

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Života Selaković

**Razvoj novih 4,10-diazahrizenskih i 1,5-
naftiridinskih inhibitora virusa ebole**

doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Života Selaković

**The development of novel 4,10-
diazachrysene and 1,5-naphthyridine
derivatives as Ebola virus inhibitors**

doctoral dissertation

Belgrade, 2019

Članovi komisije:

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

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

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

Dr Jasmina Nikodinović-Runić,
naučni savetnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerziteta u Beogradu i Inovacionog centra Hemijskog fakulteta

Dr Velimir Popsavin, dopisni član SANU,
redovni profesor Univerziteta u Novom Sadu – Prirodno-matematičkog fakulteta

datum odbrane

Zahvalnica

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

Svom dragom profesoru i mentoru akademiku Bogdanu Šolaji zahvalan sam na prenesenom znanju i dragocenim savetima tokom svih godina rada u njegovoj istraživačkoj grupi. Hvala Vam što sam naučio kako da se suočim sa neuspesima koje bavljenje naukom donosi i što ste mi ukazivali bezgranično poverenje.

Članovima komisije, dr Dragani Milić, redovnom profesoru i dr Igoru Opsenici, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta, hvala na brojnim korisnim savetima tokom pisanja ovog rada i tokom svih godina studija na Hemijskom fakultetu. Dr Velimiru Popsavinu, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i dr Jasmini Nikodinović-Runić, naučnom savetniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, posebno se zahvaljujem što su prihvatili učešće u komisiji za pregled, ocenu i odbranu disertacije, kao i na njihovim savetima i smernicama.

Zahvalnost dugujem dr Sini Bavari, dr Rekhi Panchal, dr Rajini Mudhasani, dr Tatjani Verbić, dr Sandri Šegan, dr Olgici Đurković-Đaković, dr Jeleni Srbljanović, dr Branku Bobiću, dr Aleksandru Paviću, dr Velimiru Radmiloviću i dr Xiju Jiangu na brojnim važnim eksperimentima koji su upotpunili ovu disertaciju.

Dr Dejanu Opsenici se zahvaljujem što me je, od prvog susreta na vežbama, vrednim savetima, posvećenošću i strpljenjem uvodio u svet organske hemije.

Kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu se zahvaljujem na brojnim urađenim spektralnim analizama. Posebnu zahvalnost dugujem dr Milki Jadranin, dr Dejanu Gođevcu i dr Bobanu Anđelkoviću na njihovoj predanosti i strpljenju.

Miri hvala na svemu što me je naučila dok sam bio student, kao i u toku naše sedmogodišnje saradnje tokom izvođenja vežbi.

Mojim dragim prijateljima i kolegama Jeleni, Nini, Mariji, Katarini, Nataši, Jovani, Dušanu, Vladimiru, Vuku, Miklošu i Miljanu hvala što su sa mnom delili trenutke radosti i trenutke tuge, koje smo zajedno uz smeh i nesebičnu podršku prevazilazili. Posebno se zahvaljujem dr Ivani Aljančić na savetima i razumevanju tokom svih godina provedenih u laboratoriji 432.

Mojoj supruzi Milici hvala na ljubavi. Hvala mojim roditeljima i sestri na bezuslovnoj podršci tokom svih ovih godina, kao i mojim prijateljima koji su uvek verovali u mene.

Naslov:

Razvoj novih 4,10-diazahrizenskih i 1,5-naftiridinskih inhibitora virusa ebole

Sažetak:

Ebolavirus je rod virusa iz familije *Filoviridae*, endemski prisutan u Subsaharskoj Africi. Vrste koje pripadaju ovom rodu uzročnici su smrtonosne hemoragijske groznice kod ljudi i primata, a otkrivene su, kao i njima srodni virusi marburga, u drugoj polovini 20. veka, kada su registrovani prvi slučajevi. U ovom trenutku ne postoji odobrena vakcina niti lek protiv ove opasne infekcije. Nekoliko imunoterapeutika, kao i složenih makromolekulskih formulacija, predstavlja obećavajuće kandidate za lek, a ostvaren je i napredak u istraživanjima sa malim molekulima. Oslanjajući se na ranija istraživanja u našoj istraživačkoj grupi, u okviru ove teze sintetisane su dve grupe jedinjenja za koje se pretpostavljalo da mogu imati antivirusnu aktivnost – derivati 4,10-diazahrizena i 1,5-naftiridina. Ukupno je testirano 29 jedinjenja, a po aktivnosti naročito su se istakla dva diazahrizenska derivata koji su imali veoma dobru *in vitro* aktivnost i štitili su 9/10, odnosno 10/10 inficiranih miševa pri dozi 10 mg/kg. Urađen je veći broj oglada sa ciljem utvrđivanja mehanizma dejstva ova dva jedinjenja, pri čemu je otkriveno da ona inhibiraju ulazak virusa u ćeliju domaćina, na način koji se razlikuje od do sada poznatih inhibitora ulaska virusa. Dobijeni rezultati ukazuju da su molekuli razvijeni u ovoj tezi značajni i jedinstveni i da zavređuju dalja ispitivanja.

