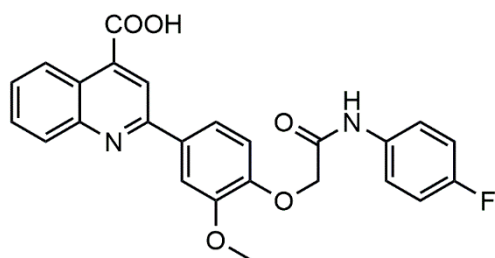
**3.5.6. 2-{4-[2-[(3-Флуорофенил)амино]-2-оксоетокси]-3-метоксифенил}хинолин-4-карбоксилна киселина  $\times 0,5 H_2O$  (104h):**



Наранџаста прашкаста супстанца; принос: 0,134g (30%); Т.Т. 237-238 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3437, 3394, 1699, 1605, 1548, 1425, 1262, 773, 680;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,98 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,83 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,88-6,98 (*m*, 1H, Ar-H), 7,13 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8,4$  Hz), 7,36-7,41 (*m*, 2H, Ar-H), 7,60-7,72 (*m*, 2H, Ar-H), 7,80-7,89 (*m*, 2H, Ar-H), 7,97 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 2$  Hz), 8,15 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz и  $J = 0,6$  Hz), 8,45 (*s*, 1H, Ar-H), 8,60 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,4$  Hz и  $J = 1$  Hz), 10,40 (*s*, 1H, NH), 13,99 (*bs*, 1H, COOH);

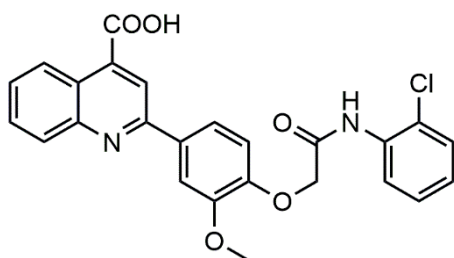
$^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 56,00, 68,47, 106,46 ( $J_{CF} = 26,05$  Hz), 270,21 ( $J_{CF} = 20,95$  Hz), 271,09, 274,37, 275,37 ( $J_{CF} = 1,75$  Hz), 278,86, 120,29, 123,26, 125,41, 127,37, 129,65, 130,08, 130,44 ( $J_{CF} = 9,4$  Hz), 131,99, 137,77, 140,14 ( $J_{CF} = 10,95$  Hz), 148,34, 149,29, 149,59, 155,40, 162,15 ( $J_{CF} = 239,9$  Hz), 166,82, 167,72; Израчунато за  $C_{25}H_{19}FN_2O_5 \times 0,5 H_2O$  (455,44 g/mol): C, 65,93; H, 4,43; N, 6,15; Нађено: C, 65,71; H, 4,35; N, 6,15.

**3.5.7. 2-{4-[2-[(4-Флуорофенил)амино]-2-оксоетокси]-3-метоксифенил}хинолин-4-карбоксилна киселина × 0,5 H<sub>2</sub>O (104e):**



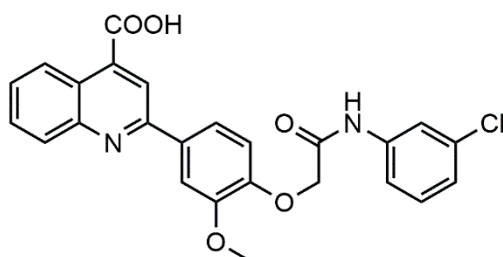
Светложута прашкаста супстанца; принос: 0,174g (39%); Т.Т. 212-213 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3065, 2600, 1705, 1663, 1548, 1508, 1424, 1209, 813; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,99 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,81 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,12-7,25 (*m*, 3H, Ar-H), 7,65-7,72 (*m*, 3H, Ar-H), 7,80-7,90 (*m*, 2H, Ar-H), 7,98 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 1,8 Hz), 8,15 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8 Hz), 8,46 (*s*, 1H, Ar-H), 8,61 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 7,8 Hz), 10,24 (*s*, 1H, NH), 14,00 (*bs*, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 55,98, 68,51, 271,07, 274,39, 275,31 (*J*<sub>CF</sub> = 22,15 Hz), 278,81, 120,26, 121,46 (*J*<sub>CF</sub> = 7,8 Hz), 123,19, 125,34 (2C), 127,33, 129,60, 130,03 (2C), 131,93, 134,73 (*J*<sub>CF</sub> = 2,55 Hz), 137,65, 148,29, 149,31, 149,58, 155,36, 158,27 (*J*<sub>CF</sub> = 238,8 Hz), 166,31, 167,63; Израчунато за C<sub>25</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> × 0,5 H<sub>2</sub>O (455,44 g/mol): C, 65,93; H, 4,43; N, 6,15; Нађено: C, 66,10; H, 4,40; N, 6,18.

**3.5.8. 2-{4-[2-[(2-Хлорофенил)амино]-2-оксоетокси]-3-метоксифенил}хинолин-4-карбоксилна киселина × 0,5 H<sub>2</sub>O (104ж):**



Наранџаста прашкаста супстанца; принос: 0,264g (57%); Т.Т. 226-227 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3455, 3361, 1700, 1595, 1540, 1518, 1271, 1032, 750; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 4,00 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,90 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,17-7,26 (*m*, 2H, Ar-H), 7,39 (*td*, 1H, Ar-H, *J* = 7,7 Hz и *J* = 1,4 Hz), 7,56 (*dd*, 1H, Ar-H, *J* = 7,9 Hz и *J* = 1,5 Hz), 7,64-7,72 (*m*, 1H, Ar-H), 7,80-7,92 (*m*, 2H, Ar-H), 7,99 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 2 Hz), 8,08 (*dd*, 1H, Ar-H, *J* = 8,1 Hz и *J* = 1,5 Hz), 8,16 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 7,8 Hz), 8,48 (*s*, 1H, Ar-H), 8,61 (*dd*, 1H, Ar-H, *J* = 8,4 Hz и *J* = 0,8 Hz), 9,63 (*s*, 1H, NH), 14,00 (*bs*, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 56,02, 68,27, 270,87, 274,27, 278,87, 120,24, 123,27, 123,46, 124,50, 125,41, 125,94, 127,40, 127,79, 129,47, 129,66, 130,08, 132,17, 134,27, 137,74, 148,33, 148,64, 149,48, 155,33, 166,59, 167,73; Израчунато за C<sub>25</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> × 0,5 H<sub>2</sub>O (471,89 g/mol): C, 63,63; H, 4,27; N, 5,94; Нађено: C, 63,39; H, 4,42; N, 5,93.

**3.5.9. 2-{4-[2-[(3-Хлорофенил)амино]-2-оксоетокси]-3-метоксифенил}хинолин-4-карбоксилна киселина × 0,5 H<sub>2</sub>O (104з):**

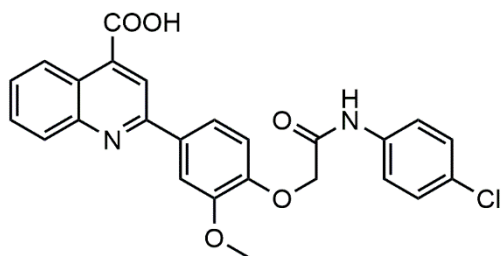


Браон прашкаста супстанца; принос: 0,148g (32%); Т.Т. 248-249 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3391, 1699, 1594, 1519, 1422, 1252, 774; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,99 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,85 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,27-7,18 (*m*, 2H, Ar-H), 7,38 (*t*, 1H, Ar-H, *J* = 8 Hz), 7,55 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz), 7,68 (*t*, 1H, Ar-H, *J* = 7,4 Hz), 7,81-7,88 (*m*, 3H, Ar-H), 7,98 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 1,4 Hz), 8,16 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz), 8,47 (*s*, 1H, Ar-H), 8,62 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,2 Hz), 10,41 (*s*, 1H, NH), 14,06 (*bs*, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 55,99, 68,45, 271,10, 274,39, 278,00, 278,82, 279,13, 120,26, 123,22, 123,42, 125,37, 127,34, 129,62, 130,04, 130,43, 131,97, 133,14, 137,71, 139,84, 148,31, 149,27, 149,58, 155,37, 166,82, 167,67; Израчунато за



$C_{25}H_{19}ClN_2O_5 \times 0,5 H_2O$  (471,89 g/mol): C, 63,63; H, 4,27; N, 5,94; Нађено: C, 63,62; H, 4,26; N, 5,96.

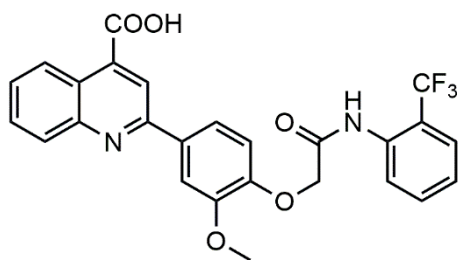
**3.5.10. 2-{4-[2-[(4-Хлорофенил)амино]-2-оксоетокси]-3-метоксифенил}хинолин-4-карбоксилна киселина  $\times 0,5 H_2O$  (104и):**



Беж прашкаста супстанца; принос: 0,167g (36%); Т.Т. 229-230 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3300, 3065, 1707, 1668, 1595, 1539, 1227, 802;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,14 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,4$  Hz), 7,39-7,45 (m, 2H, Ar-H), 7,64-7,73 (m, 3H, Ar-H), 7,80-7,90 (m, 2H, Ar-H), 7,98 (d, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 8,16 (d, 1H, Ar-H,  $J = 7,8$  Hz), 8,47 (s, 1H, Ar-H), 8,60 (dd, 1H,

Ar-H,  $J = 8,4$  Hz и  $J = 0,8$  Hz), 10,35 (s, 1H, NH), 13,96 (bs, 1H, COOH);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 55,98, 68,47, 271,03, 274,31, 278,90, 120,28, 121,19 (2C), 123,25, 125,40, 127,39 (2C), 128,71 (2C), 129,65, 130,09, 131,93, 137,38, 137,63, 148,34, 149,31, 149,57, 155,40, 166,60, 167,70; Израчунато за  $C_{25}H_{19}ClN_2O_5 \times 0,5 H_2O$  (471,89 g/mol): C, 63,63; H, 4,27; N, 5,94; Нађено: C, 63,68; H, 4,30; N, 5,96.

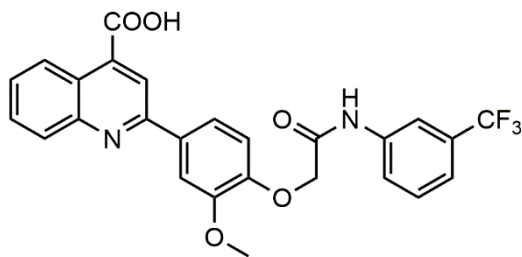
**3.5.11. 2-{3-Метокси-4-[2-оксо-2-[[2-(трифлуорометил)фенил]амино]етокси]фенил}хинолин-4-карбоксилна киселина  $\times 0,5 H_2O$  (104ј):**



Жута прашкаста супстанца; принос: 0,149g (30%); Т.Т. 227-228 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3465, 3405, 2917, 1693, 1594, 1517, 1293, 2778, 1035, 757;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,87 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,17 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,6$  Hz), 7,45 (t, 1H, Ar-H,  $J = 7,6$  Hz), 7,63-7,68 (m, 1H, Ar-H), 7,71-7,84 (m, 3H, Ar-H), 7,87-7,91 (m, 2H, Ar-H), 7,98 (d, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 8,15 (d, 1H, Ar-H,  $J = 7,8$  Hz), 8,47 (s,

1H, Ar-H), 8,60 (dd, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$  Hz и  $J = 0,8$  Hz), 9,60 (s, 1H, NH), 13,99 (bs, 1H, COOH);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 55,95, 67,91, 270,82, 274,13, 278,91, 120,192, 122,83 ( $J_{CF} = 29,02$  Hz), 123,28, 124,61 ( $J_{CF} = 271,25$  Hz), 125,42, 126,27(C-F), 126,38 ( $J_{CF} = 3,2$  Hz), 127,09 (C-F), 127,43, 129,69, 130,27, 132,12, 133,28 (C-F), 134,65 ( $J_{CF} = 1,7$  Hz), 137,70, 148,35, 148,68, 149,49, 155,36, 167,15, 167,75; Израчунато за  $C_{26}H_{19}F_3N_2O_5 \times 0,5 H_2O$  (505,45 g/mol): C, 61,78; H, 3,99; N, 5,54; Нађено: C, 61,68; H, 3,98; N, 5,57.

**3.5.12. 2-{3-Метокси-4-[2-оксо-2-[[3-(трифлуорометил)фенил]амино]етокси]фенил}хинолин-4-карбоксилна киселина  $\times 0,5 H_2O$  (104к):**

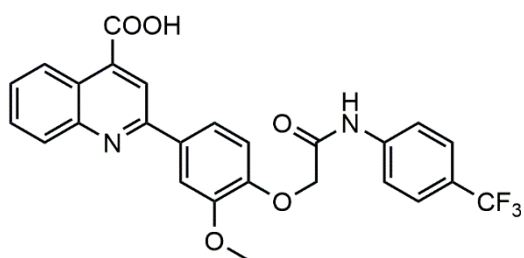


Жута прашкаста супстанца; принос: 0,208g (42%); Т.Т. > 250 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3379, 2939, 2624, 1702, 1549, 1335, 1251, 2717, 799;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 3,98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,85 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,13 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,4$  Hz), 7,42-7,46 (m, 1H, Ar-H), 7,55-7,71 (m, 2H, Ar-H), 7,79-7,88 (m, 3H, Ar-H), 7,96 (d, 1H,

Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 8,12-8,16 (m, 2H, Ar-H), 8,45 (s, 1H, Ar-H), 8,60 (d, 1H, Ar-H,  $J = 8,2$

Hz), 10,55 (*s*, 1H, Ar-H), 14,00 (*bs*, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 55,85, 68,41, 271,10, 274,40, 275,71 ( $J_{\text{CF}} = 3,40$  Hz), 278,78, 279,97 ( $J_{\text{CF}} = 3,25$  Hz), 120,25, 123,19 (2C, C-F), 124,05 ( $J_{\text{CF}} = 270,05$  Hz), 125,34, 127,33, 129,55 ( $J_{\text{CF}} = 31,32$  Hz), 129,60, 129,99 (2C, C-F), 131,97, 137,71, 139,17 (C-F), 148,29, 149,26, 149,58, 155,35, 167,04, 167,64; Израчунато за  $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5 \times 0,5 \text{ H}_2\text{O}$  (505,45 g/mol): C, 61,78; H, 3,99; N, 5,54; Нађено: C, 61,54; H, 3,95; N, 5,50.

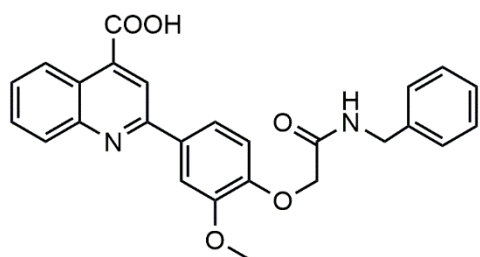
**3.5.13. 2-{3-Метокси-4-{2-оксо-2-[[4-(трифлуорометил)фенил]амино]етокси}фенил}хинолин-4-карбоксилна киселина  $\times 1,5 \text{ H}_2\text{O}$  (104л):**



Беж прашкаста супстанца; принос: 0,169g (34%); Т.Т. 227-212 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3393, 2499, 1701, 1603, 1543, 1523, 1331, 1272, 2713, 841;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,98 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,86 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,12 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8,4$  Hz), 7,63-7,73(*m*, 3H, Ar-H), 7,79-7,89 (*m*, 4H, Ar-H), 7,96 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 2$  Hz), 8,14 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,4$  Hz и  $J = 0,6$  Hz),

8,44 (*s*, 1H, Ar-H), 8,60 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,5$  Hz и  $J = 0,9$  Hz), 10,56 (*s*, 1H, NH), 13,79 (*bs*, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 56,00, 68,47, 271,13, 274,41, 278,86, 279,54 (2C, C-F), 120,28, 123,25, 123,84 ( $J_{\text{CF}} = 31,72$  Hz), 124,35 ( $J_{\text{CF}} = 269,65$  Hz), 125,40 (2C), 126,08 ( $J_{\text{CF}} = 3,32$  Hz), 127,36, 129,64, 130,06, 132,02, 137,71, 142,00 (C-F), 148,34, 149,28, 149,60, 155,39, 167,10, 167,70; Израчунато за  $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5 \times 1,5 \text{ H}_2\text{O}$  (523,47 g/mol): C, 59,66; H, 4,24; N, 5,35; Нађено: C, 59,97; H, 4,27; N, 5,36.

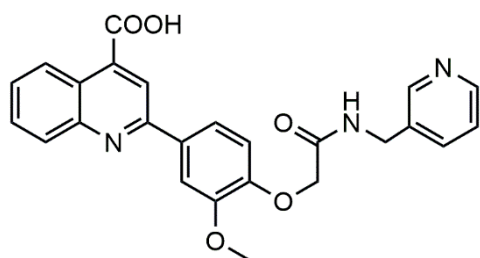
**3.5.14. 2-{4-[2-(Бензиламино)-2-оксоетокси]-3-метоксифенил}хинолин-4-карбоксилна киселина (104љ):**



Беж прашкаста супстанца; принос: 0,150g (34%); Т.Т. 199-200 °C; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3390, 2923, 1703, 1636, 1518, 1422, 1245, 1214, 1031, 809;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,95 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,38 (*d*, 2H, -NHCH<sub>2</sub>,  $J = 6,0$  Hz), 4,69 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,42 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8,6$  Hz), 7,24-7,35 (*m*, 5H, Ar-H), 7,64-7,73 (*m*, 1H, Ar-H), 7,81-7,88 (*m*, 2H, Ar-H), 7,96 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 2$  Hz), 8,16 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,3$  Hz и

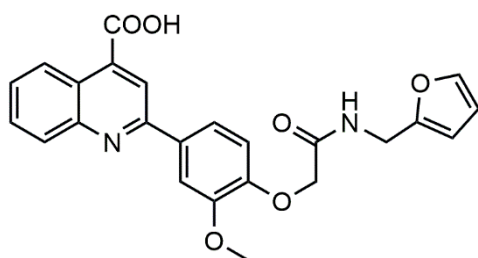
$J = 0,5$  Hz), 8,47 (*s*, 1H, Ar-H), 8,58 (*t*, 1H, NH,  $J = 6,0$  Hz), 8,62 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,5$  Hz и  $J = 0,9$  Hz) 13,98 (*bs*, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 42,13, 55,96, 68,54, 271,04, 274,64, 278,87, 120,25, 123,23, 125,38, 126,87 (2C), 127,34 (2C), 127,42, 128,30 (2C), 129,66, 130,12, 132,01, 137,69, 139,16, 148,34, 149,29, 149,65, 155,42, 167,70; Израчунато за  $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$  (442,46 g/mol): C, 70,58; H, 5,01; N, 6,33; Нађено: C, 70,37; H, 5,00; N, 6,29.

**3.5.15. 2-{3-Метокси-4-{2-оксо-2-[(пиридин-3-илметил)амино]етокси}фенил}хинолин-4-карбоксилна киселина × H<sub>2</sub>O (104м):**



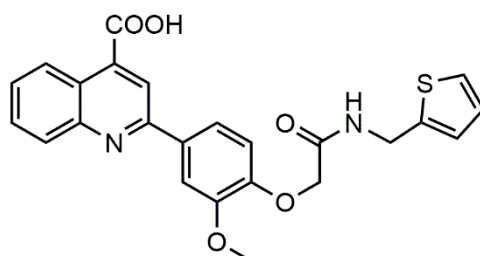
Браон прашкаста супстанца; принос: 0,226g (51%); Т.Т. 215-216 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3357, 2930, 1680, 1588, 1516, 1424, 1250, 2772, 1029, 797; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,95 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,41 (*d*, 2H, NHCH<sub>2</sub>, *J* = 5,8 Hz), 4,69 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,10 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,4 Hz), 7,34-7,40 (*m*, 1H<sub>пиридин</sub>), 7,65-7,72 (*m*, 2H, Ar-H и H<sub>пиридин</sub>), 7,81-7,88 (*m*, 2H, Ar-H), 7,96 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 1,4 Hz), 8,16 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8 Hz), 8,46 (*s*, 1H, Ar-H), 8,53-8,71 (*m*, 4H, NH, Ar-H, 2H<sub>пиридин</sub>); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 39,88, 55,96, 68,52, 271,06, 274,63, 278,83, 120,23, 123,24 (2C), 125,40, 127,40, 129,65, 130,27, 132,06, 135,25 (2C), 137,83, 148,04, 148,33, 148,76, 149,23, 149,65, 155,40, 167,73, 167,98; Израчунато за C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> × H<sub>2</sub>O (461,47 g/mol): C, 65,07; H, 5,02; N, 9,27; Нађено: C, 65,44; H, 4,85; N, 9,05.

**3.5.16. 2-{4-{2-[(Фуран-2-илметил)амино]-2-оксоетокси}-3-метоксифенил}хинолин-4-карбоксилна киселина × H<sub>2</sub>O (104н):**



Беж прашкаста супстанца; принос: 0,238g (55%); Т.Т. 229-230 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3444, 2936, 1705, 1630, 1590, 1517, 1427, 1256, 2750, 780; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,94 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,36 (*d*, 2H, NHCH<sub>2</sub>, *J* = 5,8 Hz), 4,64 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,26 (*d*, 1H<sub>фуран</sub>, *J* = 2,8 Hz), 6,40 (*dd*, 1H<sub>фуран</sub>, *J* = 3,1 Hz и *J* = 1,9 Hz), 7,08 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,4 Hz), 7,59-7,71 (*m*, 2H, Ar-H и H<sub>фуран</sub>), 7,81-7,87 (*m*, 2H, Ar-H), 7,94 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 1,8 Hz), 8,14 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8 Hz), 8,44 (*s*, 1H, Ar-H), 8,49 (*t*, 1H, NH, *J* = 5,8 Hz), 8,59 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8 Hz), 13,87 (*bs*, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 35,49, 55,95, 68,36, 106,95, 270,48, 270,99, 274,56, 278,81, 120,22, 123,18, 125,34, 127,38, 129,62, 130,09, 131,95, 137,69, 142,09, 148,29, 149,25, 149,59, 151,94, 155,38, 167,53, 167,65; Израчунато за C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> × H<sub>2</sub>O (450,45 g/mol): C, 64,47; H, 4,81; N, 6,18; Нађено: C, 63,99; H, 4,92; N, 6,22.