Ključne reči: filovirusi, virus ebole, mali molekuli kao inhibitori, diazahrizen, naftiridin, mehanizam dejstva, toksičnost, farmakokinetika

Naučna oblast: hemija

Uža naučna oblast: organska hemija, medicinska hemija

UDK broj: 547(043.3)

Title:**The development of novel 4,10-diazachrysene and 1,5-naphthyridine derivatives as Ebola virus inhibitors****Abstract:**

Ebolavirus is a genus of viruses from the *Filoviridae* family, endemic to Sub-Saharan Africa. Species from this genus cause a lethal hemorrhagic fever in humans and non-human primates. Like the related Marburgviruses, they were discovered in the second half of the 20th century, when first cases were reported. Presently, there is no approved vaccine or other therapeutics to treat this dangerous infection. Several immunotherapeutics, as well as sophisticated macromolecular formulations, have shown promising results, and advances have also been made in small molecule research. Based on our previous results we developed two new chemotypes as possible antivirals – derivatives of 4,10-diazachrysene and 1,5-naphthyridine, respectively. A total of 29 compounds were tested, with two of them showing very good results: they had excellent *in vitro* activity and they protected 9/10 and 10/10 infected mice from a fatal Ebola challenge, respectively (10 mg/kg dose). A number of experiments were carried out to determine the mechanism of action of these two compounds, and it was discovered that they prevent viral entry into cells, albeit in a manner that differed from other known entry inhibitors. The results obtained in this thesis show that the developed compounds are unique and worthy of further examination.

Keywords: filoviruses, Ebola virus, small molecule inhibitors, diazachrysene, naphthyridine, mechanism of action, toxicity, pharmacokinetics

Scientific field: chemistry

Scientific subfield: organic chemistry, medicinal chemistry

UDK number: 547(043.3)

Lista skraćenica i termina

Ac	acetil
AdV	adenovirus
AGP	kiseli α -1 glikoprotein
AQ	amodiakin
BDBV	<i>Bundibugyo ebolavirus</i>
BINAP	(2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil
CAD	<i>cationic amphiphilic drugs</i> – katjonski amfifilni lekovi
CC ₅₀	koncentracija pri kojoj jedinjenje uzrokuje dvostruko umanjenje vijabilnosti ćelija
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> – državna institucija Sjedinjenih Država za kontrolu i prevenciju oboljenja (naročito infektivnih)
CQ	hlorokin
DCM	dihlormetan
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DRA	<i>dose-response analysis</i> – analiza aktivnosti jedinjenja u funkciji koncentracije
EC _{50/90}	koncentracija pri kojoj jedinjenje ispoljava 50%/90% od maksimalnog mogućeg merenog efekta – u ovoj tezi reč je o inhibiciji infekcije ćelija virusom
EBOV	virus ebole, takođe vrsta <i>Zaire ebolavirus</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – agencija za hranu i lekove Sjedinjenih Država
GFP	<i>green fluorescent protein</i> – zeleni fluorescentni protein
GP	glikoprotein filovirusa
HeLa	“besmrtna” ćelijska linija ljudskog karcinoma materice
HepG2	ćelijska linija ljudskog karcinoma jetre
HFF	ćelije fibroblasta ljudskih prepucijuma
hpf	<i>hours post fertilization</i> – časova posle fertilizacije
HPIV3	virus humane parainfulence, tip 3
HPLC	tečna hromatografija visoke rezolucije (tečna hromatografija pod viskoim pritiskom)
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> , masena spektrometrija visokog razlaganja
HSA	humani serum albumin
HTS	<i>high-throughput screening</i> – visoko efikasni skrining – automatizovano utvrđivanje