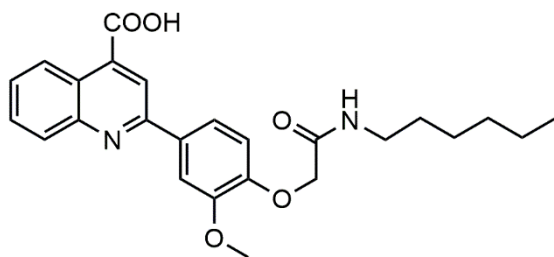
**3.5.17. 2-{3-Метокси-4-{2-оксо-2-[(тиофен-2-илметил)амино]етокси}фенил}хинолин-4-карбоксилна киселина × 0,5 H<sub>2</sub>O (104њ):**



Браон прашкаста супстанца; принос: 0,233 (52%); Т.Т. 206-207 °C; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3346, 2935, 1700, 1632, 1587, 1516, 1255, 1212, 2746, 696; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 3,95 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,54 (*d*, 2H, NHCH<sub>2</sub>, *J* = 5,8 Hz), 4,65 (*s*, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,95-7,02 (*m*, 2H<sub>тиофен</sub>), 7,08 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,6 Hz), 7,41 (*dd*, 1H<sub>тиофен</sub>, *J* = 4,9 Hz и *J* = 1,5 Hz), 7,64-7,72 (*m*, 1H, Ar-H), 7,82-7,87 (*m*, 2H, Ar-H), 7,95 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 2 Hz), 8,15 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 7,8 Hz), 8,46 (*s*, 1H, Ar-H), 8,61 (*dd*, 1H, Ar-H, *J* = 8,4 Hz и *J* = 0,8 Hz), 8,67 (*t*, 1H, NH, *J* = 5,8 Hz), 14,00 (*bs*, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 37,17, 55,91, 68,38, 270,98, 274,55, 278,82, 120,19, 123,21, 125,06, 125,37, 125,60, 126,65, 127,36, 129,62, 130,05, 131,97, 137,70, 141,98, 148,30,

149,23, 149,59, 155,36, 167,51, 167,68; Израчунато за  $C_{24}H_{20}N_2O_5S \times 0,5 H_2O$  (457,50 g/mol): C, 63,01; H, 4,63; N, 6,12; S, 7,01; Нађено: C, 63,31; H, 4,61; N, 6,27; S, 7,13.

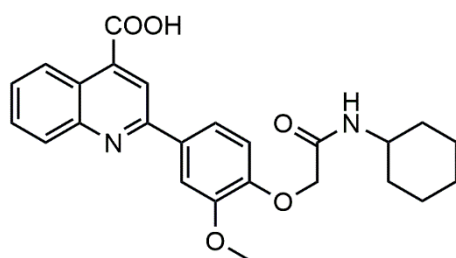
**3.5.18. 2-{4-[2-(Хексиламино)-2-оксоетокси]-3-метоксифенил}хинолин-4-карбоксилна киселина (104o):**



Бела прашкаста супстанца; принос: 0,157g (36%); Т.Т. 179-180 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3422, 2931, 1712, 1647, 1549, 1519, 1247, 1036, 798;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 0,84 (*t*, 3H,  $CH_3$ ,  $J = 6,3$  Hz), 1,23-1,46 (*m*, 8H,  $CH_2$ ), 3,14 (*q*, 2H,  $-NH-CH_2-CH_2-$ ,  $J = 6,5$  Hz), 3,97 (*s*, 3H,  $OCH_3$ ), 4,58 (*s*, 2H,  $-OCH_2-CO-$ ), 7,08 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8,6$  Hz), 7,67-7,72 (*m*, 1H,

Ar-H), 7,83-7,88 (*m*, 2H, Ar-H), 7,96 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 7,99 (*t*, 1H, NH,  $J = 6,0$  Hz), 8,15 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 7,8$  Hz), 8,46 (*s*, 1H, Ar-H), 8,61 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 7,8$  Hz), 14,01 (*bs*, 1H, COOH);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 13,92, 22,13, 26,10, 29,10, 31,06, 38,45, 55,93, 68,50, 270,95, 274,44, 278,82, 120,20, 123,22, 125,36, 127,33, 129,61, 130,02, 131,90, 137,59, 148,32, 149,27, 149,58, 155,35, 167,31, 167,65; Израчунато за  $C_{25}H_{28}N_2O_5$  (436,50 g/mol): C, 68,79; H, 6,47; N, 6,42; Нађено: C, 69,08; H, 6,46; N, 6,51.

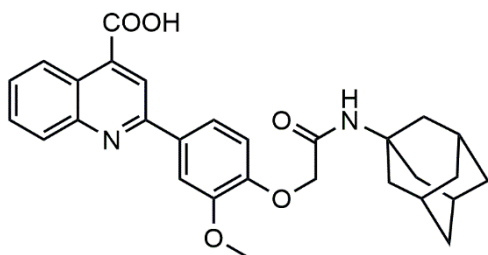
**3.5.19. 2-{4-[2-(Циклохексиламино)-2-оксоетокси]-3-метоксифенил}хинолин-4-карбоксилна киселина (104n):**



Жута прашкаста супстанца; принос: 0,252g (58%); Т.Т. 230-231 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3443, 3267, 2934, 1704, 1655, 1518, 1252, 774;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1,19-1,76 (*m*, 10H<sub>циклохексил</sub>), 3,59 (*m*, 1H<sub>циклохексил</sub>), 3,96 (*s*, 3H,  $CH_3$ ), 4,56 (*s*, 2H,  $-OCH_2-$ ), 7,07 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8,6$  Hz), 7,62-7,70 (*m*, 1H, Ar-H), 7,78-7,86 (*m*, 3H, Ar-H), 7,94 (*d*, 1H, NH,  $J = 1,8$  Hz), 8,14 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8$  Hz), 8,44 (*s*, 1H, Ar-H), 8,59

(*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8$  Hz), 13,09 (*bs*, 1H, COOH);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 24,59 (2C), 25,28, 32,37 (2C), 47,47, 55,95, 68,51, 270,87, 274,51, 278,81, 120,26, 123,23, 125,41, 127,38, 129,64, 130,10, 131,86, 137,85, 148,31, 149,35, 149,55, 155,38, 166,46, 167,75; Израчунато за  $C_{25}H_{26}N_2O_5$  (434,48 g/mol): C, 69,27; H, 6,03; N, 6,45; Нађено: C, 72,42; H, 6,25; N, 6,67.

**3.5.20. 2-{4-[2-[(1s,3s)-Адамантан-1-иламино]-2-оксоетокси]-3-метоксифенил}хинолин-4-карбоксилна киселина  $\times H_2O$  (104p):**



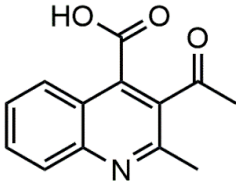
Бела прашкаста супстанца; принос: 0,180g (37%); Т.Т. 226-227 °C; IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3443, 3389, 2908, 1625, 1549, 1515, 1255, 2743, 778;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1,63 (*s*, 6H, Ad), 1,97-2,02 (*m*, 9H<sub>адамантан</sub>), 3,96 (*s*, 3H,  $CH_3$ ), 4,51 (*s*, 2H,  $CH_2$ ), 7,09 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8,6$  Hz), 7,35 (*s*, 1H, NH), 7,63-7,71(*m*, 1H, Ar-H), 7,79-7,88 (*m*, 2H, Ar-H), 7,94 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 1,8$  Hz), 8,14 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8$  Hz), 8,45 (*s*, 1H, Ar-H), 8,59 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,4$  Hz и  $J = 1$  Hz), 13,98 (*bs*, 1H,

COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 28,98 (3C), 36,06 (3C), 41,13 (3C), 51,06, 56,00, 68,50, 270,87, 274,44, 278,86, 120,31, 123,25, 125,41, 127,39, 129,65, 130,10, 131,82, 137,73, 148,34, 149,28, 149,47, 155,39, 166,47, 167,73; Израчунато за  $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5 \times \text{H}_2\text{O}$  (504,58 g/mol): C, 69,03; H, 6,39; N, 5,55; Нађено: C, 69,60; H, 6,24; N, 5,56.

### 3.6. Поступак за синтезу једињења 105

Воденом раствору KOH (13,40 mmol, 0,750 g у 10 mL дејонизоване  $\text{H}_2\text{O}$ ) додат је изатин (3 mmol, 0,441 g) након чега је реакциона смеша мешана на собној температури 30 минута. Затим је рН раствора подешен на 2 додатком 6M HCl што је примећено физичком променом боје раствора из жуте у бледо наранџасту. Након закисељавања, додат је ацетилацетон (6 mmol, 0,6 mL) и смеша је мешана на собној температури још додатних сат времена. Неколико минута након додатка карбонилног једињења, формирао се жути талог. Након завршетка, суспензија је остављена преко ноћи у фрижидеру на  $4^\circ\text{C}$ , талог је сутрадан процеђен, испран са малом количином хладне воде и осушен у ексикатору изнад  $\text{CaCl}_2$ . Веома је важно напоменути да одржавање рН суспензије на 2, додатком 6M HCl сваких сат времена (током 3 часа), доприноси бољем приносу крајњег производа. Ово једињење је добијено са веома високом чистоћом и за даљу синтезу је коришћено без пречишћавања.

#### 3.6.1. 3-Ацетил-2-метилхинолин-4-карбоксилна киселина (105):

 Бела прашкаста супстанца; принос: 0,635g (92%); Т.Т. 195-196  $^\circ\text{C}$ ; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3563, 1747, 1633, 1527, 1257, 1217, 776;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, пиридин- $d_5$ ): 2,14 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 3,03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,60 (ddd,  $1\text{H}_{\text{хинолин}}$ ,  $J = 8,2$  Hz;  $J = 7,0$  Hz;  $J = 1,2$  Hz), 7,75 (ddd,  $1\text{H}_{\text{хинолин}}$ ,  $J = 8,6$  Hz;  $J = 7,0$  Hz;  $J = 1,6$  Hz), 8,28 (ddd,  $1\text{H}_{\text{хинолин}}$ ,  $J = 8,6$  Hz;  $J = 1,2$  Hz;  $J = 0,6$  Hz), 8,96 (ddd,  $1\text{H}$ ,  $J = 8,2$  Hz;  $J = 1,6$  Hz;  $J = 0,6$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, пиридин- $d_5$ ): 22,19, 25,58, 109,73, 121,84, 123,81, 128,43, 129,38, 129,48, 130,69, 143,38, 154,36, 161,88.

### 3.7. Поступак за синтезу једињења 107а-љ

Како би се добили финални, **107а-љ** хинолин-халконски хибриди примењене су три методе (А, Б и В).

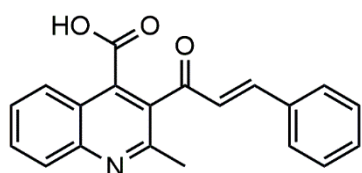
**Метода А:** Деривати **107а**, **107б**, **107г**, **107ж**, **107и**, **107ј** и **107љ** добијени су на следећи начин: једињење **105** (1 mmol, 0,229 g), добијено у претходном кораку, одговарајући алдехид (1 mmol) и KOH (2 mol, 0,272 g) третирају се у порцеланском авану ради добијања хомогене прашкасте супстанце током 20 минута. Затим је смеша пребачена у чашу, додато је 10 mL дејонизоване воде, и након растварања, раствор је закисељен са 2M HCl до рН  $\sim 1,5$ , при чему се формирао талог. Ова суспензија је остављена у фрижидеру преко ноћи, процеђена сутрадан, испрана малом количином хладне воде и финални деривати су осушени у ексикатору. Сва наведена једињења су прекристалисана из 96%-ног етанола.

**Метода Б:** Исти моларни однос једињења **105**, одговарајућег алдехида и KOH-а, као у методи изнад, коришћен је да би се добили деривати **107в**, **107д**, **107з** и **107л**. Реактанти су мешани на собној температури у 5 mL анхидрованог MeOH-а током 15 сати. Након завршетка, у реакциони балон је додато 10 mL воде и даља процедура је иста као у претходној методи (А). Деривати **107в** и **107л** су прекристалисани из 96%-ног етанола, **107д** из хлороформа, док је **107з** прекристалисан из MeOH-а.



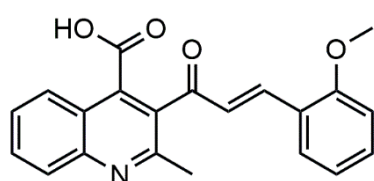
**Метода В:** Како би се добили деривати **107ђ**, **107е**, и **107к** реакциона смеша једињења **105** (1 mmol, 0,229 g), одговарајућег алдехида (1 mmol (1,3 mmol за **107к**)) и КОН-а (2 mmol, 0,272 g (3,3 mmol, 0,185 g за **107к**)) је рефлугована током 5 сати (10 сати за **107к**) у апсолутном етанолу (5 mL). Након завршетка рефлугована, процедура је иста као у претходним методама. Како би се добила једињења веома високе чистоће, ови деривати су подвргнути даљој прекристализацији. Једињења **107ђ-е** прекристалисана су из 96%-ног EtOH-а, док је **107к** (0,150 g) растворен у малој количини диметилсулфооксида на собној температури и поново сталожен дејонизованом водом (однос DMSO : H<sub>2</sub>O = 6 mL : 3,5 mL). Узимајући у обзир да је NMR спектар показао присуство DMSO-а након третмана, ово једињење је подвргнуто даљем пречишћавању. Одређена количина супстанце (0,261 mmol) је растворена у алкалном раствору КОН (0,522 mmol у 10 mL дејонизоване воде), а након тога раствор је закисељен са 2M HCl до pH = 1,5 при чему се формирао талог. Финални дериват **107к** је на овај начин добијен са веома високом чистоћом, након што је талог процеђен и испран са малом количином воде, а затим осушен у ексикатору.

### 3.7.1. 3-[(E)-3-Фенилакрилоил]хинолин-4-карбоксилна киселина (**107а**):



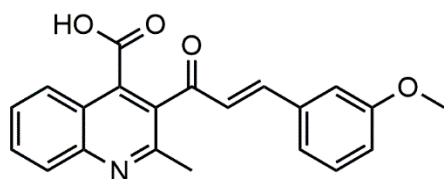
Бела прашкаста супстанца; принос: 0,284 g (89 %); Т.Т. > 250 °C (разлагање); HPLC чистоћа: 94,4 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3429, 1673, 1640, 1626, 1592, 1574, 1245, 768; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-d<sub>5</sub>): 2,91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,32 (m, 1H, Ar-H), 7,45 (d, део АБ система, 1H, J = 16,2 Hz), 7,65 (m, 3H, 2H<sub>хинолин</sub> и Ar-H), 7,77 (ddd, 1H, J = 8,6 Hz; J = 7,0 Hz; J = 1,6 Hz), 7,81 (d, 1H, део АБ система, 1H, J = 16,2 Hz), 8,29 (d, 1H<sub>хинолин</sub>, J = 8,4 Hz), 8,79 (dd, 1H<sub>хинолин</sub>, J = 8,4 Hz; J = 1,2 Hz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, пиридин-d<sub>5</sub>): 23,84, 122,79, 126,40, 127,43, 128,22, 128,67 (2C), 129,18 (2C), 129,44, 130,55, 130,59, 133,65, 134,96, 138,72, 144,28, 148,66, 155,40, 169,60; Израчунато за C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> (317 g/mol): C, 75,70; H, 4,76; N, 4,14; Нађено: C, 75,50; H, 4,82; N, 4,29. HRMS (HESI): Израчунато за C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> : 318,11247; Нађено: 318,11201.

### 3.7.2. 3-[(E)-3-(2-Метоксифенил)акрилоил]хинолин-4-карбоксилна киселина (**107б**):



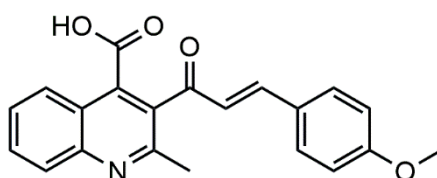
Бела прашкаста супстанца; принос: 0,285g (82%); mp > 250 °C (разлагање); HPLC чистоћа: 97,0 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3429, 1676, 1638, 1595, 1248, 1023; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-d<sub>5</sub>): 2,90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,48 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,81 (d, 1H, Ar-H, J = 8,2 Hz), 6,91 (t, 1H, Ar-H, J = 7,6 Hz), 7,29 (ddd, 1H, Ar-H, J = 8,2 Hz; J = 1,4 Hz; J = 0,4 Hz), 7,57 (d, део АБ система, 1H, J = 16,4 Hz), 7,55-7,75 (m, 3H, 2H<sub>хинолин</sub> и Ar-H), 8,16 (d, део АБ система, 1H, J = 16,4 Hz), 8,24 (d, 1H<sub>хинолин</sub>, J = 8,2 Hz), 8,73 (d, 1H<sub>хинолин</sub>, J = 8,4 Hz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, пиридин-d<sub>5</sub>): 24,03, 55,52, 271,87, 121,14, 123,80, 126,50, 127,47, 128,65, 129,52 (2C), 130,57, 132,25, 133,97, 138,90, 139,70, 148,70, 155,53, 158,85, 169,69, 184,33; Израчунато за C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> (347 g/mol): C, 72,61; H, 4,93; N, 4,03; Нађено: C, 72,47; H, 4,97; N, 4,00. HRMS (HESI): Израчунато за C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup> : 348,12303; Нађено: 348,12284.

## 3.7.3. 3-[(E)-3-(3-Метоксифенил)акрилоил]хинолин-4-карбоксилна киселина (107в):

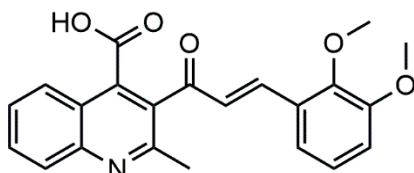


Бела прашкаста супстанца; принос: 0,295g (85%); Т.Т. 236-237 °С (разлагање); HPLC чистоћа: 98,3 %; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3440, 1707, 1644, 1619, 1575, 1212, 1046;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, пиридин- $d_5$ ): 2,88 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,62 (*s*, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6,97 (*m*, 1H, Ar-H), 7,24 (*m*, 2H, Ar-H), 7,33 (*m*, 1H, Ar-H), 7,46 (*d*, део АБ система, 1H,  $J = 16,4$  Hz), 7,58 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz;  $J = 7,0$  Hz;  $J = 1,4$  Hz), 7,74 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz;  $J = 7,0$  Hz;  $J = 1,4$  Hz), 7,79 (*d*, део АБ система, 1H,  $J = 16,4$  Hz), 8,25 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz;  $J = 0,4$  Hz), 8,75 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz;  $J = 1,4$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, пиридин- $d_5$ ): 23,87, 55,35, 273,76, 276,91, 121,30, 126,46, 127,51, 128,55, 129,51, 130,29, 130,62, 133,81, 136,68, 138,78, 144,29, 148,75, 155,47, 160,49, 169,67, 181,69; Израчунато за  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NO}_4$  (347 g/mol): C, 72,61; H, 4,93; N, 4,03; Нађено: C, 72,58; H, 4,96; N, 4,01. HRMS (HESI): Израчунато за  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NO}_4$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  : 348,12303; Нађено: 348,12277.

## 3.7.4. 3-(4-Метоксицинамил)-2-метилхинолин-4-карбоксилна киселина (107г):

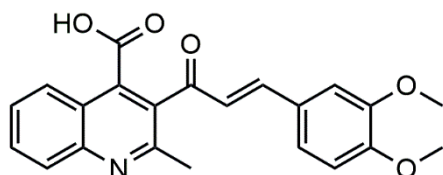


Жута прашкаста супстанца; принос: 0,308g (89 %); Т.Т. > 250 °С (разлагање); HPLC чистоћа: > 99 %; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3441, 1669, 1582, 1562, 1507, 1256, 2768;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, пиридин- $d_5$ ): 2,87 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,63 (*s*, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6,92 (*d*, 1H, Ar-H,  $J = 8,8$  Hz), 7,38 (*d*, део АБ система, 1H,  $J = 16,2$  Hz), 7,59 (*t*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz), 7,60 (*d*, 2H, Ar-H,  $J = 8,8$  Hz), 7,74 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz;  $J = 7,0$  Hz;  $J = 1,4$  Hz), 7,78 (*d*, део АБ система, 1H,  $J = 16,2$  Hz), 8,26 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz;  $J = 0,6$  Hz), 8,72 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz;  $J = 0,6$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, пиридин- $d_5$ ): 24,07, 55,46, 274,92 (2C), 126,21, 126,68, 127,37, 127,70, 129,50, 130,54, 130,72 (2C), 132,96, 139,69, 145,55, 148,58, 155,66, 162,19, 169,84, 189,30; Израчунато за  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NO}_4$  (347 g/mol): C, 72,61; H, 4,93; N, 4,03; Нађено: C, 72,55; H, 4,97; N, 3,99. HRMS (HESI): Израчунато за  $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NO}_4$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 348,12303; Нађено: 348,12272.

3.7.5. 3-(2,3-Диметоксицинамил)-2-метилхинолин-4-карбоксилна киселина  $\times \text{H}_2\text{O}$  (107д):

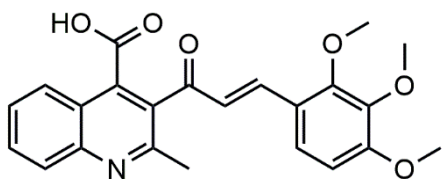
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,393g (81 %); Т.Т. 222-223 °С (разлагање); HPLC чистоћа: > 99 %; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3429, 1647, 1617, 1577, 1479, 1270, 1072;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, пиридин- $d_5$ ): 2,94 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,67 (*s*, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,74 (*s*, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6,97 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,0$  Hz;  $J = 1,6$  Hz), 7,07 (*t*, 1H, Ar-H,  $J = 8,0$  Hz), 7,41 (*dd*, 1H, Ar-H,  $J = 8,0$  Hz;  $J = 1,6$  Hz), 7,52 (*d*, део АБ система, 1H,  $J = 16,4$  Hz), 7,61 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz;  $J = 7,0$  Hz;  $J = 1,2$  Hz), 7,76 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz;  $J = 7,0$  Hz;  $J = 1,4$  Hz), 8,23 (*d*, део АБ система, 1H,  $J = 16,4$  Hz), 8,29 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz;  $J = 1,2$  Hz;  $J = 0,4$  Hz), 8,81 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>,  $J = 8,4$  Hz;  $J = 1,4$  Hz;  $J = 0,4$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, пиридин- $d_5$ ): 23,89, 56,00, 61,27, 275,17, 279,91, 122,89, 124,63, 126,36, 127,59, 129,90, 129,22, 129,60, 130,65, 134,41, 138,31, 138,49, 148,84, 149,14, 153,61, 155,46, 169,57, 179,22; ; Израчунато за  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_5 \times \text{H}_2\text{O}$  (395 g/mol): C, 66,83; H, 5,35; N, 3,54; Нађено: C, 66,91; H, 5,37; N, 3,53. HRMS (HESI): Израчунато за  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_5$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  : 378,1336; Нађено: 378,13318.

### 3.7.6. 3-[(E)-3-(3,4-Диметоксифенил)акрилоил]хинолин-4-карбоксилна киселина (107h) × H<sub>2</sub>O:



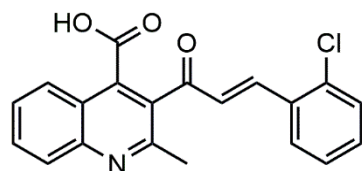
Жута прашкаста супстанца; принос: 0,217 (58 %); Т.Т. 249-250 °С (разлагање); HPLC чистоћа: 96,1 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3429, 1668, 1619, 1588, 1574, 1512, 1268, 1020; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 2,92 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,73 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,74 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,91 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,4 Hz), 7,28 (*dd*, 1H, Ar-H, *J* = 8,4 Hz; *J* = 2,0 Hz), 7,38 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 2,0 Hz), 7,47 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,4 Hz), 7,62 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 7,0 Hz; *J* = 1,4 Hz), 7,77 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 7,0 Hz; *J* = 1,4 Hz), 7,84 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,4 Hz), 8,29 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 1,4 Hz; *J* = 0,4 Hz), 8,75 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 1,4 Hz; *J* = 0,4 Hz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 24,10, 55,99 (2C), 271,62, 272,30, 123,60, 126,38, 126,71, 127,38, 128,10, 129,53, 130,54, 130,01, 139,67, 145,98, 148,61, 150,16, 152,44, 155,67, 169,86, 189,63; Израчунато за C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub> × H<sub>2</sub>O (395 g/mol): C, 66,83; H, 5,35; N, 3,54; Нађено: C, 66,95; H, 5,42; N, 3,56. HRMS (HESI): Израчунато за C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 378,1336; Нађено: 378,13294.

### 3.7.7. 3-(2,3,4-Триметоксицинамил)-2-метилхинолин-4-карбоксилна киселина (107e):



Жута прашкаста супстанца; принос: 0,238 (58 %); Т.Т. 201-202 °С; HPLC чистоћа: 95,8 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3439, 1640, 1590, 1496, 1297, 1244, 1098; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 2,95 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,74 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,78 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,80 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,77 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,8 Hz), 7,54 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 8,8 Hz), 7,56 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,4 Hz), 7,61 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 6,8 Hz; *J* = 1,2 Hz), 7,77 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 6,8 Hz; *J* = 1,4 Hz), 8,13 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,4 Hz), 8,30 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 1,2 Hz), 8,78 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 1,4 Hz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 24,08, 56,18, 60,76, 61,51, 108,74, 121,77, 124,08, 126,59, 127,21, 127,43, 129,55, 130,56, 133,46, 139,32, 140,26, 142,91, 148,64, 153,89, 155,61, 156,55, 169,76, 187,58; Израчунато за C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub> (407 g/mol): C, 67,80; H, 5,20; N, 3,44; Нађено: C, 67,52; H, 5,26; N, 3,45. HRMS (HESI): Израчунато за C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 408,14416; Нађено: 408,14467.

### 3.7.8. 3-[(E)-3-(2-Хлорофенил)акрилоил]хинолин-4-карбоксилна киселина (107ж):

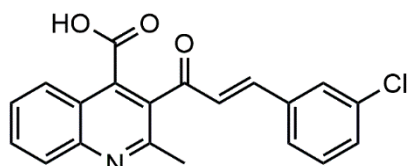


Светложута прашкаста супстанца; принос: 0,292 (83 %); Т.Т. 241-242 °С (разлагање); HPLC чистоћа: 96,1 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3442, 1677, 1594, 1586, 1563, 1319, 1041; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 2,94 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,21-7,36 (*m*, 3H, Ar-H), 7,25 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,2 Hz), 7,58 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,2 Hz; *J* = 7,0 Hz; *J* = 1,2 Hz), 7,75 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 7,0 Hz; *J* = 1,4 Hz), 7,77 (*m*, 1H, Ar-H), 8,10 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,2 Hz), 8,27 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 0,4 Hz), 8,85 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,2 Hz; *J* = 1,2 Hz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 23,56, 122,71, 125,96, 127,68, 127,82, 128,39, 129,48, 130,27, 130,33, 130,80, 131,34, 133,36, 134,73, 135,67, 136,98, 137,16, 148,95, 155,23, 165,87, 169,33; Израчунато за C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>3</sub> (351 g/mol): C, 68,28;



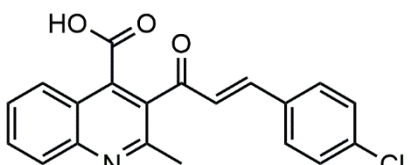
H, 4,01; N, 3,98; Нађено: C, 68,26; H, 4,02; N, 3,98. HRMS (HESI): Израчунао за C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 352,07350; Нађено: 352,07351.

### 3.7.9. 3-[(E)-3-(3-Хлорофенил)акрилоил]хинолин-4-карбоксилна киселина (107з):



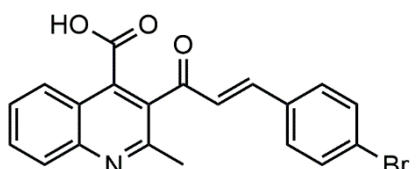
Бела прашкаста супстанца; принос: 0.320 (91 %); Т.Т. > 250 °С (разлагање); HPLC чистоћа: 97,8 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3442, 1651, 1627, 1312, 2796, 803; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 2,88 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,21-7,34 (*m*, 2H, Ar-H), 7,39 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,4 Hz), 7,47 (*d*, 1H, Ar-H, *J* = 7,4 Hz), 7,59 (*m*, 1H<sub>хинолин</sub>), 7,65 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,4 Hz), 7,73 (*m*, 1H, Ar-H), 7,75 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 7,0 Hz; *J* = 1,4 Hz), 8,26 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 0,4 Hz), 8,78 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 1,2 Hz; *J* = 0,6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 23,69, 122,79, 126,29, 126,93, 127,64, 128,35, 129,46, 129,56, 130,15, 130,63, 130,71, 134,21, 134,86, 137,31, 138,31, 141,74, 148,80, 155,38, 169,57, 176,03; Израчунао за C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>3</sub> (351 g/mol): C, 68,28; H, 4,01; N, 3,98; Нађено: C, 68,00; H, 4,05; N, 3,95. HRMS (HESI): Израчунао за C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 352,07350; Нађено: 352,07296.

### 3.7.10. 3-[(E)-3-(4-Хлорофенил)акрилоил]хинолин-4-карбоксилна киселина (107и):



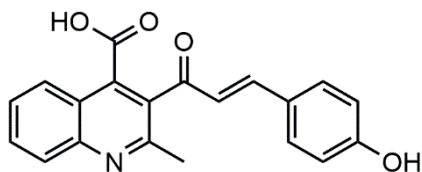
Бела прашкаста супстанца; принос: 0,280 (78 %); Т.Т. > 250 °С (разлагање); HPLC чистоћа: 97,4 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3441, 1679, 1644, 1627, 1599, 1586, 1404, 1088; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 2,90 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,35 (*d*, 2H, Ar-H, *J* = 8,0 Hz), 7,39 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,0 Hz), 7,58 (*d*, 2H, Ar-H, *J* = 8,0 Hz), 7,62 (*t*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 7,5 Hz), 7,71 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,0 Hz), 7,78 (*t*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 7,5 Hz), 8,29 (*d*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,5 Hz), 8,79 (*d*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,5 Hz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 23,75, 122,80, 126,38, 127,53, 128,74, 129,33, 129,37, 130,06 (2C), 130,67, 133,73, 133,89, 135,99, 138,84, 142,48, 148,66, 155,39, 169,69, 179,86; Израчунао за C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>3</sub> (351 g/mol): C, 68,28; H, 4,01; N, 3,98; Нађено: C, 68,27; H, 4,06; N, 3,96. HRMS (HESI): Израчунао за C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 352,07350; Нађено: 352,07302.

### 3.7.11. 3-[(E)-3-(4-Бромфенил)акрилоил]хинолин-4-карбоксилна киселина (107ј):



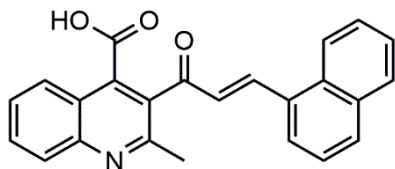
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,325 (82 %); Т.Т. > 250 °С (разлагање); HPLC чистоћа: 98,7 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3434, 1677, 1646, 1624, 1581, 1598, 1400, 768; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 2,85 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,36 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,2 Hz), 7,47 (*s*, 4H, Ar-H), 7,60 (*m*, 1H<sub>хинолин</sub>), 7,63 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,2 Hz), 7,74 (*t*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 7,0 Hz), 8,26 (*d*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz), 8,72 (*d*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,2 Hz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 23,64, 122,78, 124,53, 126,39, 127,47, 128,72, 129,22, 130,23 (2C), 130,66, 132,26 (2C), 133,46, 134,17, 142,60, 148,54, 155,36, 180,38; Израчунао за C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>BrNO<sub>3</sub> (396 g/mol): C, 60,62; H, 3,56; N, 3,53; Нађено: C, 60,46; H, 3,61; N, 3,50. HRMS (HESI): Израчунао за C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>BrNO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 396,02298; Нађено: 396,02293.

### 3.7.12. 3-[(E)-3-(4-Хидроксифенил)акрилоил]хинолин-4-карбоксилна киселина 0,5 H<sub>2</sub>O (107к):



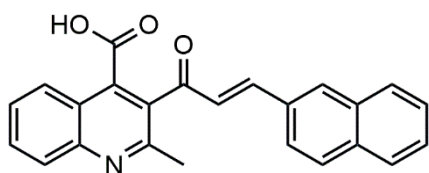
Светложута прашкаста супстанца; принос: 0,276 (83 %); Т.Т. > 250 °С; HPLC чистоћа: > 99 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3433, 1665, 1632, 1599, 1579, 1280, 837; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 2,86 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,12 (*d*, 2H, Ar-H, *J* = 8,6 Hz), 7,35 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,2 Hz), 7,53 (*m*, 3H, Н<sub>хинолин</sub> и 2H Ar-H), 7,72 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,2 Hz; *J* = 7,0; Hz *J* = 1,2 Hz), 7,79 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,2 Hz), 8,25 (*d*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz), 8,64 (*d*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 23,99, 276,83 (2C), 125,08, 126,04, 126,70, 127,24, 129,30, 130,46, 131,17 (2C), 132,54, 140,26, 146,62, 148,36, 155,70, 161,81, 169,98; Израчунато за C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub> × 0,5 H<sub>2</sub>O (342 g/mol): C, 70,17; H, 4,71; N, 4,09; Нађено: C, 69,89; H, 4,77; N, 4,10. HRMS (HESI): Израчунато за C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 334,10738; Нађено: 334,10706.

### 3.7.13. 3-[(E)-3-(Нафтаген-1-ил)акрилоил]хинолин-4-карбоксилна киселина (107л):



Жута прашкаста супстанца; принос: 0,286 (78 %); Т.Т. > 250 °С (разлагање); HPLC чистоћа: > 99 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3433, 1646, 1622, 1606, 1348, 773; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 2,96 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,37-7,48 (*m*, 3H, Ar-H), 7,40 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,0 Hz), 7,58 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 7,0 Hz; *J* = 1,4 Hz), 7,74 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 7,0 Hz; *J* = 1,4 Hz), 7,82-7,89 (*m*, 3H, Ar-H), 8,26 (*m*, 2H, Н<sub>хинолин</sub> и Ar-H), 8,58 (*d*, 1H део АБ система, 1H, *J* = 16,0 Hz), 8,77 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 1,2 Hz; *J* = 0,6 Hz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 23,84, 122,81, 123,75, 125,76, 125,92, 126,41, 126,55, 127,21, 127,58, 129,01, 129,42, 130,65, 130,72, 130,90, 131,76, 132,39, 133,91, 134,06, 138,89, 140,56, 148,73, 155,54, 169,86, 178,87; Израчунато за C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> (367 g/mol): C, 78,46; H, 4,66; N, 3,81; Нађено: C, 78,60; H, 4,71; N, 3,81. HRMS (HESI): Израчунато за C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 368,12812; Нађено: 368,12789.

### 3.7.14. 3-[(E)-3-(Нафтаген-3-ил)акрилоил]хинолин-4-карбоксилна киселина (107љ):



Жута прашкаста супстанца; принос: 0,321 (87 %); Т.Т. > 250 °С (разлагање); HPLC чистоћа: > 99 %; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3434, 1670, 1638, 1616, 1582, 1254; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 2,90 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,44-7,48 (*m*, 2H, Ar-H), 7,53 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,4 Hz), 7,60 (*t*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,2 Hz), 7,74 (*ddd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 7,0 Hz; *J* = 1,2 Hz), 7,81 (*m*, 4H, Ar-H), 7,87 (*d*, део АБ система, 1H, *J* = 16,4 Hz), 7,95 (*s*, 1H, Ar-H), 8,30 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,4 Hz; *J* = 0,4 Hz), 8,76 (*dd*, 1H<sub>хинолин</sub>, *J* = 8,2 Hz; *J* = 0,4 Hz); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, пиридин-*d*<sub>5</sub>): 23,88, 124,14, 126,55, 127,09, 127,49, 127,70, 128,07, 128,52, 128,89, 129,00, 129,40, 130,68 (2C), 132,66, 133,37, 133,66, 134,59, 139,42, 144,70, 148,64, 155,56, 169,82, 184,22; Израчунато за C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> (367 g/mol): C, 78,46; H, 4,66; N, 3,81; Нађено: C, 78,14; H, 4,72; N, 3,77. HRMS (HESI): Израчунато за C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 368,12812; Нађено: 368,12799.

### 3.8. Одређивање липофилности

У оквиру ове дисертације сва синтетизована једињења представљају деривате хинолин-4-карбоксилне киселине, па је услед присуства карбоксилне групе која је делимично јонизована на  $\text{pH} = 7,4$ , липофилност изражена преко вредности  $\log D_{7,4}$ . Липофилност свих финалних једињења одређена је помоћу *shake flask* методе<sup>133</sup> на основу њихове расподељености између две фазе које се међусобно не мешају (фосфатног пуфера на 7,4 који представља водену фазу и *n*-октанола као органског растварача). У овој методи, након снажног мешања и раздвајања фаза, измерена је концентрација једињења у оба растварача и израчунат је  $\log D_{7,4}$ . Концентрација је израчуната из калибрационог графика и вредност  $\log D_{7,4}$  је одређена помоћу једначине:  $\log D_{7,4} = \log(y/x-y)$  где  $x$  представља концентрацију једињења у *n*-октанолу пре мућкања, а  $y$  представља концентрацију једињења у *n*-октанолу након третмана.

За свако тестирано једињење урађено је по пет мерења, направљен калибрациони дијаграм, а  $\log D_{7,4}$  вредност добијена је из једначине праве.

**Одређивање липофилности једињења серије А (100а-љ):** У нормални суд од 25 mL одмерено је 0,5 mg једињења **100а-б**, **100г** и 0,8 mg **100в**, **100д-к** и **100љ** растворено у 100  $\mu\text{L}$  DMSO-а након чега је нормални суд допуњен до црте *n*-октанолом. Од овако припремљених раствора одмерено је 9,154 mL (**100а-б**, **100г**) и 3,333 mL (**100в**, **100д-к** и **100љ**) у нормални суд од 10 mL који је такође допуњен до црте *n*-октанолом. У случају једињења **100л** није вршено додатно разблажење. Апсорбанца ових раствора измерена је на UV-Vis спектрофотометру. Затим је одмерено 4 mL *n*-октанолског раствора тестираног једињења и 8 mL фосфатног пуфера ( $\text{pH} = 7,4$ ). Овако припремљен двофазни систем је мешан током 30 минута на механичком шејкеру. Након сепарације фаза, одвојен је *n*-октанолски слој, осушен помоћу анхидрованога  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , и измерена је апсорбанца.

**Одређивање липофилности једињења серије Б (104а-р):** У нормални суд од 25 mL одмерено је 0,5 mg за **104а-љ** и **104н-р** и 1 mg за **104о**, растворено у 100  $\mu\text{L}$  DMF-а и суд допуњен до црте *n*-октанолом. За деривате **104а** и **104б-е** је извршено додатно разблажење, тако што је у нормални суд од 10 mL одмерено 4 mL (**104а**) или 5 mL (**104б-е**), након чега је суд допуњен до црте. Даљи поступак одређивања апсорбанци раствора је исти као у претходној процедури.

**Одређивање липофилности једињења серије В (107а-љ):** У случају серије **В**, радни раствори су припремљени тако да концентрација свих раствора тестираних једињења износи  $5 \times 10^{-5}$  mM. У нормални суд од 50 mL је измерена одређена маса сваке супстанце и растворена у 100  $\mu\text{L}$  DMF-а, након чега је суд допуњен до црте *n*-октанолом. Двофазни систем је припремљен на исти начин као у случају претходне две серије. Апсорбанце раствора пре и после третмана на механичком шејкеру за једињења **107а-и** и **107к-л** одређене су на UV-Vis спектрофотометру. У случају једињења **107ј**, апсорпциони спектар на UV-Vis спектрофотометру после сепарације није био задовољавајуће резолуције, самим тим је за ово једињење снимљен хроматограм на HPLC-у, а непозната концентрација нађена из једначине праве. Коришћена је Luna (Phenomenex, Torrance, CA, USA) C18 колона чија је температура одржавана на 35° C. Извршено је изократско елуирање и брзина протока мобилне фазе (ацетонитрил) била је 1 mL/min. Таласна дужина на којој је праћено снимање износила је 330 nm. Из истих разлога, за **107љ** снимљен је емисиони спектар на спектрофлуориметру. Таласна дужина ексцитације је фиксна, а опсег емисије је био подешен пре мерења, са ширином прореза ексцитације и емисије постављеним на 10 nm. Спектри емисије флуоресценције су мерени у опсегу таласних дужина од 250–800 nm са таласном дужином ексцитације на 320 nm.

### 3.9. Одређивање растворљивости једињења серије В

Растворљивост хинолин-халконских хибрида **107а-љ** одређена је према већ познатој процедури.<sup>162</sup> Најпре су направљени стандардни раствори различитих концентрација за потребе добијања калибрационог дијаграма. Након што је добијена калибрациона права, направљени су засићени раствори сваког тестираног једињења који су затим филтрирани пре снимања. Тестирана једињења су раздвојена на колони YMC-Pack ODS-AQ (150 × 4,6 mm 5 μm; USA). HPLC мерења су вршена на собној температури, при чему су комбиноване две мобилне фазе: мравља киселина (0,1 % водени раствор, рН = 2,5, мобилна фаза А) и ацетонитрил (мобилна фаза Б). Мобилне фазе су профилиране кроз 0,45 μm мембрански филтер и дегасиране пре употребе. Брзина протока мобилних фаза је била 1 mL/min, док је UV детекција праћена на 320 nm. За сепарацију тестираних узорака коришћен је следећи градијент мобилних фаза: 0 – 5 min: 0% Б; 5 – 20 min: 0 – 100% Б; 20 – 25 min: 100% Б. Интеграли површина добијених пикова одређени су помоћу LC-solution софтвера.

### 3.10. Одређивање чистоће једињења серије В

Како би се одредила чистоћа свих деривата у оквиру **В** серије, једињења су растворена у THF-у, а HPLC снимања су извршена при истим условима као што је већ описано у поглављу изнад.

### 3.11. Биолошка испитивања

#### 3.11.1. Инхибиција *hDHODH*

Рекомбинантна хумана дихидрооротат дехидрогеназа (*hDHODH*) (Fisher Scientific, Vienna, Austria и Aviva Systems Biology, San Diego, California, USA) је растворена у пуферу (50 mM Tris, 150 mM KCl и 0,8% Triton® X-100, pH 8,0 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)) тако да је концентрација износила 2,5 μg/ml. Овако припремљена смеша је пребачена на плочу са 96 бунарчића. Затим су додати раствори различитих концентрација испитиваних једињења и узорци су инкубирани 30 минута на собној температури како би потенцијални инхибитори реаговали са протеином. Након завршетка инкубације, смеша супстрата (20 mM of L-DHO, 2 mM DuQ-a и 1 mM DCIP-a (Fisher Scientific, Vienna, Austria) је додата како би се активирала реакција која је праћена мерењем апсорпције на 610 nm (GloMax® Multimode Microplate Reader). Као позитивна контрола у овим експериментима коришћени су Leflunomide (Fisher Scientific, Vienna, Austria) и Brequinar (THP Medical Products, Vienna, Austria). За свако једињење су урађена по три мерења, а финалне IC<sub>50</sub> вредности одређене су помоћу програма GraphPad Prism 6.0.