	aktivnosti jedinjenja koristeći baze jedinjenja
IC _{50/90}	koncentracija pri kojoj jedinjenje inhibira 50%/90% infekcije ćelija virusom ebole ili marburga (u novije vreme preferira se format EC _{50/90})
IFN	interferon(i)
L	RNK-zavisna RNK polimeraza filovirusa
LD ₅₀	srednja letalna doza, doza potrebna da usmrti 50% ispitivanog uzorka/populacije
MARV	virus marburg
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i> – ćelijska linija epitela psećih bubrežnih tubula
NMP	<i>N</i> -metilpirolidon
NP	nukleoprotein filovirusa
NPC1	<i>Niemann-Pick C1</i> protein
ORF	<i>open reading frame</i> – deo gena koji kodira protein (nema stop-kodona i sl.)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> – vodeni rastvor NaCl pufferisan fosfatima
PKR	protein-kinaza R, enzim važan za iniciranje apoptoze
RAVV	izolat Ravn virusa marburg
RESTV	<i>Reston ebolavirus</i>
RNK	ribonukleinska kiselina
RP	reverzna faza
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i> , proteinski kompleks koji je neophodan za fuziju sinaptičke vezikule i plazmine membrane
SUDV	<i>Sudan ebolavirus</i>
TAFV	<i>Tai Forest ebolavirus</i>
TCA	<i>time of compound addition</i> – esej jačine efekta u zavisnosti od vremena dodatka jedinjenja
TFA	trifluorsirćetna kiselina
TLC	tankoslojna hromatografija
Vero76	ćelije bubrega afričkog zelenog majmuna
VLP	<i>virus-like particles</i> – virusolike čestice
VP	virionski proteini filovirusa
VSV	virus vezikularnog stomatitisa
ZEBOV	nekadašnja skraćenica za <i>Zaire ebolavirus</i>

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	2
2.1. Filovirusi	2
2.1.1. Uvod.....	2
2.1.2. Taksonomija.....	2
2.1.3. Otkriće i rasprostranjenost virusa.....	4
2.2. Virusne bolesti - transmisija, simptomi, klinička slika	9
2.3. Struktura filovirusa.....	12
2.4. Replikacioni ciklus virusa	14
2.5. Patogeneza.....	16
2.6. Terapeutske opcije	17
2.6.1. Vakcine	17
2.6.2. Makromolekulski terapeutici	21
2.6.3. Mali molekuli	23
3. NAŠI RADOVI.....	33
3.1. Osnovni koncept i hemijska sinteza.....	33
3.1.1. Sinteza diazahrizenskih derivata supstituisanih dvema istim alkilamino- grupama – prva grupa jedinjenja.....	33
3.1.2. Sinteza naftiridina i diazahrizenskih derivata supstituisanih dvema različitim alkilamino-grupama – druga grupa jedinjenja	37
3.2. Biološki testovi	43
3.2.1. Biološka aktivnost i toksičnost prve grupe jedinjenja.....	43
3.2.2. Biološka aktivnost, toksičnost i ostala svojstva druge grupe jedinjenja	49
3.2.3. Ispitivanje mehanizma dejstva	61
3.3. Pokušaj poboljšanja aktivnosti jedinjenja dostavom lipozomima	70
3.4. Diskusija.....	71
4. EKSPERIMENTALNI DEO	77
4.1. Hemijska sinteza i spektralni podaci.....	77
4.2. Vezivanje jedinjenja za proteine plazme.....	130

4.3. Ćelijske linije i ćelijske kulture.....	131
4.4. Virus.....	131
4.5. Kvantifikacija EBOV infekcije i drugih fenotipova postupkom <i>High Content Imaging</i>	132
4.5. <i>Dose response</i> analiza (DRA).....	132
4.6. Studije <i>in vivo</i> efikasnosti	134
4.7. Evaluacija ulaska virusa u ćeliju u funkciji vremena dodatka jedinjenja – TCA esej.....	134
4.8. Esej ulaska pseudotipovanog virusa u ćeliju.....	135
4.9. Vizualizacija jedinjenja i kiselih odeljaka.....	136
4.10. Aktivnost katepsina B	136
4.11. Statistička analiza.....	137
4.12. Detekcija autofagije	137
4.13. Elektronska mikroskopija.....	138
5. ZAKLJUČAK	139
6. CONCLUSION	141
7. PRILOG	143
8. LITERATURA.....	167

1. UVOD

Virus ebole je patogen koji izaziva smrtonosnu hemoragijsku groznicu kod ljudi. Prva registrovana epidemija izbila je 1976. godine i od tada do danas nije pronađen i odobren lek niti vakcina za retku, ali opasnu bolest koju ovaj virus izaziva. Nepredvidivost izbijanja novih epidemija i činjenica da je njima uglavnom pogođeno siromašno stanovništvo zemalja sa lošom zdravstvenom infrastrukturom Subsaharske Afrike obavezuje čovečanstvo da stane na put ovoj pošasti.

Ovim radom učinjen je pokušaj da se razviju novi mali molekuli koji bi se mogli koristiti kao terapeutici.

Doktorska disertacija sastoji se iz tri dela:

U *Opštem delu* dati su osnovni podaci o virusu ebole i njemu srodnim virusima, kao i o pregled trenutnih dostignuća na polju razvijanja odgovarajućih inhibitora i vakcina.

U *Našim radovima* prikazani su rezultati do kojih se došlo u toku naših istraživanja. Opisana je polazna ideja za razvoj novih tipova inhibitora virusa. Predstavljena je sinteza jedinjenja, derivata 4,10-diazahrizena i 1,5-naftiridina, i dati su rezultati ispitivanja njihove biološke aktivnosti, toksičnosti i ishodi određivanja njihovih farmakoloških parametara.