#### 3.11.2. Ћелијске линије и испитивање цитотоксичности

Све ћелијске линије, осим A549 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia, USA), добијене су на поклон од професорке др Барбаре Крамер, Универзитет у Салзбургу, Аустрија. MCF-7, A375 и HaCaT ћелијске линије су засејаване у DMEM медијуму (*енг.* Dulbecco's modified Eagle's medium) који је обогаћен глукозом са 10%-ним феталним серумом говечета, 1%-ним пеницилин-стрептомицином

и 1%-ним L-глутамином. A549 ћелијска линија је била одржавана у Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 медијуму обogaћеним 10%-ним феталним серумом говечета, 1%-ним пеницилин-стрептомицином и 1%-ним L-глутамином. Сви медијуми и суплементи купљени су од Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA. Ћелије су гајене у Петри шољама (Greiner BIO-ONE, Kremsmünster, Austria) у инкубаторима у влажној атмосфери на 37° C у присуству 5%-ног CO<sub>2</sub>. У циљу утврђивања цитотоксичног потенцијала испитиваних једињења коришћен је МТТ тест. МТТ (3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолиум бромид) тест се базира на мерењу активности митохондријалног ензима сукцинат дехидрогеназе. Активност митохондријалних ензима је константна у већини живих ћелија, и због тога директно пропорционална броју живих ћелија. Уколико су ћелије живе, митохондријални ензим сукцинат дехидрогеназа редукује тетразолијумске соли до формаза. <sup>163</sup> Кристали формазана су специфично тамно обојени и растварају се у DMSO дајући љубичасту боју. Интензитет боје је пропорционалан броју живих ћелија. Ћелије (5000 ћелија по бунарчићу) у одговарајућем медијуму за раст су засејаване на плочу са 96 бунарчића. Сутрадан, овај медијум је замењен медијумом без серума који је садржао различите концентрације тестираних једињења. Након инкубационог периода од 72 сата, број живих ћелија је одређен додатком 10 µl раствора МТТ-а (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; 5 mg/mL у фосфатном пуферу (PBS-у)) ћелијама које су третиране једињењима, као и контролним, нетретираним, ћелијама на 37° C у мраку, током 2 сата. Након тога, медијум је испран, ћелије су лизирани са 100µl DMSO-а (VWR International GmbH, Vienna, Austria), а апсорбанца је измерена на 550 nm (GloMax® Multimode Microplate Reader). За свако једињење урађена су три независна експеримента. Број живих ћелија је нормализован према контролним, нетретираним ћелијама чије је преживљавање узето за 100%, а финалне IC<sub>50</sub> вредности одређене су помоћу програма GraphPad Prism 6.0.

### 3.12. Молекулски докинг

Студије молекулског докинга су извршене на моделу ко-кристализоване структуре хумане дихидрооротат дехидрогеназе која је преузета из *Protein Data Bank* података. Докинг симулације су урађене помоћу AutoDock Vina<sup>164</sup> програма који се сматра једним од најбољих за процену поравнања молекула на основу њихове структуре при чему су коришћени валидни протоколи:<sup>165</sup>

1. Поновно доковање експерименталне конформације (*енг.* Experimental Conformation Re-Docking, ECRD): помоћу ове методе се експерименталне конформације лиганда поново докују у активни центар ензима који се налази у нативном стању.
2. Поновно доковање насумичне конформације (*енг.* Randomized Conformation Re-Docking, RCRD): овом процедуром се препознаје способност програма да се доковањем успешно репродукује експериментална конформација лиганда из његове насумичне конформације.
3. Унакрсно доковање експерименталне конформације (*енг.* Experimental Conformation Cross-Docking, ECCD): овом методом се одређени лиганд докује у протеинима који су по примарној структури једнаки нативном протеину, али се у вишим нивоима конформације могу јавити неке мање или веће разлике услед природе самог супстрата и индукованог фитовања истог; самим тим програм успева да пронађе биоактивне конформације лиганда у тим протеинима.

4. Унакрсно доковање насумичне конформације (*енг.* Randomized Conformation Cross-Docking, RCCD): овом процедуром се насумична конформација докује у свим расположивим активним центрима протеина, осим у нативном. Овај метод представља веома тежак ниво процене, јер се било који молекул докује у непознатом окружењу, што доводи до резултата који могу предвидети биоактивну конформацију лиганда чија експериментална конформација није одређена.

Сви комплекси су учитани у UCSF Chimera v1.10.1 софтвер.<sup>166</sup> За потребе овог експеримента, инхибитори су екстраховани од комплекса. Структуре су побољшане додавањем атома водоника, док су Amber-ови параметри били израчунати преко Antechamber-а, помоћу семиемпиријског QM (*енг.* quantum mechanical) метода. Делови протеина сачуваног мономера су побољшани додавањем атома водоника, коришћењем Amber 12 пакета<sup>167</sup> након чега је извршена одговарајућа протонација сваког аминокиселинског остатка на рН 7,4. Након припреме, протеини су спојени са одговарајућим лигандима и енергије комплекса су минимизирани на следећи начин: Солватација је извршена SOLVATEОСТ командом при чему су модели смештени у простору који је издужен 10 Å у свим правцима и окружени молекулима воде TIP3 моделом. Системи су потом неутралисани додатком Na<sup>+</sup> или Cl<sup>-</sup> јона, и извршена је минимизација енергије применом Sander модула Amber пакета у 1000 корака, при чему је сваки наредни конформер имао мању енергију у односу на претходни (*енг.* steepest-descent energy minimization), а након тога је извршен други корак у минимизацији система је у 4000 корака, при чему су парови конформера који садрже највећу и најмању енергију симултано минимизирани док не добију исту енергију (*енг.* conjugate-gradient energy minimization). Из минимизираних комплекса, оба лиганда и протеини су екстраховани да би се користили за процену поравнања засновано на структури и молекуларних *cross-docking* експеримената. Раздвојени протеини су коришћени као мете за унакрсно спајање, док су одвојени инхибитори коришћени за дефинисање *cross-docking* места у протеину где се врши докинг студија.

Унакрсно доковање свих доступних кристала hDHODH протеина су урађене коришћењем координата добијених од hDHODH инхибитора: хуз координате (у ангстремима) за прорачун биле су X<sub>min</sub>/X<sub>max</sub> = -48,696/-17,176, Y<sub>min</sub>/Y<sub>max</sub> = 15,078/-31,862, Z<sub>min</sub>/Z<sub>max</sub> = 19,960/-14,897; подешавање координата је изведено на начин да обухвати минимизирани инхибитор који обухвата 10 Å у све три димензије. Након што се припреми оптимална просторна решетка, урађена су следећа подешавања: постављен је енергетски опсег од 10 kcal/mol и извршено је укупно 100 конформационих претрага док је вредност корена средњег квадрата RMS (*енг.* Root Mean Square) 0,5 Å. Из сваког сета унакрсно докованих лиганда, одабрана је биоактивна конформација (тј. конформација најниже енергије) појединачног једињења. У случају једињења која су представљена у овом раду, као референтне биоактивне конформације коришћене су ко-кристализоване структуре Leflunomide-а и Brequinar-а.

## ***4. ЗАКЉУЧАК***





На основу резултата који су приказани у поглављу „*Наши радови*”, могу се извести следећи закључци:

- Помоћу Doebner-ове реакције добијени су деривати 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине (серије **A** и **B**).
- Pfitzinger-овом реакцијом је добијена 2,3-дисупституисана хинолин-4-карбоксилна киселина чија је дериватизација у положају 3 помоћу Claisen-Schmidt-ове кондензације извршена први пут (серија **B**).
- Дихидрооротат дехидрогеназа човека је идентификована као потенцијална мета новосинтетизованих деривата. Одређена једињења у оквиру **A** (**100a-б**, **100г-ж**, **100и-к**), **B** (**104д**, **104з-к**, **104м**) и **B** (**107г**, **107ж-з**, **107ј**, **107л-љ**) серије су показала бољу способност инхибиције овог ензима у поређењу са референтним једињењем Leflunomide-ом.
- Испитивана једињења у *in vitro* условима имају антитуморски потенцијал, а као супериорна у том смислу су се издвојила једињења **A** серије. Она су ефикасније деловала према ћелијама аденокарцинома дојке (MCF-7) и меланома (A375) у односу на ћелије аденокарцинома плућа (A549), што указује на потенцијалну специфичност у антитуморском деловању.
- Деривати 2-супституисане хинолин-4-карбоксилне киселине серије **B** као и одређени број једињења серије **B** (**107a-в**, **107д-е**, **107и** и **107к**) су се издвојили као најмање токсични за здраве кератиноците коже.
- Задовољавајући индекс селективности показало је једињење **100ј** **A** серије (на ћелијама меланома и аденокарцинома дојке), као и **107г** које припада **B** серији (на ћелијама меланома).
- Оптималне липофилне особине у опсегу 0–3 испољили су одређени деривати **A** (**100a-б**, **100г-ж**, **100и-к**), **B** (**104в**, **104д-л**, **104м-н**, **104о-р**) и **B** серије (**107ж-ј**, **107л-љ**); дакле, ова једињења имају потенцијал да уђу у ћелију и испоље своје токсично тј. антитуморско дејство.
- Хинолин-халконски хибриди **107a** и **107д-е** **B** серије показали су боље солубилне особине од референтног једињења што доприноси њиховом фармаколошком профили.
- Најзначајније докинг интеракције са ензимом дихидрооротат дехидрогеназом остварила су једињења **100ђ-е** (**A** серија), **104и** (**B** серија) и **107г** (**B** серија). Овај податак подстиче на даља испитивања ових деривата и њихову потенцијалну примену у терапеутске сврхе.



## ***5. ЛИТЕРАТУРА***



1. F.F. Runge; Ueber einige produkte der Steinkohlendestillation (On some products of coal distillation). *Ann. Phys.* 5, 65–78, **1834**.
2. J.B. Bharate, R.A. Vishwakarma, S.B. Bharate; Metal-free domino one-pot protocols for quinoline synthesis. *RSC Adv.* 5, 42020–42053, **2015**.
3. A. Marson, J.E. Ernsting, M. Lutz, A.L. Spek, P.W.N.M. Van Leeuwena, P.C.J. Kamer; A novel hemilabile calix[4],quinoline-based P,N-ligand: coordination chemistry and complex characterization. *Dalton Trans.* 4, 621–633, **2009**.
4. M.O. Püsküllü, B. Tekiner, S. Suzen; Recent studies of antioxidant quinoline derivatives. *Mini-Rev. Med. Chem.* 13, 365–372, **2013**.
5. R.N. Kharwar, A. Mishra, S.K. Gond, A. Stierle, D. Stierle; Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Nat. Prod. Rep.* 28, 1208–1228, **2011**.
6. P. Williams, A. Sorribas, M.-J. R. Howes; Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Nat. Prod. Rep.* 28, 48–77, **2011**.
7. S. Bongarzone, M.L. Bolognesi; The concept of privileged structures in rational drug design: focus on acridine and quinoline scaffolds in neurodegenerative and protozoan diseases. *Expert. Opin. Drug. Discov.* 6, 251–268, **2011**.
8. O. Afzal, S. Kumar, M.R. Haider, M.R. Ali, R. Kumar, M. Jaggi, S. Bawa; A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 871–910, **2014**.
9. S. Vlahopoulos, E. Critselis, I.F. Voutsas, S.A. Perez, M. Moschovi, C.N. Baxevanis, G.P. Chrousos; New use for old drugs? Prospective targets of chloroquines in cancer therapy. *Curr. Drug Targets* 15, 843–851, **2014**.
10. S. Mukherjee, M. Pal; Medicinal chemistry of quinolines as emerging anti-inflammatory agents: an overview. *Curr. Med. Chem.* 20, 4386–4410, **2013**.
11. R. Musiol, M. Serda, S. Hensel-Bielowka, J. Polanski; Quinoline-based antifungals. *Curr. Med. Chem.* 17, 1960–1973, **2010**.
12. R.S. Keri, S.A. Patil; Quinoline: a promising antitubercular target. *Biomed. Pharmacother.* 68, 1161–1175, **2014**.
13. M.E. Rebeaud, F. Zores; SARS-CoV-2 and the use of chloroquine as an antiviral treatment. *Front. Med. (Lausanne)*. 7, 184–184, **2020**.
14. S.E. Denmark, S. Venkatraman; On the mechanism of the Skraup-Doebner-Von Miller quinoline synthesis. *J. Org. Chem.* 71, 1668–1676, **2006**.
15. O. Doebner; Ueber  $\alpha$ -alkylcinchoninsäuren und  $\alpha$ -alkylchinoline. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 242, 265–289, **1887**.
16. X.-G. Li, X. Cheng, Q.-L. Zhou; A convenient synthesis of 2-alkyl-8-quinoline carboxylic acids. *Synth. Commun.* 32, 2477–2481, **2002**.
17. J.J. Li; Name Reactions: A collection of detailed mechanisms and synthetic applications. Springer International Publishing: Cham, Switzerland, **2014**.
18. L.S. Povarov, V.I. Grigos, B.M. Mikhailov; Reaction of benzylideneaniline with some unsaturated compounds. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.* 12, 1878–1880, **1963**.
19. K.K.S. Sai, T.M. Gilbert, D.A. Klumpp; Knorr cyclizations and distonic superelectrophiles. *J. Org. Chem.* 72, 9761–9764, **2007**.
20. M.G.-A. Shvekhgeimer; The Pfitzinger reaction. (Review). *Chem. Heterocycl. Compd.* 40, 257–294, **2004**.
21. H. Saggadi, D. Luart, N. Thiebault, I. Polaert, L. Estel, C. Len; Quinoline and phenanthroline preparation starting from glycerol via improved microwave-assisted modified Skraup reaction. *RSC Adv.* 4, 21456–21464, **2014**.

22. L.-M. Wanga, L. Hua, H.-J. Chen, Y.-Y. Sui, W. Shen; One-pot synthesis of quinoline-4-carboxylic acid derivatives in water: Ytterbium perfluorooctanoate catalyzed Doebner reaction. *J. Fluor. Chem.* 130, 406–409, **2009**.
23. G.A. Ramann, B.J. Cowen; Quinoline synthesis by improved Skraup-Doebner-Von Miller reactions utilizing acrolein diethyl acetal. *Tetrahedron Lett.* 56, 6436–6439, **2015**.
24. Z. Wang; Conrad-Limpach quinoline synthesis; *Comprehensive organic name reactions and reagents.* 152, 692–697, **2010**.
25. C.R. Hauser, J.G. Murray; Certain 4-hydroxyquinolines from aniline and  $\beta$ -ketonitriles. cyclizations of nitriles through amides by means of polyphosphoric acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 2851–2852, **1955**.
26. A.J. Walz, R.J. Sundberg; Synthesis of 8-methoxy-1-methyl-1H-benzo[de][1,6]naphthyridin-9-ol (isoaaptamine) and analogues. *J. Org. Chem.* 65, 8001–8010, **2000**.
27. J.J. Li; Name Reactions; Pavorov reaction. 493–494, **2014**.
28. D.I. Ilyushkin, E.S. Semichenko, G.A. Suboch; Transformation of hydroxyiminoacetoacetanilides in sulfuric acid. *Russ. J. Org. Chem.* 40, 1543–1543, **2004**.
29. G.A. Ramann, B.J. Cowen; Recent advances in metal-free quinoline synthesis. *Molecules.* 21, 986–986, **2016**.
30. M. Barbero, S. Bazzi, S. Cadamuro, S. Dughera; O-benzenedisulfonimide as a reusable Brønsted acid catalyst for an efficient and facile synthesis of quinolones via Friedlander annulation. *Tetrahedron Lett.* 51, 2342–2344, **2010**.
31. G.V. Bodrin, P.S. Lempert, S.V. Matveev, P.V. Petrovskii, E.E. Nifant'ev; The first application of the Friedlander reaction for the synthesis of [1,8]naphthyridine derivatives containing phosphorus. *Mendeleev Commun.* 17, 25–25, **2007**.
32. I. Elghamry, Y. Al-Faiyz; A simple one-pot synthesis of quinoline-4-carboxylic acids by the Pfitzinger reaction of isatin with enamines in water. *Tetrahedron Lett.* 57, 110–112, **2015**.
33. S.S. Mahantheshappa, H. Shivanna, N.D. Satyanarayan; Synthesis, antimicrobial, antioxidant, and ADMET studies of quinoline derivatives. *Eur. J. Chem.* 12, 37–44, **2021**.
34. C. De La Guardia, D.E. Stephens, H.T. Dang, M. Quijada, O.V. Larionov, R. Leonart; Antiviral activity of novel quinoline derivatives against dengue virus serotype 2. *Molecules.* 23, 672–672, **2018**.
35. L. Herrmann, F. Hahn, C. Wangen, M. Marschall, S.B. Tsogoeva; Anti-SARS-CoV-2 inhibitory profile of new quinoline compounds in cell culture-based infection models. *Chem. Eur. J.* 28, e202103861, **2022**.
36. M.N. Zemtsova, A.V. Zimichev, P.L. Trakhtenberg, Yu.N. Klimochkin, M.V. Leonova, S.M. Balakhnin, N.I. Bormotov, O.A. Serova, E.F. Belanov; Synthesis and antiviral activity of several quinoline derivatives. *Pharm. Chem. J.* 45, 267–267, **2011**.
37. S.K. Gupta, A. Mishra; Synthesis, characterization and screening for anti-inflammatory and analgesic activity of quinoline derivatives bearing azetidiones scaffolds. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 15, 31–43, **2016**.
38. X. Wen, S.-B. Wang, D.-C. Liu, G.-H. Gong, Z.-S. Quan; Synthesis and evaluation of the anti-inflammatory activity of quinoline derivatives. *Med. Chem. Res.* 24, 2591–2603, **2015**.
39. N. Garg, T. Chandra, A. Kumar; Synthesis and anticonvulsant activity of substituted quinoline derivatives. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2, 88–92, **2010**.

40. S. Behera, P. Mohanty, R. Behura, B. Nath, A.K. Barick, B.R. Jali; Antibacterial properties of quinoline derivatives: A mini review. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 12, 6078–6092, **2022**.
41. A. Dorababu; Recent update on antibacterial and antifungal activity of quinoline scaffolds. *Arch. Pharm.* 354, e2000232, **2020**.
42. G.-Z. Yang, J.-K. Zhu, X.-D. Yin, Y.-F. Yan, Y.-L. Wang, X.-F. Shang, Y.-Q. Liu, Z.-M. Zhao, J.-W. Peng, H. Liu; Design, synthesis, and antifungal evaluation of novel quinoline derivatives inspired from natural quinine alkaloids. *J. Agric. Food Chem.* 67, 11340–11353, **2019**.
43. R. Musiola, J. Jampilek, V. Buchtac, L. Silva, H. Niedbala, B. Podeszwa, A. Palka, K. Majerz-Maniecka, B. Oleksyn, J. Polanski; Antifungal properties of new series of quinoline derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 14, 3592–3598, **2006**.
44. Y.-F. Guan, X.-J. Liu, X.-Y. Yuan, W.-B. Liu, Y.-R. Li, G.-X. Yu, X.-Y. Tian, Y.-B. Zhang, J. Song, W. Li, S.-Y. Zhang; Design, synthesis and anticancer activity studies of novel quinoline-chalcone derivatives. *Molecules.* 26, 4899–4899, **2021**.
45. S. Rasoul-Amini, A. Khalaj, A. Shafiee, M. Daneshtalab, A. Madadkar-Sobhani, S. Fouladdel, E. Azizi; *Anti-tumor activity of new quinoline derivatives in human breast cancer T47D cells.* *Int. J. Cancer Res.* 2, 102–108, **2006**.
46. A.E. Rashad, W.A. El-Sayed, A.M. Mohamed, M.M. Ali; Synthesis of new quinoline derivatives as inhibitors of human tumor cells growth. *Arch. Pharm.* 343, 440–448, **2010**.
47. P.C. Appelbaum, P. Hunter; The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents* 16, 5–15, **2000**.
48. A.M. Emmerson, A.M. Jones; The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 13–20, **2003**.
49. A.A. Aly, M. Ramadan, G.E.-D.A. Abuo-Rahma, Y.A.M.M. Elshaier, M.A.I. Elbastawesy, A.B. Brown, S. Bräse; Quinolones as prospective drugs: Their syntheses and biological applications. *Adv. Heterocycl. Chem.* 135, 147–196, **2021**.
50. R. Davis, A. Markham, J.A. Balfour. Ciprofloxacin. *Drugs* 51, 1019–1074, 1996.
51. A. Liapikou, C. Cillóniz, A. Torres; Investigational drugs in phase I and phase II clinical trials for the treatment of community-acquired pneumonia. *Expert Opin. Investig. Drugs* 26, 1239–1248, **2017**.
52. S. Lemaire, F. Van Bambeke, P. M. Tulkens; Activity of Finafloxacin, a novel fluoroquinolone with increased activity at acid pH, towards extracellular and intracellular *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Legionella pneumophila*. 38, 52–59, **2011**.
53. M.A. Abdelrahman, I. Salama, M.S. Gomaa, M.M. Elaasser, M.M. Abdel-Aziz, D.H. Soliman; Design, synthesis and 2D QSAR study of novel pyridine and quinolone hydrazone derivatives as potential antimicrobial and antitubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* 138, 698–714, **2017**.
54. M. Lieberman, A. Peet; Marks' basic medical biochemistry: A clinical approach. Fifth edition. ISBN 9781496324818, 24, 437–456, **2018**.
55. M. O. Puskullu, B. Tekiner, S. Suzen; Recent studies of antioxidant quinoline derivatives. *Mini Rev. Med. Chem.* 13, 365–372, **2013**.
56. E. Findik, M. Ceylan, M. Elmastaş; Four component one-pot synthesis of novel 7,8-dihydroquinolin 5(1H,4H,6H)-one derivatives containing an ionone unit and in vitro antioxidant activity. *J. Heterocycl. Chem.* 49, 253–260, **2012**.
57. X.-H. Yang, P.-H. Zhang, Y.-H. Zhou, C.-G. Liu, X.-Y. Lin, J.-F. Cui; Synthesis and antioxidant evaluation of novel 4-arylhexahydroquinolines from lignin. *Arkivoc.* 10, 335–345, **2011**.

58. A. Kreimeyer, B. Laube, M. Sturgess, M. Goeldner, B. Foucaud; Evaluation and biological properties of reactive ligands for the mapping of the glycine site on the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *J. Med. Chem.* 42, 4394–4404, **1999**.
59. A.H. Abadi, G.H. Hegazy, A.A. E-Zaher; Synthesis of novel 4-substituted-7-trifluoromethylquinoline derivatives with nitric oxide releasing properties and their evaluation as analgesic and anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 5759–5765, **2005**.
60. A. Gomtsyan, E.K. Bayburt, R.G. Schmidt, G.Z. Zheng, R.J. Perner, S. Didomenico, J.R. Koenig, S. Turner, T. Jinkerson, I. Drizin, S.M. Hannick, B.S. Macri, H.A. McDonald, P. Honore, C.T. Wismer, K.C. Marsh, J. Wetter, K.D. Stewart, T. Oie, M.F. Jarvis, C.S. Surowy, C.R. Faltynek, C.-H. Lee; Novel transient receptor potential vanilloid 1 receptor antagonists for the treatment of pain: Structure–activity relationships for ureas with quinoline, isoquinoline, quinazoline, phthalazine, quinoxaline, and cinnoline moieties. *J. Med. Chem.* 48, 744–752, **2005**.
61. C. Manera, M.G. Cascio, V. Benetti, M. Allarà, T. Tuccinardi, A. Martinelli, G. Saccomanni, E. Vivoli, C. Ghelardini, V. Di Marzob, P.L. Ferrarinia; New 1,8-naphthyridine and quinoline derivatives as CB2 selective agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 6505–6510, **2007**.
62. S. Mukherjee, M. Pal; Quinolines: a new hope against inflammation. *Drug. Discov.* 18, 389–398, **2013**.
63. R. Ghodsi, A. Zarghi, B. Daraei, M. Hedayati; Design, synthesis and biological evaluation of new 2,3-diarylquinoline derivatives as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 1029–1033, **2010**.
64. R. Kaur, K. Kumar; Synthetic and medicinal perspective of quinolines as antiviral agents. *Eur. J. Med. Chem.* 215, 113220, **2021**.
65. P. Cheng, Q. Gu, W. Liu, J.-F. Zou, Y.-Y. Ou, Z.-Y. Luo, J.-G. Zeng; Synthesis of quinolin-2-one alkaloid derivatives and their inhibitory activities against HIV-1 reverse transcriptase. *Molecules.* 16, 7649–7661, **2011**.
66. T. Utsugi, K. Aoyagi, T. Asao, S. Okazaki, Y. Aoyagi, M. Sano, K. Wierzba, Y. Yamada; Antitumor activity of a quinoline derivative, TAS-103, with inhibitory effects on topoisomerase I and II. *Jpn. J. Cancer Res.* 88, 992–1002, **1997**.
67. J. Li, T.-C. Zheng, Y. Jin, J.-G. Xu, J.-G. Yu, Y.-W. Lv; Synthesis, molecular docking and biological evaluation of quinolone derivatives as novel anticancer agents. *Chem. Pharm. Bull.* 66, 55–60, **2018**.
68. M.F.A. Mohame, G.E.-D.A. Abuo-Rahma; Molecular targets and anticancer activity of quinoline–chalcone hybrids: literature review. *RSC Adv.* 10, 31139–31155, **2020**.
69. D.R. Evans, H.I. Guy; Mammalian pyrimidine biosynthesis: Fresh insights into an ancient pathway. *J. Biol. Chem.* 32, 33035–33038, **2004**.
70. M. Huang, L.M. Graves; De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 321–336, **2003**.
71. S. Chen, S. Ding, Y. Yin, L. Xu, P. Li, M.P. Peppelenbosch, Q. Pan, W. Wang; Suppression of pyrimidine biosynthesis of targeting DHODH enzyme robustly inhibits rotavirus replication. *Antivir. Res.* 167, 35–44, **2019**.
72. H. Kaur, P. Sarma, A. Bhattacharyya, S. Sharma, N. Chhimpa, M. Prajapat, A. Prakash, S. Kumar, A. Singh, R. Singh, P. Avti, P. Thota, B. Medhi; Efficacy and safety of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors “leflunomide” and “teriflunomide” in Covid-19: A narrative review. *Eur. J. Pharmacol.* 906, 174233, **2021**.
73. L. Quemeneur, L.-M. Gerland, M. Flacher, M. Ffrench, J.-P. Revillard, L. Genestier; Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J. Immunol.* 170, 4986–4995, **2003**.



74. W. Knecht, M. Loffler; Species-related inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by immunosuppressive isoxazol and cinchoninic acid derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1259–1264, **1998**.
75. S. Norager, K.F. Jensen, O. Bjornberg, S. Larsen; E. coli dihydroorotate dehydrogenase reveals structural and functional distinctions between different classes of dihydroorotate dehydrogenase. *Structure.* 10, 1211–1223, **2002**.
76. Y. Zhou, L. Tao, X. Zhou, Z. Zuo, J. Gong, X. Liu, Y. Zhou, C. Liu, N. Sang, H. Liu, J. Zou, K. Gou, X. Yang, Y. Zhao; DHODH and cancer: promising prospects to be explored. *Cancer Metab.* 9, 22–22, **2021**.
77. A.E. Kahler, F.S. Nielsen, R.L. Switzer; Biochemical characterization of the heteromeric *Bacillus subtilis* dihydroorotate dehydrogenase and its isolated subunits. *Arch. Biochem. Biophys.* 371, 191–201, **1999**.
78. F.S. Nielsen, P.S. Andersen, K.F. Jensen; The B form of dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis* consists of two different subunits, encoded by the *pyrDb* and *pyrK* genes, and contains FMN, FAD, and [FeS] redox centers. *J. Biol. Chem.* 271, 29359–29365, **1996**.
79. V.K. Vyas, M. Ghate; Recent developments in the medicinal chemistry and therapeutic potential of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors. *Mini-Rev. Med. Chem.* 11, 1039–1055, **2011**.
80. R. Baumgartner, M. Walloschek, M. Kralik, A. Gotschlich, S. Tasler, J. Mies, J. Leban; Dual binding mode of a novel series of DHODH inhibitors. *J. Med. Chem.* 49, 1239–1247, **2006**.
81. J.T. Madak, A. Bankhead, C.R. Cuthbertson, H.D. Showalter, N. Neamati; Revisiting the role of dihydroorotate dehydrogenase as a therapeutic target for cancer. *Pharmacol. Ther.* 195, 111–131, **2019**.
82. S. Liu, E.A. Neidhardt, T.H. Grossman, T. Ocain, J. Clardy; Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. *Structure.* 8, 25–33, **2000**.
83. P.K. Kraulis; MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 946–950, **1991**.
84. C.N. Alves, J.R.A. Silva, A.E. Roitberg; Insights into the mechanism of oxidation of dihydroorotate to orotate catalysed by human class 2 dihydroorotate dehydrogenase: a QM/MM free energy study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 17790–17796, **2015**.
85. M. Alcázar-Fabra, P. Navas, G. Brea-Calvo; Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 1857, 1073–1078, **2016**.
86. N.N. Ulusu; Evolution of Enzyme Kinetic Mechanisms. *J. Mol. Evol.* 80, 251–257, **2015**.
87. G.V. Chowdary, S.G. Prapulla; Kinetic study on lipase-catalyzed esterification in organic solvents. *Indian J. Chem.* 44, 2322–2327, **2005**.
88. M. Koundinya, J. Sudhalter, A. Courjaud, B. Lionne, G. Touyer, L. Bonnet, I. Menguy, I. Schreiber, C. Perrault, S. Vouquier, B. Benhamou, B. Zhang, T. He, Q. Gao, P. Gee, D. Simard, M.P. Castaldi, R. Tomlinson, S. Reiling, M. Barrague, R. Newcombe, H. Cao, Y. Wang, F. Sun, J. Murtie, M. Munson, E. Yang, D. Harper, M. Bouaboula, J. Pollard, C. Grepin, C. Garcia-Echeverria, H. Cheng, F. Adrian, C. Winter, S. Licht, I. Cornella-Taracido, R. Arrebola, A. Morris; Dependence on the pyrimidine biosynthetic enzyme DHODH is a synthetic lethal vulnerability in mutant KRAS-driven cancers. *Cell. Chem. Biol.* 25, 705–717, **2018**.
89. M.J.G.W. Ladds, I.M.M. Van Leeuwen, C.J. Drummond, S. Chu, A.R. Healy, G. Popova, A.P. Fernández, T. Mollick, S. Darekar, S.K. Sedimbi, M. Nekulova, M.C.C.

- Sachweh, J. Campbell, M. Higgins, C. Tuck, M. Popa, M.M. Safont, P. Gelebart, Z. Fandalyuk, A.M. Thompson, R. Svensson, A.-L. Gustavsson, L. Johansson, K. Färnegårdh, U. Yngve, A. Saleh, M. Haraldsson, A.C.A. D'Hollander, M. Franco, Y. Zhao, M. Håkansson, B. Walse, K. Larsson, E.M. Peat, V. Pelechano, J. Lunec, B. Vojtesek, M. Carmena, W.C. Earnshaw, A.R. McCarthy, N.J. Westwood, M. Arsenian-Henriksson, D.P. Lane, R. Bhatia, E. McCormack, S. Laín; A DHODH inhibitor increases p53 synthesis and enhances tumor cell killing by p53 degradation blockage. *Nat. Commun.* 9, 1107–1107, **2018**.
90. A.K.M. Fairus, B. Choudhary, S. Hosahalli, N. Kavitha, O. Shatrah; Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors affect ATP depletion, endogenous ROS and mediate S-phase arrest in breast cancer cells. *Biochimie.* 135, 154–163, **2017**.
91. J. Maroun, J. Ruckdeschel, R. Natale, R. Morgan, B. Dallaire, R. Sisk, J. Gyves; Multicenter phase II study of brequinar sodium in patients with advanced lung cancer. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 32, 64–66, **1993**.
92. S. Yin, T. Kabashima, Q. Zhu, T. Shibata, M. Kai; Fluorescence assay of dihydroorotate dehydrogenase that may become a cancer biomarker. *Sci. Rep.* 7, 40670, **2017**.
93. H. Zhai, B. Song, X. Xu, W. Zhu, J. Ju; Inhibition of autophagy and tumor growth in colon cancer by miR-502. *Oncogene.* 32, 1570–1579, **2013**.
94. Y. Chen, Q. Huang, H. Zhou, Y. Wang, X. Hu, T. Li; Inhibition of canonical WNT/  $\beta$ -catenin signaling is involved in leflunomide (LEF)-mediated cytotoxic effects on renal carcinoma cells. *Oncotarget.* 7, 50401–50416, **2016**.
95. S. Yin, T. Kabashima, Q. Zhu, T. Shibata, M. Kai; Fluorescence assay of dihydroorotate dehydrogenase that may become a cancer biomarker. *Sci. Rep.* 7, 1–7, **2017**.
96. S. Zhu, X. Yan, Z. Xiang, H.F. Ding, H. Cui; Leflunomide reduces proliferation and induces apoptosis in neuroblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One.* 8, 71555, **2013**.
97. X. Wang, K. Yang, Q. Wu, L.J.Y Kim, A.R. Morton, R.C. Gimple, B.C. Prager, Y. Shi, W. Zhou, S. Bhargava, Z. Zhu, L. Jiang, W. Tao, Z. Qiu, L. Zhao, G. Zhang, X. Li, S. Agnihotri, P.S. Mischel, S.C. Mack, S. Bao, J.N. Rich; Targeting pyrimidine synthesis accentuates molecular therapy response in glioblastoma stem cells. *Sci. Transl. Med.* 11, eaau4972, **2019**.
98. S. Sainas, A.C. Pippione, E. Lupino, M. Giorgis, P. Circosta, V. Gaidano, P. Goyal, D. Bonanni, B. Rolando, A. Cignetti, A. Ducime, M. Andersson, M. Järvå, R. Friemann, M. Piccinini, C. Ramondetti, B. Buccinnà, S. Al-Karadaghi, D. Boschi, G. Saglio, M.L. Lolli; Targeting myeloid differentiation using potent 2-hydroxypyrazolo[1,5-a]pyridine scaffold-based human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors. *J. Med. Chem.* 61, 6034–6055, **2018**.
99. Y. Zheng, S. Li, K. Song, J. Ye, W. Li, Y. Zhong, Z. Feng, S. Liang, Z. Cai, K. Xu; A broad antiviral strategy: Inhibitors of human DHODH pave the way for host-targeting antivirals against emerging and re-emerging viruses. *Viruses.* 14, 928–928, **2022**.
100. T. Ohishi, D.K. Inaoka, K. Kita, M. Kawada; Dihydroorotate dehydrogenase as a target for the development of novel helicobacter pylori-specific antimicrobials. *Chem. Pharm. Bull.* 66, 239–242, **2018**.
101. D. Boschi, A.C. Pippione, S. Sainas, M.L. Lolli; Dihydroorotate dehydrogenase inhibitors in anti-infective drug research. *Eur. J. Med. Chem.* 183, 111681, **2019**.
102. M.L. Lolli, S. Sainas, A.C. Pippione, M. Giorgis, D. Boschi, F. Dosio; Use of human dihydroorotate dehydrogenase (hDHODH) inhibitors in autoimmune diseases and new perspectives in cancer therapy. *Recent Pat. Anticancer Drug. Discov.* 13, 86–105, **2018**.

103. S.-F. Chen, F.W. Perella, D.L. Behrens, L.M. Papp; Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase activity by brequinar sodium. *Cancer Res.* 52, 3521–3527, **1992**.
104. C.L. Arteaga, T.D. Brown, J.G. Kuhn, H.-S.L. Shen, T.J. O'Rourke, K. Beougher, H.J. Brentzel, D.D. Von Hoff, G.R. Weiss; Phase I clinical and pharmacokinetic trial of Brequinar Sodium (DUP 785; NSC 368390). *Cancer Res.* 49, 4648–4653, **1989**.
105. D.A. Noe, E.K. Rowinsky, H.-S.L. Shen, B.V. Clarke, L.B. Grochow, W.B. McGuire, A. Hantel, D.B. Adams, M.D. Abeloff, D.S. Ettinger, R.C. Donehower; Phase I and pharmacokinetic study of Brequinar Sodium (NSC 368390). *Cancer Res.* 50, 4595–4599, **1990**.
106. D.L. Dexter, D.P. Hesson, R.J. Ardecky, G.V. Rao, D.L. Tippett, B.A. Dusak, K.D. Paull, J. Plowman, B.M. DeLarco, V. L. Narayanan, M. Forbes; Activity of a novel 4-quinolinecarboxylic acid, NSC 368390 [6-fluoro-2-(2'-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)-3-methyl-4-quinolinecarboxylic acid sodium salt], against experimental tumors. *Cancer Res.* 45, 5563–5568, **1985**.
107. R. Cody, D. Stewart, M. DeForni, M. Moore, B. Dallaire, N. Azarnia, J. Gyves; Multicenter phase II study of brequinar sodium in patients with advanced breast cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* 16, 526–528, **1993**.
108. P.F. Dodion, T. Wagener, G. Stoter, A. Drozd, L.M. Lev, T. Skovsgaard, J. Renard, F. Cavalli; Phase II trial with Brequinar (DUP-785, NSC 368390) in patients with metastatic colorectal cancer: a study of the early clinical trials group of the EORTC. *Ann. Oncol.* 1, 79–80, **1990**.
109. S. Urba, J. Doroshow, C. Cripps, F. Robert, E. Velez-Garcia, B. Dallaire, D. Adams, R. Carlson, A. Grillo-Lopez, J. Gyves; Multicenter phase II trial of brequinar sodium in patients with advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 31, 167–169, **1992**.
110. M. Moore, J. Maroun, F. Robert, R. Natale, J. Neidhart, B. Dallaire, R. Sisk, J. Gyves; Multicenter phase II study of brequinar sodium in patients with advanced gastrointestinal cancer. *Invest. New Drugs.* 11, 61–65, **1993**.
111. J. Maroun, J.R. Ruckdeschel, R. Morgan, B. Dallaire, R. Sisk, J. Gyves; Multicenter phase II study of brequinar sodium in patients with advanced lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32, 64–66, **1993**.
112. R. Natale, R. Wheeler, M. Moore, B. Dallaire, W. Lynch, R. Carlson, A. Grillo-Lopez, J. Gyves; Multicenter phase II trial of brequinar sodium in patients with advanced melanoma. *Ann. Oncol.* 3, 659–660, **1992**.
113. S.Y. King, A.M. Basista, G. Torosian; Self-association and solubility behaviors of a novel anticancer agent, brequinar sodium. *J. Pharm Sci.* 78, 95–100, **1989**.
114. D.B. Sykes; The emergence of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) as a therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Expert Opin. Ther. Targets.* 22, 893–898, **2018**.
115. M.S. Dorasamy, A. Ab, K. Nellore, P.F. Wong; Synergistic inhibition of melanoma xenografts by Brequinar sodium and Doxorubicin. *Biomed. Pharmacother.* 110, 29–36, **2019**.
116. Y.D. Fragoso, J.B.B. Brooks; Leflunomide and teriflunomide: altering the metabolism of pyrimidines for the treatment of autoimmune diseases. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 8, 315–320, **2015**.
117. A.H. Maghzi, M.K. Houtchens, P. Preziosa, C. Ionete, B.D. Beretich, J.M. Stankiewicz, S. Tauhid, A. Cabot, I. Berriosmorales, T.H.W. Schwartz, J.A. Sloane, M.S. Freedman, M. Filippi, H.L. Weiner, R. Bakshi; COVID-19 in teriflunomide-treated patients with multiple sclerosis. *J. Neurol.* 267, 2790–2796, **2020**.

118. L. Zhan, J. Zhang, J. Wang, C. Ren, P. Tang, L. Ouyang, Y. Wang; Recent advances of human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors for cancer therapy: Current development and future perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* 232, 114176, **2022**.
119. Y. Song, Y. Zhang, A.R. Lee, W.H. Huang, B. Chen, B. Palfey, J. Shaw; Comparison of two molecular scaffolds, 5-methylisoxazole-3-carboxamide and 5-methylisoxazole-4-carboxamide, *Curr. Pharm. Des.* 20, 146–152, **2014**.
120. C. M. Ferreira, E. Freire de Vasconcelos-Pereira, V. Marcon de Oliveira, P. Rippel Salgado, J. Américo Domingos, M. T. Ferreira Duenhas Monreal, E. M. Guerra-Shinohara, V. Terezinha Gubert; Hepatotoxicity associated with the use of teriflunomide in a patient with multiple sclerosis: A case report. *Medicine*, 100, e28246, **2021**.
121. S. Christian, C. Merz, L. Evans, S. Gradl, H. Seidel, A. Friberg, A. Eheim, P. Lejeune, K. Brzezinka, K. Zimmermann, S. Ferrara, H. Meyer, R. Lesche, D. Stoeckigt, M. Bauser, A. Haegebarth, D.B. Sykes, D.T. Scadden, J.-A. Losman, A. Janzer; The novel dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitor BAY 2402234 triggers differentiation and is effective in the treatment of myeloid malignancies. *Leukemia*. 33, 2403–2415, **2019**.
122. J. Zhou, J.Y. Quah, Y. Ng, J.-Y. Chooi, S.H.-M. Toh, B. Lin, T.Z. Tan, H. Hosoi, M. Osato, Q. Seet, A.G.L. Ooi, B. Lindmark, M. McHale, W.-J. Chng; ASLAN003, a potent dihydroorotate dehydrogenase inhibitor for differentiation of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 105, 2286–2297, **2020**.
123. S.F. Huntington, A. Kallam, F.G. Basile, D. Ulanet, H. Xu, F. Yin, M. Mobilia, M. Cooper, B. Shah, J.P. Leonard, G.R. Von Keudell, A.K. Gopal; AG-636 for the treatment of adults with advanced lymphoma: Initiation of a phase 1 clinical study. *Blood*. 134, 1286–1286, **2019**.
124. J. Luban, R.A. Sattler, E. Mühlberger, J.D. Graci, L. Cao, M. Weetall, C. Trotta, J.M. Colacino, S. Bavari, C. Strambio-De-Castillia, E.L. Suder, Y. Wang, V. Soloveva, K. Cintron-Lue, N.A. Naryshkin, M. Pykett, E.M. Welch, K. O’Keefe, R. Kong, E. Goodwin, A. Jacobson, S. Paessler, S.W. Peltz; The DHODH inhibitor PTC299 arrests SARS-CoV-2 replication and suppresses induction of inflammatory cytokines. *Virus Res.* 292, 198246, **2021**.
125. R. Xiong, L. Zhang, S. Li, Y. Sun, M. Ding, Y. Wang, Y. Zhao, Y. Wu, W. Shang, X. Jiang, J. Shan, Z. Shen, Y. Tong, L. Xu, Y. Chen, Y. Liu, G. Zou, D. Lavillete, Z. Zhao, R. Wang, L. Zhu, G. Xiao, K. Lan, H. Li, K. Xu; Novel and potent inhibitors targeting DHODH are broad-spectrum antiviral against RNA viruses including newly-emerged coronavirus SARS-CoV-2. *Protein. Cell.* 11, 723–739, **2020**.
126. P. Das, X. Deng, L. Zhang, M.G. Roth, B.M.A. Fontoura, M.A. Phillips, J.K. De Brabander; SAR-based optimization of a 4-quinoline carboxylic acid analogue with potent antiviral activity. *ACS Med. Chem. Lett.* 4, 517–521, **2013**.
127. F. Hahn, C. Wangen, S. Häge, A.S. Peter, G. Dobler, B. Hurst, J. Julander, J. Fuchs, Z. Ruzsics, K. Überla, H.-M. Jäck, R. Ptak, A. Muehler, M. Gröppel, D. Vitt, E. Peelen, H. Kohlhof, M. Marschall; IMU-838, a developmental DHODH inhibitor in phase II for autoimmune disease, shows anti-SARS-CoV-2 and broad-spectrum antiviral efficacy *in vitro*. *Viruses*. 12, 1394–1394, **2020**.
128. I. Fritzon, B. Svensson, S. Al-Karadaghi, B. Walse, U. Wellmar, U.J. Nilsson, D.D.G. Thrige, S. Jönsson; Inhibition of human DHODH by 4-hydroxycoumarins, fenamic acids, and N-(alkylcarbonyl)anthranilic acids identified by structure-guided fragment selection. *ChemMedChem*. 5, 608–617, **2010**.

129. S. Liu, E.A. Neidhardt, T.H. Grossman, T. Ocain, J. Clardy; Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. *Structure*. 8, 25–33, **2000**.
130. S.F. Chen, L.M. Papp, R.J. Ardecky, G.V. Rao, D.P. Hesson, M. Forbes, D.L. Dexter; Structure-activity relationship of quinoline carboxylic acid. *Biochem. Pharmacol.* 40, 709–714, **1990**.
131. J.A. Arnott, S.L. Planey; The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opin. Drug Discov.* 7, 863–875, **2012**.
132. L. Di, E.H. Kerns; Profiling drug-like properties in discovery research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 402–408, **2003**.
133. J.E. Comer; High-throughput measurement of logD and pKa, Chapter 2. In: H. Van De Waterbeemd et al. (Eds.), *Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption, and bioavailability*. Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
134. E. H. Kerns, L. Di, G. T. Carter; *In vitro* solubility assays in drug discovery. *Curr. Drug Metab.* 9, 879–885, **2008**.
135. L. Di, P.V. Fish, T. Mano; Bridging solubility between drug discovery and development. *Drug Discov. Today*. 17, 486–495, **2012**.
136. L. Zhou, L. Yang, S. Tilton, J. Wang; Development of a high throughput equilibrium solubility assay using miniaturized shake-flask method in early drug discovery. *J. Pharm. Sci.* 96, 3052–3071, **2007**.
137. J. Alsenz, M. Kansy; High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 546–567, **2007**.
138. M. Stuart, K. Box; Chasing equilibrium: measuring the intrinsic solubility of weak acids and bases. *Anal. Chem.* 77, 983–990, **2005**.
139. A. Glomme, J. März, J. Dressman; Comparison of a miniaturized *shake flask* solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated properties. *J. Pharm. Sci.* 94, 1–16, **2005**.
140. S. Kumar, S. Bawa, H. Gupta; Biological activities of quinoline derivatives. *Mini. Rev. Med. Chem.* 9, 1648–1654, **2009**.
141. D.B. Patel, R.H. Vekariya, K.D. Patel, N.P. Prajapati, M.S. Vasava, H.D. Patel; Recent advances in synthesis of quinoline-4-carboxylic acid and their biological evaluation: A review. *J. chem. pharm.* 9, 216–230, **2017**.
142. Q. Lv, L. Fang, P. Wang, C. Lu, F. Yan; A simple one-pot synthesis of quinoline-4-carboxylic acid derivatives by Pfitzinger reaction of isatin with ketones in water. *Monatsh. Chem.* 144, 391–394, 2013.
143. L.A. Casey, R. Galt, M.I. Page; The mechanisms of hydrolysis of the  $\gamma$ -lactam isatin and its derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*. 1,23–28, **1993**.
144. K. Lackey, D.D. Sternbach; Synthesis of substituted quinoline-4-carboxylic acids. *Synthesis*, 10, 993–997, **1993**.
145. N. P. Buu-Hoi, R. Royer, N.D. Xuong, P. Jacquignon; The Pfitzinger reaction in the synthesis of quinoline derivatives. *J. Org. Chem.* 9, 1209–1224, **1953**.
146. N. Milhazes, T. Cunha-Oliveira, P. Martins, J. Garrido, C. Oliveira, C. Rego, F. Borges; Synthesis and cytotoxic profile of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”) and its metabolites on undifferentiated PC12 cells: a putative structure-toxicity relationship. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1294–1304, **2006**.
147. M.S. Dorasamy, B. Choudhary, K. Nellore, H. Subramanya, P.F. Wong; Dihydroorotate dehydrogenase inhibitors target c-myc and arrest melanoma, myeloma and lymphoma cells at S-phase. *J. Cancer* 8, 3086–3098, **2017**.
148. J.T. Madak, C.R. Cuthbertson, Y. Miyata, S. Tamura, E.M. Petrunak, J.A. Stuckey, Y. Han, M. He, D. Sun, H.D. Showalter, N. Neamati; Design, synthesis, and biological

- evaluation of 4-quinoline carboxylic acids as inhibitors of dihydroorotate dehydrogenase. *J. Med. Chem.* 61, 5162–5186, **2018**.
- 149.** G. Indrayanto, G. Satrio Putra, F. Suhud; Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* 46, 273–307, **2021**.
- 150.** S.-F. Chen, L.M. Papp, R.J. Ardecky, G.V. Rao, D.P. Hesson, M. Forbes, D.L. Dexter; Structure-activity relationship of quinoline carboxylic acids. A new class of inhibitors of dihydroorotate dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 40, 709–714, **1990**.
- 151.** Y. Pan; The dark side of fluorine. *ACS Med. Chem. Lett.* 10, 1016–1019, **2019**.
- 152.** S. Flis, J. Splwinski; Inhibitory effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on human colorectal cancer cell survival are synergistically enhanced by sulindac sulfide. *Anticancer Res.* 29, 435–441, **2009**.
- 153.** B. Jeffries, Z. Wang, J. Graton, S.D. Holland, T. Brind, R.D.R. Greenwood, J.-Y. Le Questel, J.S. Scott, E. Chiarparin, B. Linclau; Reducing the lipophilicity of perfluoroalkyl groups by CF<sub>2</sub>-F/CF<sub>2</sub>-Me or CF<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub> exchange. *J. Med. Chem.* 6, 10602–10618, **2018**.
- 154.** A. Rodriguez-Tebar, V. Aran, D. Vazques; Labelling and cross-linking of Escherichia coli penicillin-binding proteins with bis-β-lactam antibiotics. *Eur. J. Biochem.* 139, 287–293, **1984**.
- 155.** N. Mihailovic, V. Markovic, I.Z. Matic, N.S. Stanisavljevic, Ž.S. Jovanovic, S. Trifunovic, Lj. Joksovic; Synthesis and antioxidant activity of 1,3,4-oxadiazoles and their diacylhydrazine precursors derived from phenolic acids. *RSC Adv.* 7, 8550–8560, **2017**.
- 156.** A. Rammohan, J. S. Reddy, G. Sravya, C. N. Rao, G.V. Zyryanov; Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. *Environ. Chem. Lett.* 18, 433–458, **2020**.
- 157.** F.A.M. Mamdouh, G.E.-D.A. Abuo-Rahma; Molecular targets and anticancer activity of quinoline-chalcone hybrids: literature review. *RSC Adv.* 10, 31139–31155, **2020**.
- 158.** L.A. Casey, R. Galt, M. I. Page; The mechanisms of hydrolysis of the γ-lactam isatin and its derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1, 23–28, **1993**.
- 159.** H. Mirzaei, S. Emami; Recent advances of cytotoxic chalconoids targeting tubulin polymerization: Synthesis and biological activity. *Eur. J. Med. Chem.* 12, 610–639, **2016**.
- 160.** S. Sainas, A.C. Pippione, E. Lupino, M. Giorgis, P. Circosta, V. Gaidano, P. Goyal, D. Bonanni, B. Rolando, A. Cignetti, A. Ducime, M. Andersson, M. Järvå, R. Friemann, M. Piccinini, C. Ramondetti, B. Buccinnà, S. Al-Karadaghi, D. Boschi, G. Saglio, M.L. Lolli; Targeting myeloid differentiation using potent 2-hydroxypyrazolo[1,5-a]pyridine scaffold-based human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors. *J. Med. Chem.* 61, 6034–6055, **2018**.
- 161.** J. Rak, B. Dejllova, H. Lamplova, R. Kapláneek, P. Matejicek, P. Cigler, V. Kral; On the solubility and lipophilicity of metallacarborane pharmacophores. *Mol. Pharmaceutics.* 10, 1751–1759, **2013**.
- 162.** M.S. Kaynak, S. Sahin; Development and validation of a RP-HPLC method for determination of solubility of furosemide. *Turk. J. Pharm. Sci.* 10, 25–34, **2013**.
- 163.** E. Chacon, D. Acosta, J.J. Lemasters; Primary cultures of cardiac myocytes as *in vitro* models for pharmacological and toxicological assessments. *In vitro methods in pharmaceutical research.* eBook ISBN: 9780080534602, 9, 209–223, **1997**.
- 164.** O. Trott, A.J. Olson; AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31, 455–461, **2010**.

- 165.** M. Mladenovic, A. Patsilnakos, A. Pirolli, M. Sabatino, R. Ragno; Understanding the molecular determinant of reversible human monoamine oxidase B inhibitors containing 2*H*-chromen-2-one core: structure-based and ligand-based derived three-dimensional quantitative structure-activity relationships predictive models. *J. Chem. Inf. Model.* 57, 787–814, **2017**.
- 166.** E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin; UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612, **2004**.
- 167.** D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Götz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R. M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, P.A. Kollman. AMBER 12, University of California, San Francisco, **2012**.





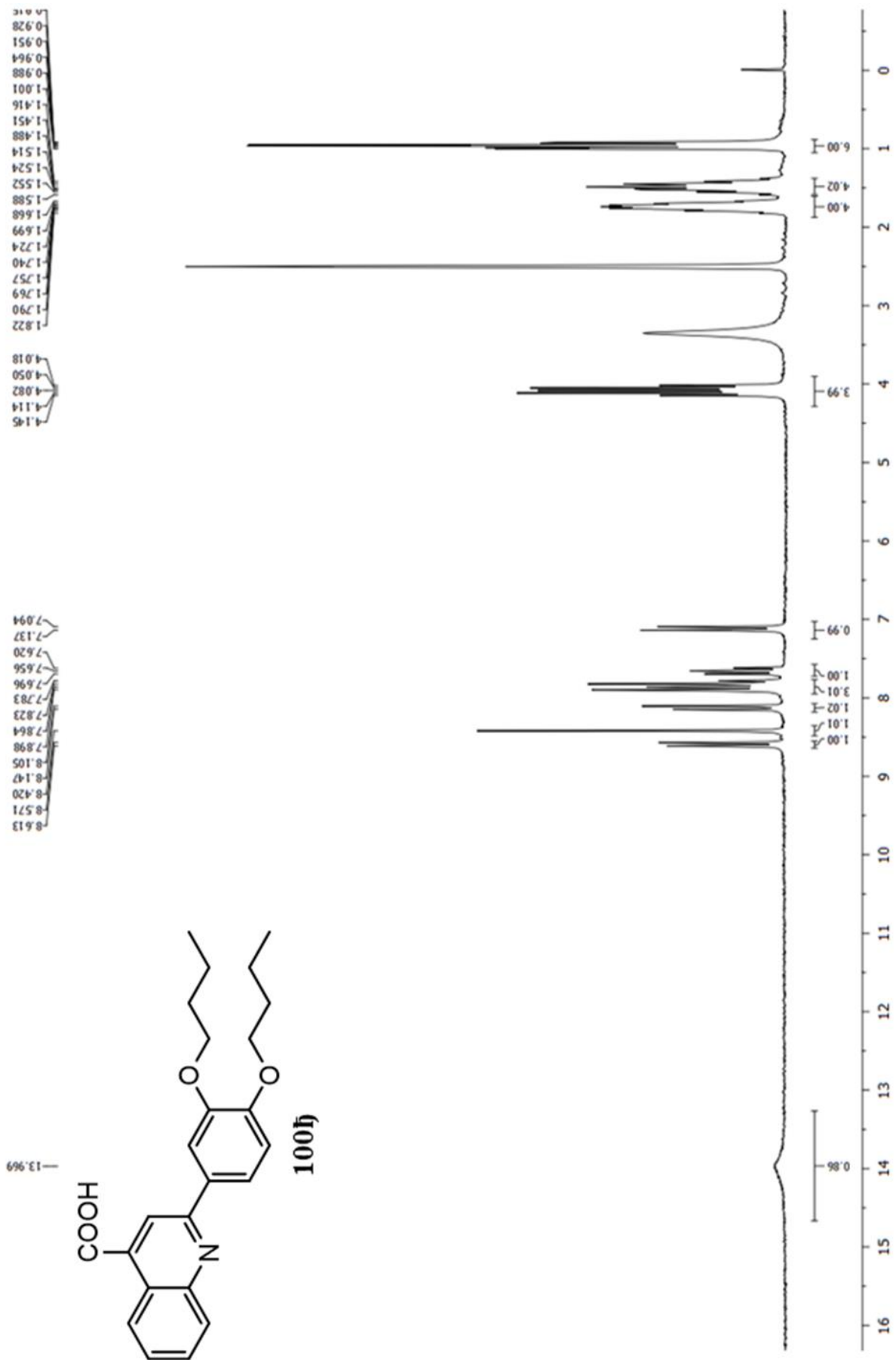
## ***6. ПРИЛОГ***



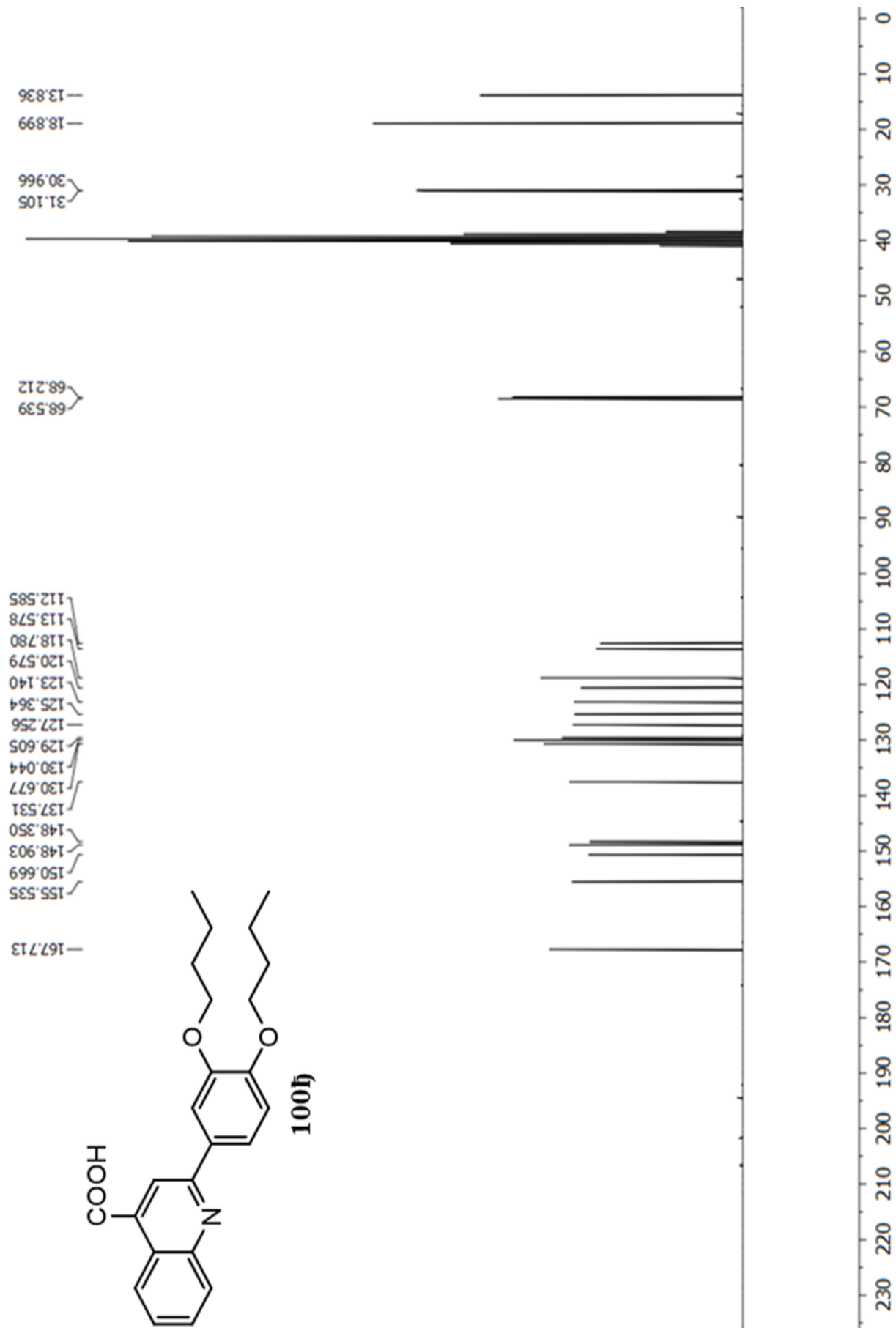
6.1.  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR спектри за **100ђ-е**, **104и** и **107г**, HPLC хроматограм и HRMS спектар високе резолуције за **107г**



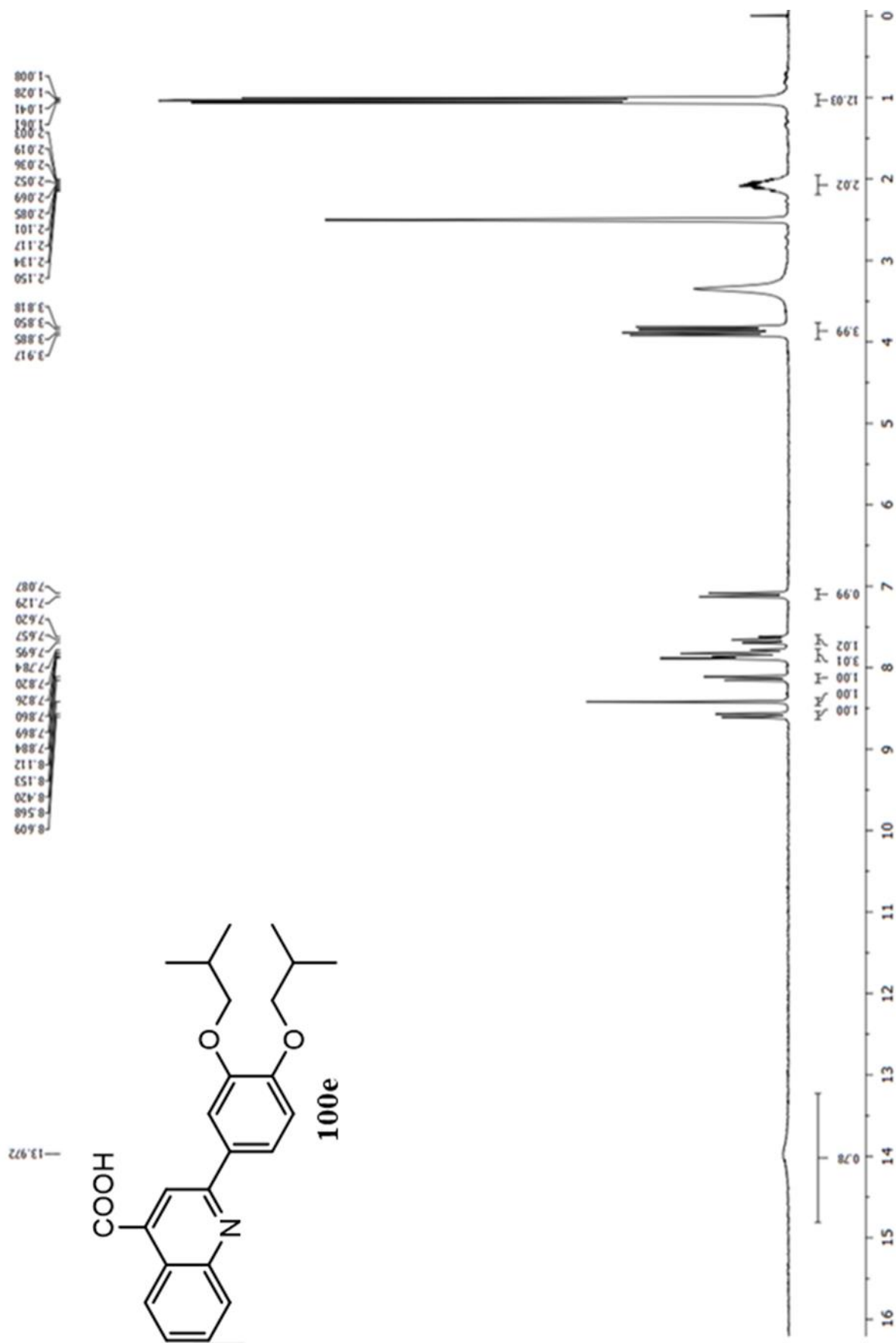
Слика III. <sup>1</sup>H NMR спектар једињења **100h** у DMSO-d<sub>6</sub>.



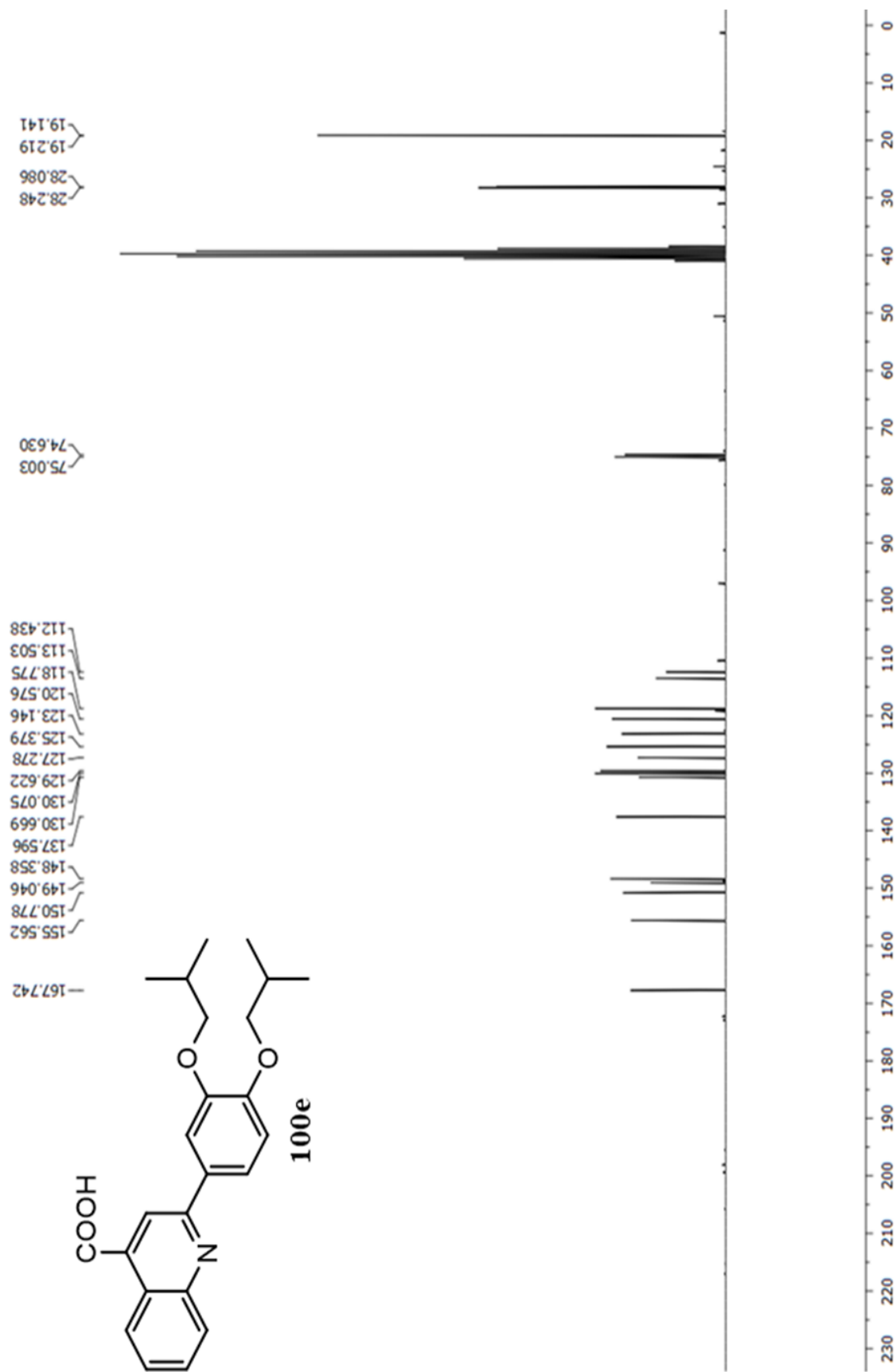
Слика П2. <sup>13</sup>C NMR спектар једињења **100f** у DMSO-d<sub>6</sub>.



Слика ПЗ. <sup>1</sup>H NMR спектар једињења **100e** у DMSO-d<sub>6</sub>.



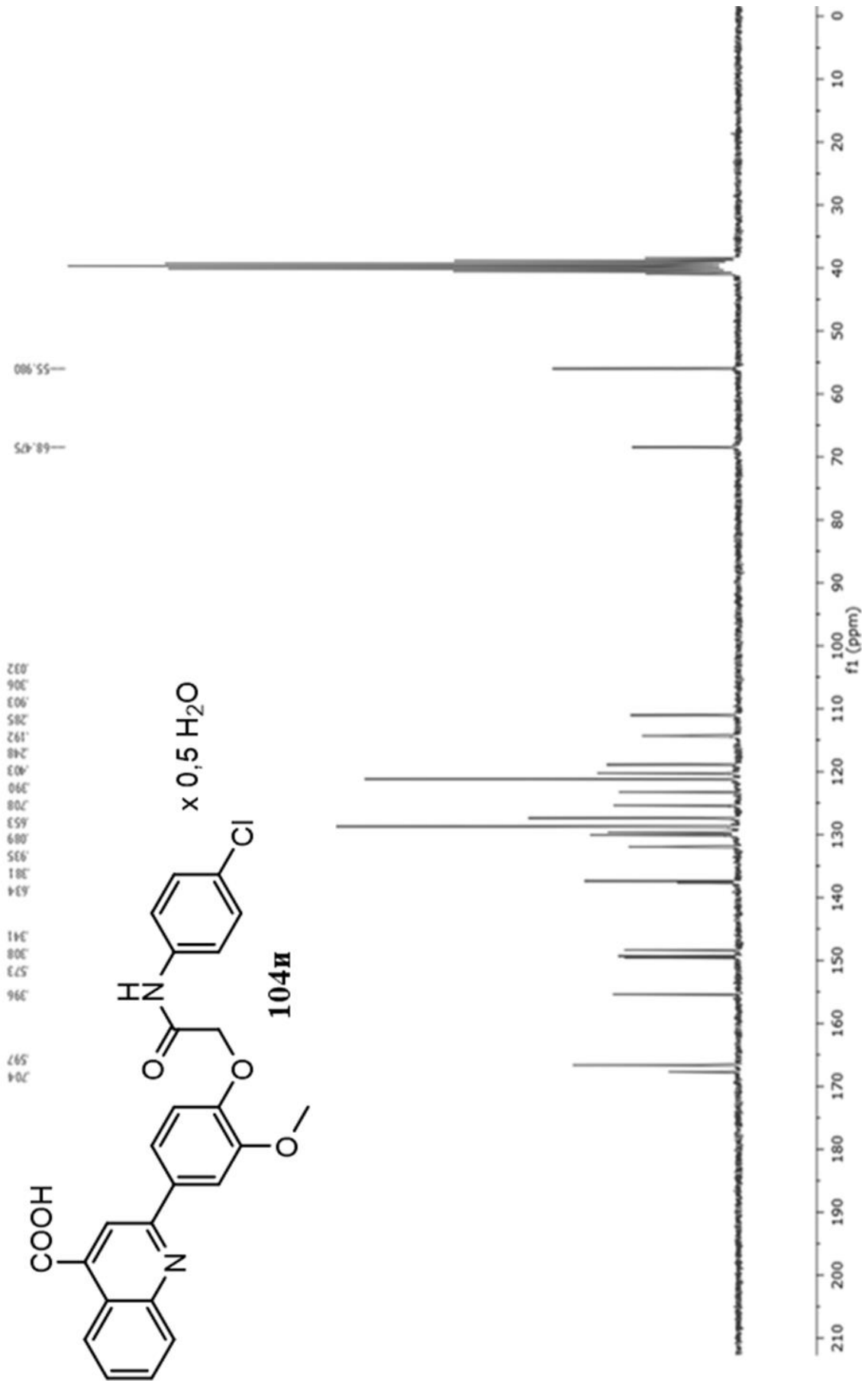
Слика П4.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар једињења **100e** у  $\text{DMSO-}d_6$ .



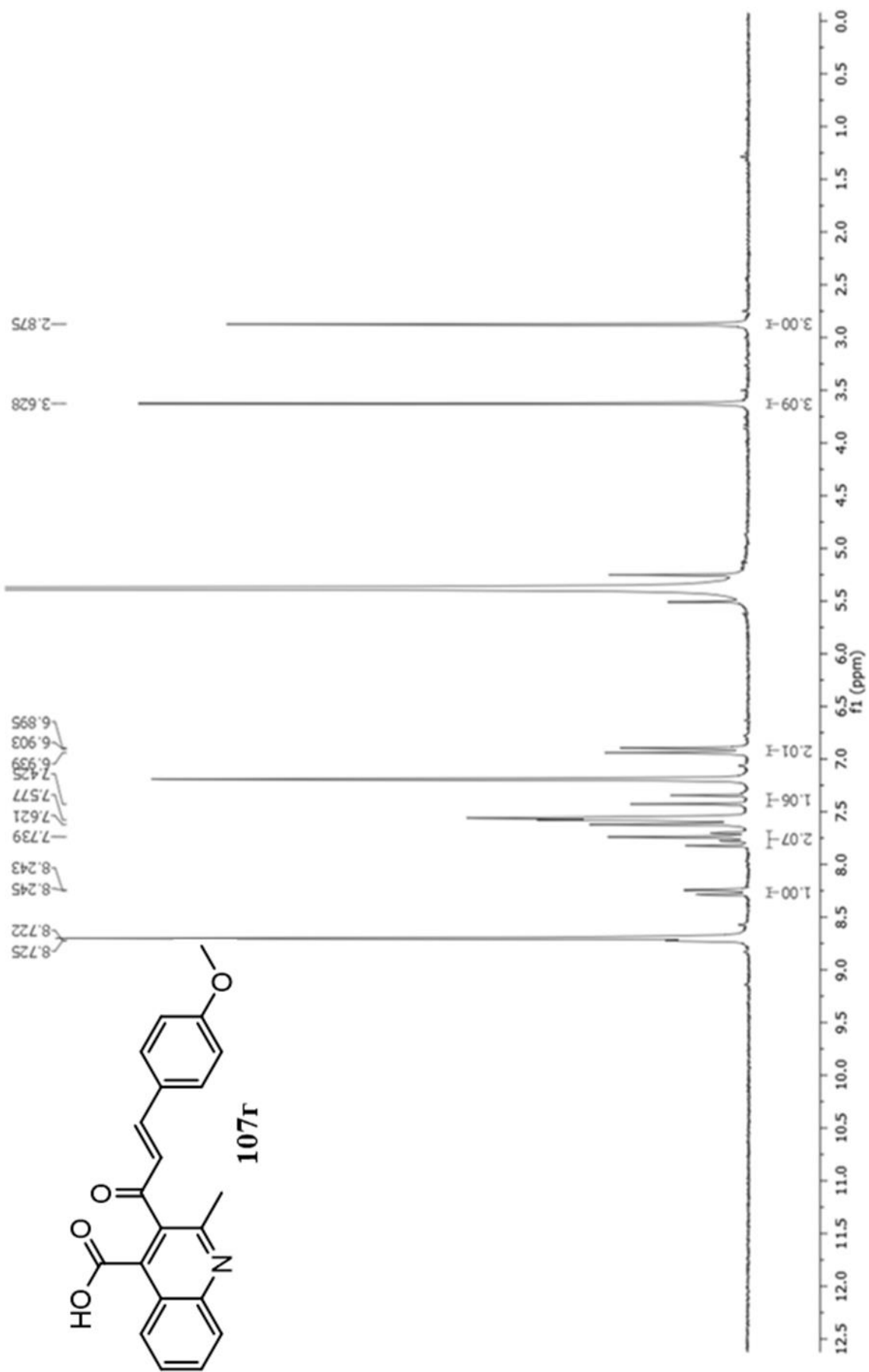




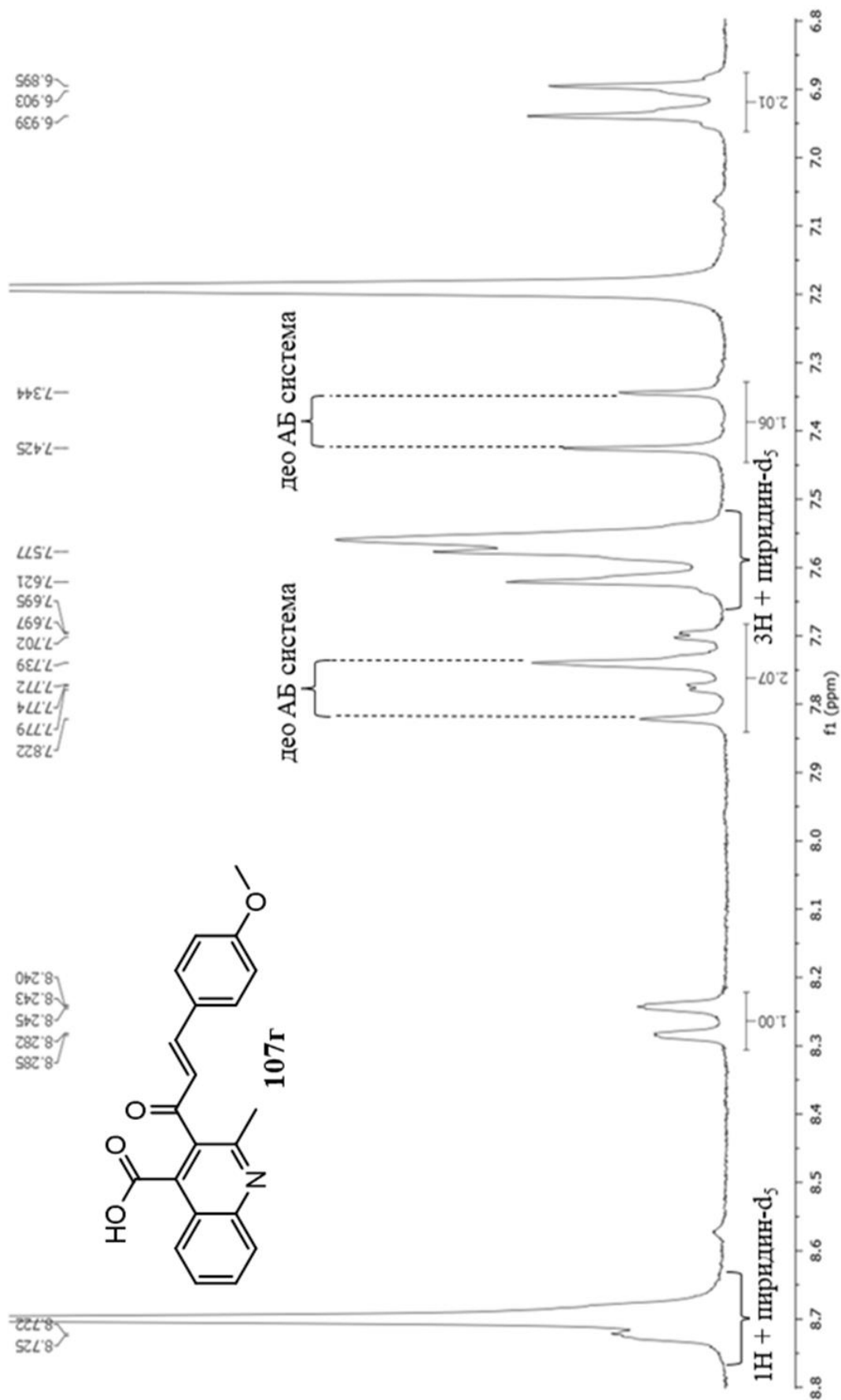
Слика П6.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар једињења **104и** у  $\text{DMSO-}d_6$ .



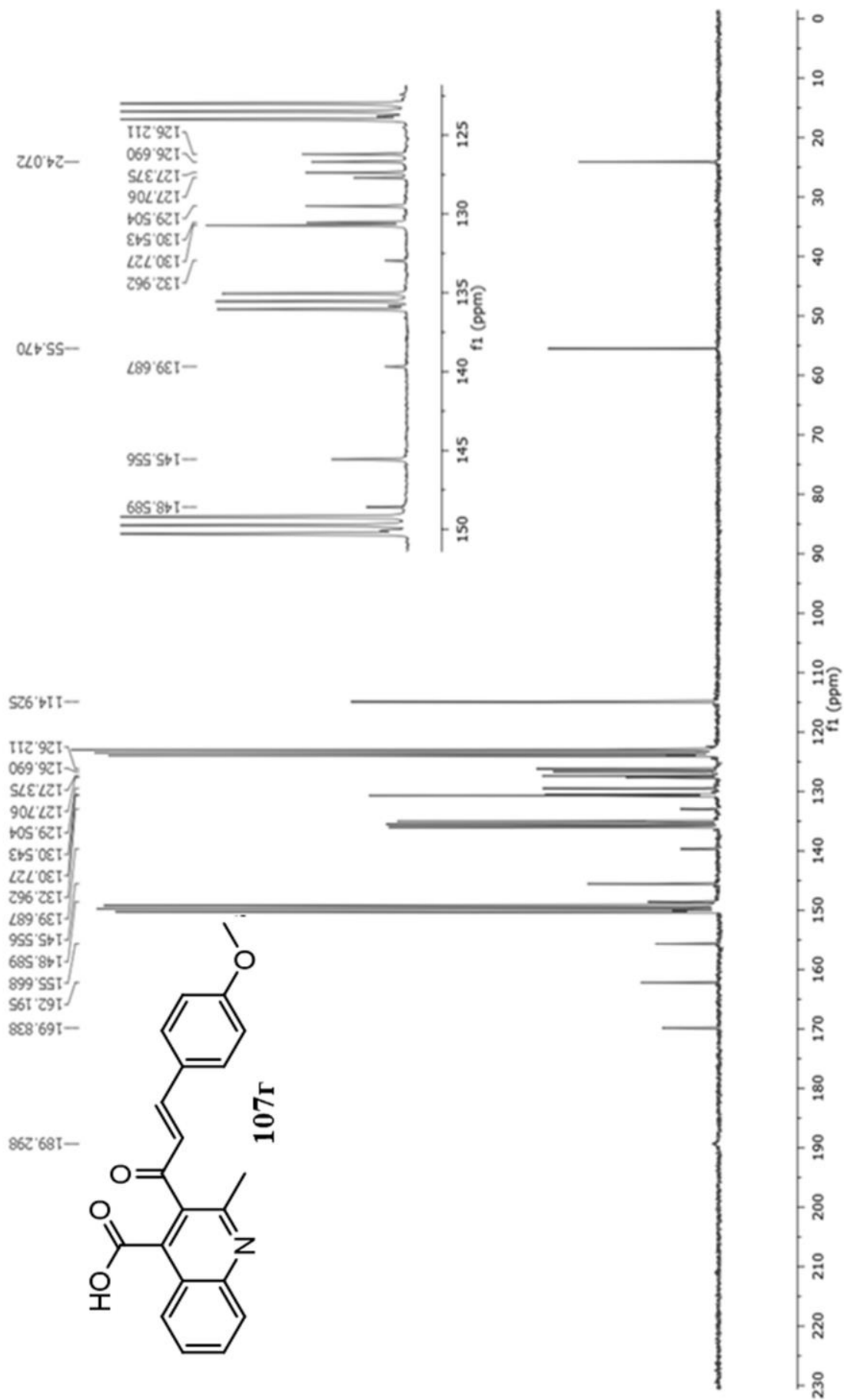
Слика П7. <sup>1</sup>H NMR спектар једињења **107Г** у деутериоириду.

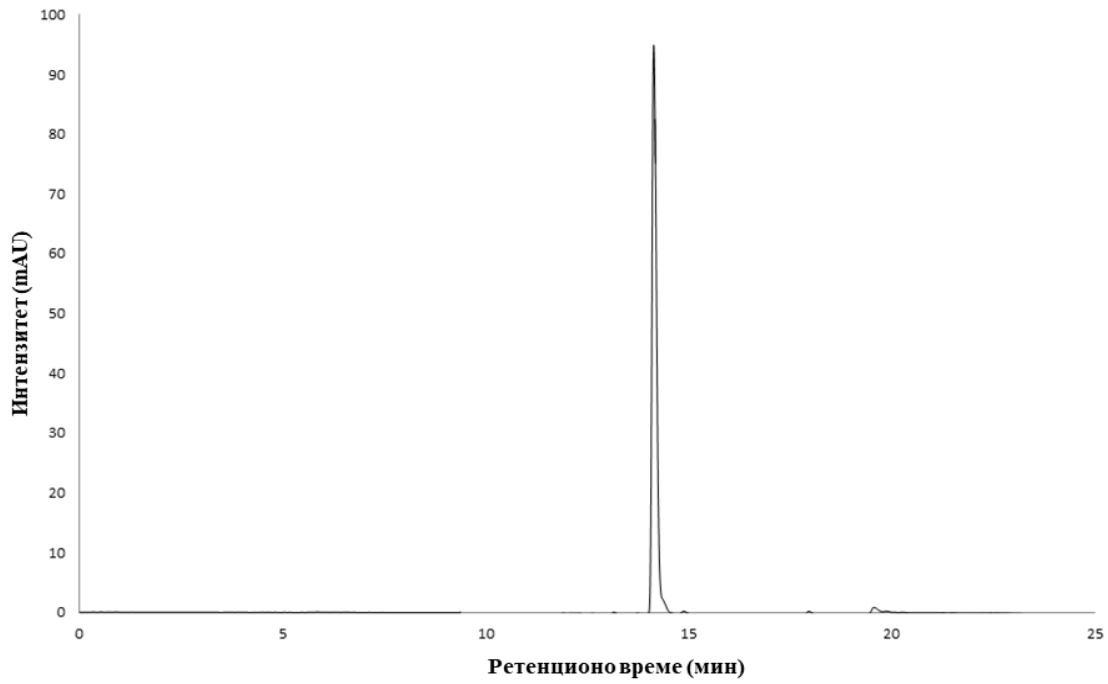


Слика П8. Инсертовани  $^1\text{H}$  NMR спектар једињења **107Г** у деутеропиридину.

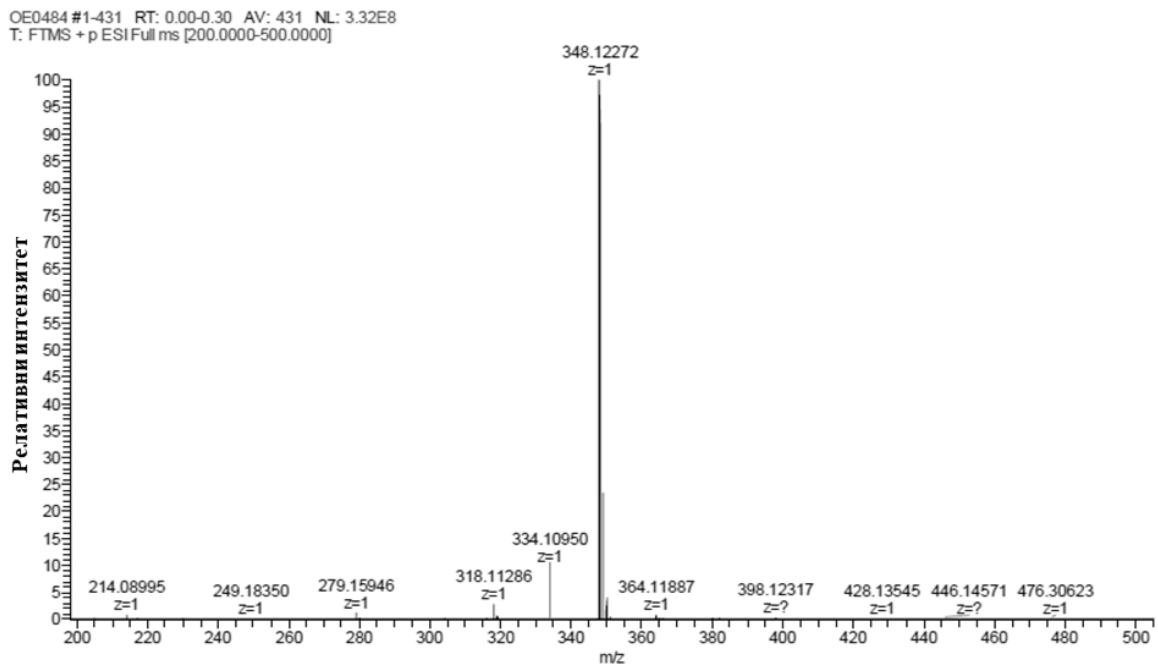


Слика П9.  $^{13}\text{C}$  NMR спектар једињења **107Г** у деутеропиридину.





Слика П10. HPLC хроматограм једињења 107г.



Слика П11. HRMS спектар једињења 107г.

## 6.2. Публиковани научни radovi u kojima su prezentovani rezultati doktorske disertacije







# Potent human dihydroorotate dehydrogenase inhibitory activity of new quinoline-4-carboxylic acids derived from phenolic aldehydes: Synthesis, cytotoxicity, lipophilicity and molecular docking studies

Milena M. Petrović<sup>a</sup>, Cornelia Roschger<sup>b</sup>, Sidrah Chaudary<sup>b</sup>, Andreas Zierer<sup>b</sup>, Milan Mladenović<sup>a</sup>, Katarina Jakovljević<sup>a</sup>, Violeta Marković<sup>a</sup>, Bruno Botta<sup>c</sup>, Milan D. Joksović<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Sciences, Department of Chemistry, University of Kragujevac, R. Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> University Clinic for Cardiac-, Vascular- and Thoracic Surgery, Medical Faculty, Johannes Kepler University Linz, Krankenhausstraße 7a, 4020 Linz, Austria

<sup>c</sup> Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, P.le Aldo Moro 5, 00185 Roma, Italy

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)  
hDHODH inhibitors  
Quinoline-4-carboxylic acid  
Cytotoxicity  
Lipophilicity  
Molecular docking

## ABSTRACT

A series of novel 2-substituted quinoline-4-carboxylic acids was synthesized by Doebner reaction starting from freely available protocatechuic aldehyde and vanillin precursors. Human dihydroorotate dehydrogenase (hDHODH) was recognised as a clear molecular target for these heterocycles. All compounds were also tested for their antiproliferative potential against three cancer cells (MCF-7, A549, A375) and one normal cell line (HaCaT) to evaluate the selective cytotoxicity. Quinoline derivatives **3f** and **3g** were identified as potent hDHODH inhibitors while **3k** and **3l** demonstrated high cytotoxic activity against MCF-7 and A375 cells and good selectivity. In addition, the logD<sub>7.4</sub> values obtained by the experimental method were found to be in the range from -1.15 to 1.69. The chemical structures of all compounds were confirmed by IR, NMR and elemental analysis. The compounds pharmacology on the molecular level was revealed by means of molecular docking, highlighting the structural differences that distinguish highly active from medium and low active hDHODH inhibitors.

## 1. Introduction

Human dihydroorotate dehydrogenase (hDHODH), as one of the most important enzymes in sustaining the proliferation of cancer cells, represents a good target for chemotherapeutic drugs [1]. In the fourth step of the *de novo* biosynthesis of pyrimidines, this redox enzyme catalyses the oxidation of dihydroorotate to orotate mediated by flavin mononucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide or ubiquinone. This essential conversion allows cells to synthesize uridine monophosphate, a vital building block in the formation of ribonucleosides and deoxyribonucleosides for RNA and DNA synthesis [2,3]. In the proliferation stage, the cells depend on *de novo* nucleoside biosynthesis and as a result, DHODH is frequently overexpressed in cancer cells to support their growth. Moreover, DHODH is not only considered as a key enzyme in the treatment of cancer, but also a potential target for malaria [4], viral [5] and autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis or multiple sclerosis [6].

The essential role of pyrimidine nucleotides for cell proliferation and multiplication determines hDHODH as the main target for design and synthesis of new drug candidates. In an increased demand for DNA, RNA, glycoproteins and membrane lipids, proliferating cells depend heavily on pyrimidine biosynthesis pathway [7]. Inhibition of hDHODH causes an insufficient concentration of pyrimidine nucleotides required for continued growth and in turn triggers various cytotoxic, antimalarial, antifungal and immunosuppressive activities [8,9].

Various hDHODH inhibitors have been synthesized, out of which brequinar, leflunomide and its active metabolite teriflunomide have gained a lot of interest over the several past decades (Fig. 1). Leflunomide, an isoxazole-based prodrug, is FDA approved for rheumatoid and psoriatic arthritis, while teriflunomide is FDA approved for multiple sclerosis [10]. Brequinar is a fluorinated quinoline-4-carboxylic acid derivative with potent antineoplastic activity in numerous *in vitro* experiments and cancer models. Despite of the impressive preclinical evaluation, brequinar did not meet objective response in multiple phase

\* Corresponding author.

E-mail address: [mjoksovic@kg.ac.rs](mailto:mjoksovic@kg.ac.rs) (M.D. Joksović).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104373>

Received 10 March 2020; Received in revised form 25 September 2020; Accepted 8 October 2020

Available online 12 October 2020

0045-2068/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.





## Low cytotoxic quinoline-4-carboxylic acids derived from vanillin precursors as potential human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors

Milena M. Petrović<sup>a</sup>, Cornelia Roschger<sup>b</sup>, Sidrah Chaudary<sup>b</sup>, Andreas Zierer<sup>b</sup>,  
Milan Mladenović<sup>a</sup>, Violeta Marković<sup>a</sup>, Snežana Trifunović<sup>c</sup>, Milan D. Joksović<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, R. Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> University Clinic for Cardiac-, Vascular- and Thoracic Surgery, Medical Faculty, Johannes Kepler University Linz, Krankenhausstraße 7a, 4020 Linz, Austria

<sup>c</sup> Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, P.O. Box 158, 11000 Belgrade, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Dihydroorotate dehydrogenase  
hDHODH inhibitors  
Quinoline-4-carboxylic acids  
Lipophilicity  
Molecular docking

### ABSTRACT

Twenty novel 2-substituted quinoline-4-carboxylic acids bearing amide moiety were designed and synthesized by Doebner reaction. Human dihydroorotate dehydrogenase (hDHODH) was recognized as a biological target and all compounds were screened as potential hDHODH inhibitors in an enzyme inhibition assay. The prepared heterocycles were also evaluated for their cytotoxic effects on the healthy HaCaT cell line while lipophilic properties were considered on the basis of experimentally determined logD values at physiological pH. The most promising compound **5j**, with chlorine at *para*-position of terminal phenyl ring, showed good hDHODH inhibitory activity, low cytotoxicity, and optimal lipophilicity. The bioactive conformation of **5j** on the hDHODH, determined by means of molecular docking, revealed the compound's pharmacology and provide guidelines for further lead optimization.

The oxidation of dihydroorotate to orotate and subsequent Flavin mononucleotide regeneration are essential biological processes in the pyrimidine biosynthesis pathway.<sup>1</sup> The only mitochondrial membrane-associated enzyme, dihydroorotate dehydrogenase (hDHODH), catalyzes this redox reaction using ubiquinone in the role of terminal oxidant from the mitochondrial electron transfer chain. As a result of this conversion, the cells synthesize uridine monophosphate, a vital building precursor for the formation of ribonucleosides and deoxyribonucleosides.<sup>2</sup> Having in mind the significance of pyrimidine nucleotide for cellular metabolism, blocking the pyrimidine synthesis pathway by inhibiting hDHODH, could be a promising way in the treatment of cancer,<sup>3</sup> malarial and anti-infective diseases,<sup>4-5</sup> rheumatoid arthritis, psoriasis, and various autoimmune diseases.<sup>6-7</sup>

The articles published in the last two years pointed out hDHODH as a new target in antiviral therapy against RNA viruses, such as SARS-CoV-2.<sup>8</sup> Virus-infected cells have high metabolic activity and are very dependant on hDHODH for their supply of pyrimidine nucleotides. Thus, the inhibition of pyrimidine biosynthesis is recognized to achieve an antiviral effect by prevention of viral genome replication and inhibition of virus RNA transcription blocking the formation of viral proteins. In the light of these observations, several potent inhibitors targeting

hDHODH (PTC299, S312, S416) with promising antiviral activity were synthesized and tested against SARS-CoV-2 coronavirus<sup>9-10</sup> (Fig. 1). Moreover, the well-known FDA-approved hDHODH inhibitor, Leflunomide, and its active metabolite Teriflunomide, used in the treatment of rheumatoid arthritis and multiple sclerosis, have also shown antiviral action against SARS-CoV-2.<sup>11</sup> Another hDHODH inhibitor, Na-Brequinar did not pass the phase II clinical trials for solid tumors because of its poor solubility, increased concentration in blood, and formation of molecular aggregates.<sup>3</sup> One of the most potent hDHODH inhibitors containing quinoline-4-carboxylic acid moiety is the antiviral C44 with diaryl ether linkage and sufficient hydrophobicity required for excellent enzyme inhibition.<sup>12</sup> In addition, ether and ester derivatives of quinoline-4-carboxylic acids exhibited good hDHODH inhibition activity and *in vitro* antiproliferative action against colorectal adenocarcinoma HT-29 and breast MDA-MB-231 cancer cells.<sup>13</sup>

In the previous paper, we tested a series of quinoline-4-carboxylic acids derived from alkylated phenolic aldehydes for their hDHODH inhibitory activity and cytotoxicity against normal HaCaT cell line.<sup>14</sup> The introduction of hydrophobic groups at 3' and 4' position demonstrated better hDHODH inhibition, increasing the cytotoxic activity of these compounds towards healthy cells at the same time. Our intention

\* Corresponding author.

E-mail address: [mjoksovic@kg.ac.rs](mailto:mjoksovic@kg.ac.rs) (M.D. Joksović).

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128194>


Received 14 May 2021; Received in revised form 3 June 2021; Accepted 6 June 2021

Available online 8 June 2021

0960-894X/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.



# Synthesis and biological evaluation of new quinoline-4-carboxylic acid-chalcone hybrids as dihydroorotate dehydrogenase inhibitors

Milena M. Petrović<sup>1</sup> | Cornelia Roschger<sup>2</sup> | Kevin Lang<sup>2</sup> | Andreas Zierer<sup>2</sup> |  
Milan Mladenović<sup>1</sup> | Snežana Trifunović<sup>3</sup> | Boris Mandić<sup>3</sup> | Milan D. Joksović<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup>Medical Faculty, Johannes Kepler University Linz, University Clinic for Cardiac-, Vascular- and Thoracic Surgery, Linz, Austria

<sup>3</sup>Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

## Correspondence

Milan D. Joksović, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovica 12, Kragujevac 34000, Serbia.  
Email: [mjoksovic@kg.ac.rs](mailto:mjoksovic@kg.ac.rs)

## Funding information

Serbian Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Contract numbers: 451-03-68/2022-14/200122 and 451-03-68/2022-14/200168); FP7 RegPot project FCUB ERA GA No. 256716

## Abstract

Fourteen novel quinoline-4-carboxylic acid-chalcone hybrids were obtained via Claisen–Schmidt condensation and evaluated as potential human dihydroorotate dehydrogenase (hDHODH) inhibitors. The ketone precursor **2** was synthesized by the Pfitzinger reaction and used for further derivatization at position 3 of the quinoline ring for the first time. Six compounds showed better hDHODH inhibitory activity than the reference drug leflunomide, with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.12 to 0.58 μM. The bioactive conformations of the compounds within hDHODH were resolved by means of molecular docking, revealing their tendency to occupy the narrow tunnel of hDHODH within the N-terminus and to prevent ubiquinone as the second cofactor from easily approaching the flavin mononucleotide as a cofactor for the redox reaction within the redox site. The results of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay revealed that **4d** and **4h** demonstrated the highest cytotoxic activity against the A375 cell line, with IC<sub>50</sub> values of 5.0 and 6.8 μM, respectively. The lipophilicity of the synthesized hybrids was obtained experimentally and expressed as logD<sub>7.4</sub> values at physiological pH while the solubility assay was conducted to define physicochemical characteristics influencing the ADMET properties.

## KEYWORDS

chalcones, dihydroorotate dehydrogenase, hDHODH inhibitors, quinoline-4-carboxylic acid

## 1 | INTRODUCTION

Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) is located in the inner mitochondrial membrane and represents one of the most important flavin-dependent enzymes, playing a significant role in the de novo biosynthesis of pyrimidine nucleotides. The fourth step of this biosynthesis pathway is catalyzed by DHODH, a rate-limiting enzyme responsible for the oxidation of dihydroorotate to orotate.<sup>[1]</sup> Considering the importance of pyrimidine nucleotides for cellular

metabolism, especially in tumor cell proliferation and their requirement for the biosynthesis of macromolecules such as DNA, RNA, phospholipids, and glycoproteins, inhibition of this enzyme has gained a lot of attention in recent decades.<sup>[2]</sup> Furthermore, DHODH was noted as an ideal target for the treatment of various diseases and these facts encouraged many scientists to design novel inhibitors that will disrupt the function of the enzyme consequently causing the deficiency of essential pyrimidine nucleotides. Accordingly, a variety of specific inhibitors with a wide range of heterocyclic scaffolds and diverse



## Листа термина и скраћеница коришћених у тексту

ABTS	диамонијумова со 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-сулфонске киселине) ( <i>енг.</i> 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-sulfonic acid) diammonium salt)
A375	ћелијска линија карцинома меланома
A549	ћелијска линија карцинома плућа
ADMET	акроним кога чине апсорпција, дистрибуција, метаболизам, екскреција и токсичност ( <i>енг.</i> absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity)
AML	акутна мијелоцитна леукемија ( <i>енг.</i> acute myelocytic leukemia)
ATP	аденозин трифосфат ( <i>енг.</i> adenosine triphosphate)
CAD	акроним ензимског комплекса кога чине карбамоил фосфат синтетаза, L-аспартат транскарбамилаза и L-дихидрооротаза
CAP	патогени који узрокују упалу плућа ( <i>енг.</i> Community-Acquired Pneumonia)
CB <sub>2</sub>	канабиноидни рецептор тип 2 ( <i>енг.</i> Cannabinoid receptor type 2)
CK <sub>2</sub>	казеин киназа II ( <i>енг.</i> Casein Kinase II)
CoQ	коензим Q
COVID-19	коронавирусна болест 2019
COX-1	циклооксигеназа-1 ( <i>енг.</i> cyclooxygenase-1)
COX-2	циклооксигеназа-2 ( <i>енг.</i> cyclooxygenase-2)
CPT	<i>енг.</i> Camptothecin
CRC	карцином дебелог црева ( <i>енг.</i> colorectal cancer)
DABCO	1,4-диазабицикло[2,2,2]октан ( <i>енг.</i> 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane)
DBU	1,8-диазабицикло[5,4,0]ундец-7-ен ( <i>енг.</i> 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene)
DCIP	2,6-дихлороиндофенол ( <i>енг.</i> 2,6-dichloroindophenol)
DDQ	2,3-дихлоро-5,6-дицијано-1,4-бензохинон ( <i>енг.</i> 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone)
DHO	дихидрооротат
DHODH	дихидрооротат дехидрогеназа ( <i>енг.</i> dihydroorotate dehydrogenase)
DMAP	4-диметиламинопиридин
DMEM	медијум у коме су ћелије гајене ( <i>енг.</i> Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMF	N, N -диметилформамид
DMSO	диметилсулфоксид
DPPH	2,2-дифенил-1-пикрилхидразил
DUQ	децилубихинон
EC <sub>50</sub>	половина максималне ефективне концентрације ( <i>енг.</i> half maximal effective concentration)

ECCD	унакрсно доковање експерименталне конформације ( <i>енг.</i> Experimental Conformation Cross-Docking)
ECRD	поновно доковање експерименталне конформације ( <i>енг.</i> Experimental Conformation Re-Docking)
ETC	ланац за пренос електрона ( <i>енг.</i> Electron Transport Chain)
FAD	флавин аденин динуклеотид
FDA	управа за храну и лекове ( <i>енг.</i> Food and Drug Administration)
FMN	флавин мононуклеотид
FMNH <sub>2</sub>	дихидрофлавин мононуклеотид
FRAP	биолошки тест којим се мери способност једињења да смањи концентрацију гвожђа у плазми ( <i>енг.</i> Ferric Reducing Ability of Plasma)
GSCs	матичне ћелије глиобластома ( <i>енг.</i> Glioblastoma Stem Cells)
GSK-3	гликоген синтаза киназа 3 ( <i>енг.</i> Glycogen Synthase Kinase 3)
HaCaT	нормална ћелијска линија кератиноцита коже
HCMV	хумани цитомегаловирус ( <i>енг.</i> human cytomegalovirus)
HCV	вирус хепатитиса С ( <i>енг.</i> Hepatitis C Virus)
hDHODH	хумана дихидрооротат дехидрогеназа ( <i>енг.</i> human dihydroorotate dehydrogenase)
HeLa	ћелијска линија аденокарцинома грлића материце
HESI	загрејана електроспреј јонизација ( <i>енг.</i> heated electrospray ionization)
HIV-1	вирус ХИВ-а тип 1 ( <i>енг.</i> Human Immunodeficiency Virus type 1)
HIV-2	вирус ХИВ-а тип 2 ( <i>енг.</i> Human Immunodeficiency Virus type 2)
HL-60	ћелијска линија акутне промијелоцитне леукемије
HPLC	хроматографија високих перформанси ( <i>енг.</i> High-performance Liquid Chromatography)
HRMS	масена спектроскопија високе резолуције ( <i>енг.</i> High-resolution Mass Spectrometry)
IC <sub>50</sub>	концентрација једињења која је неопходна за 50 % инхибиције <i>in vitro</i>
IL-6	интерлеукин 6
IR	инфрацрвено ( <i>енг.</i> infrared)
KG-1	ћелијска линија хумане акутне мијелогене леукемије
L-DHO	L-дихидрооротична киселина
LED	светлећа диода ( <i>енг.</i> Light-emitting Diode)
MCF-7	ћелијска линија аденокарцинома дојке
MIC	минимална концентрација неопходна за инхибицију ( <i>енг.</i> Minimum Inhibitory Concentration)
MOLM-14	ћелијска линија хумане акутне моноцитне леукемије
MTT	тетразолијум тест у микрокултури ( <i>енг.</i> 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NAD <sup>+</sup>	никотинамид аденин динуклеотид
NMDA	N-метил-D-аспартат
NMR	нуклеарна магнетна резонанца ( <i>енг.</i> Nuclear Magnetic Resonance)



OMP	оротидин-5'-фосфатна декарбоксилаза
ORO	оротат
PBS	пуферисани физиолошки раствор ( <i>енг.</i> Phosphate-Buffered Saline)
PDB	<i>енг.</i> Protein Data Bank
PDE4	фосфодиестераза 4 ( <i>енг.</i> phosphodiesterase 4)
PI3K	фосфатидилинозитол-3-киназа ( <i>енг.</i> phosphatidylinositol 3-kinase)
pIC <sub>50</sub>	негативна логаритамска IC <sub>50</sub> вредност
QM	квантно механички ( <i>енг.</i> Quantum Mechanical)
RCC	малигне ћелије бубрега ( <i>енг.</i> Renal Cell Carcinoma)
RCCD	унакрсно доковање насумичне конформације ( <i>енг.</i> Randomized Conformation Cross-Docking)
RCRD	поновно доковање насумичне конформације ( <i>енг.</i> Randomized Conformation Re-Docking)
RF	фокус објектива
RMS	вредност корена средњег квадрата ( <i>енг.</i> Root Mean Square)
ROS	реактивне кисеоничне врсте ( <i>енг.</i> Reactive Oxygen Species)
RPMI	медијум у коме су ћелије гајене ( <i>енг.</i> Roswell Park Memorial Institute 1640)
RT	реверсна транскриптаза ( <i>енг.</i> Reverse Transcriptase)
SAR	однос структуре и активности ( <i>енг.</i> Structure-activity Relationship)
SARS-CoV-2	врста коронавируса ког карактерише неколико респираторних акутних синдрома ( <i>енг.</i> Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2)
SD	стандардна девијација
SI	индекс селективности ( <i>енг.</i> Selectivity Index)
TEA	триетиламин
TEAC	тест којим се одређује антиоксидативни капацитет једињења у односу на познати антиоксиданс тролокс ( <i>енг.</i> Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TFA	трифлуоросирћетна киселина
THF	тетрахидрофуран
THP-1	хумана ћелијска линије акутне моноцитне леукемије
TIP3	преносиви интермолекуларни потенцијал 3P ( <i>енг.</i> Transferable Intermolecular Potential 3P)
TrpV1	рецептор ( <i>енг.</i> transient receptor potential cation channel; subfamily V; member 1)
UMP	уридин монофосфат
UTIs	инфекције уринарног тракта ( <i>енг.</i> Urinary Tract Infections)
UV	ултраљубичасти регион апсорпционог спектра
Vis	видљиви регион апсорпционог спектра
VSV	вируси везикуларног стоматитиса ( <i>енг.</i> Vesicular Stomatitis Viruses)
WSN	Waisman-ов синдром који представља неуролошки поремећај окарактерисан заосталим психомоторним развојом ( <i>енг.</i> Waisman syndrome)

ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина ( <i>енг. deoxyribonucleic acid</i> )
РНК	рибонуклеинска киселина ( <i>енг. ribonucleic acid</i> )
с.т.	собна температура

**Биографија са подацима о досадашњем раду**

Милена Петровић је рођена у Јагодини 28.03.1995. године. Основну школу „Љубиша Урошевић” завршила је 2010. године у Рибару, а исте године уписала и гимназију „Светозар Марковић” у Јагодини коју је завршила 2014. године са одличним успехом. После завршене средње школе уписала је Природно-математички факултет у Крагујевцу, студијски програм Хемија, смер за истраживање и развој где је и дипломирала 2018. године са просечном оценом 9,26. Мастер рад из области органске хемије је одбранила јула 2019. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу са оценом 10. Током мастер студија била је корисник стипендије за изузетно

надарене студенте Фонда за младе таленте. Докторске академске студије, модул Органска хемија, уписала је на Природно-математичком факултету школске 2019/20 и до сада завршила све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 10. Као истраживач ангажована је у настави, учествовала је у извођењу вежби из предмета Органска хемија животне средине (школска година 2021/2022) и Виша неорганска хемија (школска година 2022/2023). Активно је учествовала у промоцији факултета кроз организацију сајмова науке и манифестације „Ноћ истраживача“.

Милена Петровић се бави научно-истраживачким радом у области органске, биоорганске и медицинске хемије. Предмет њених научних истраживања је синтеза хетероцикличних органских молекула, спектроскопска карактеризација синтетизованих једињења и испитивање њиховог биолошког потенцијала. Резултати њеног досадашњег научно-истраживачког рада публиковани су у часописима са SCI листе од међународног значаја (категорија M21 и M22). Тренутно сарађује са Медицинским факултетом Универзитета Johannes Kepler у Линцу, Аустрија.

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза, антипролиферативна активност и липофилност нових деривата хинолин-4-карбоксилне киселине као потенцијалних инхибитора дихидрооротат дехидрогеназе

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

у Крагујевцу, \_\_\_\_\_ године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под  
насловом:

Синтеза, антипролиферативна активност и липофилност нових деривата хинолин-  
4-карбоксилне киселине као потенцијалних инхибитора дихидрооротат  
дехидрогеназе

истоветне.

у Крагујевцу, \_\_\_\_\_ године,



\_\_\_\_\_  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Милена Петровић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Синтеза, антипролиферативна активност и липофилност нових деривата  
хинолин-4-карбоксилне киселине као потенцијалних инхибитора  
дихидрооротат дехидрогеназе

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- ② Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, \_\_\_\_\_ године,



---

ПОТПИС АУТОРА

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>