U *Eksperimentalnom delu* detaljno su opisane sinteze svih jedinjenja i dati su podaci dobijeni spektralnom i analitičkom karakterizacijom, a prikazane su i metode primenjene prilikom određivanja aktivnosti i mehanizma delovanja naših jedinjenja.

Slede izvod na srpskom i engleskom jeziku, zaključak i spisak korišćene literature. Kao prilog dat je CD sa spektrima jedinjenja sintetisanih u toku izrade doktorske teze.

2. OPŠTI DEO

2.1. Filovirusi

2.1.1. Uvod

Filovirusi (lat. *Filoviridae*) jesu taksonomska familija koja pripada redu *Mononegavirales*. Familija se sastoji od pet rodova^{1,2} – *Marburgvirus* (otkriven 1967. godine³), *Ebolavirus* (1976.^{4,5}), *Cuevavirus* (2010.⁶), *Striavirus* (2018.⁷) i *Thamnovirus* (2018.⁷). Virusi koji pripadaju prvom i drugom rodu uzročnici su smrtonosne hemoragijske groznice kod ljudi i primata.⁸

2.1.2. Taksonomija

Redu *Mononegavirales* pripadaju^a oni RNK virusi čija je ribonukleinska kiselina negativno polarizovana (*negative sense*), nesegmentisana, neinfektivna, jednolančana (*single-stranded* RNK, ssRNK) i linearna. Unutar reda razlikuju se familije *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Myonnaviridae*, *Nyamiviridae*, *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae*, *Rhabdoviridae* i *Sunviridae*. Pripadnost familiji filovirusa karakteriše veliki broj parametara, ali nekoliko je, prema ranijoj nomenklaturi, najvažnije – virus mora imati RNK dugu približno 19000 nukleinskih baza, mora izazivati hemoragijsku groznicu kod (nekih ili svih) primata i mora se slabo neutralisati *in vivo*.^{9,10} Rodovi unutar ove familije otkriveni u poslednjih nekoliko godina verovatno će promeniti ovu definiciju.

Kao što je već navedeno, postoji pet rodova u okviru familije filovirusa: *Marburgvirus*, *Ebolavirus*, *Cuevavirus*, *Striavirus* i *Thamnovirus*. Poznato je nekoliko razlika između ovih rodova, pre svega između prva dva roda koji su ranije otkriveni i bolje istraženi. Ebolavirusi duži su od marburgvirusa (~ 805 nm prema ~ 665 nm). Nasuprot tome, marburgvirusi imaju dužu RNK, sa 19,1 kilo-nukleinskih baza (kb) naspram 18,9 kb

^a Međunarodni komitet za taksonomiju virusa (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV) predstavlja ovlašćeno međunarodno telo koje se bavi opisom i klasifikacijom virusa.

kod ebolavirusa. Marburgvirusi endemski su prisutni uglavnom u suvim šumama Istočne, Centralne i Zapadne Afrike, dok su ebolavirusi uglavnom prisutni u kišnim šumama Centralne i Zapadne Afrike. Genomi marburgvirusa i ebolavirusa razlikuju se za $\geq 50\%$ na nivou nukleotida, što je uslov koji i eventualne novootkrivene vrste moraju zadovoljavati da bi bile svrstane u jednu od ove dve familije. Nova vrsta familije *Cuevavirus* mora imati manje od 50% istovetnosti sa marburgvirusima na nivou nukleotida, a više od 50% istovetnosti sa jedinim do sada otkrivenim kuevavirusom – *Lloviu cuevavirus*, endemski prisutnom na Iberijskom poluostrvu.^{9,10} Virusi *Striavirus* i *Thamnovirus* nedavno su otkriveni u ribama i prema preliminarnim istraživanjima genetski se značajno razlikuju od familija *Marburgvirus*, *Ebolavirus* i *Cuevavirus*.⁷

Sledeći virusi su potvrđeni ili predloženi članovi familije filovirusa:

1. Marburgvirusi:

- *Marburg marburgvirus* ili *Lake Victoria marburgirus* (MARV; otkriven 1967. godine)
 - izolat Marburg Musoke (MARV-Mus; 1980)
 - izolat Ravn (RAVV-Rav; 1987)

2. Ebolavirusi:

- *Zaire ebolavirus* (EBOV; 1976; ranije ZEBOV)
- *Sudan ebolavirus* (SUDV; 1976)
- *Reston ebolavirus* (RESTV; 1989)
- *Tai Forest ebolavirus* (TAFV; 1994)
- *Bundibugyo virus* (BDBV; 2004)
- *Bombali virus* (BOMV; 2019)^{b,11}

3. Cuevavirusi:

- *Lloviu cuevavirus* (LLOV; 2009)

4. Striavirusi:

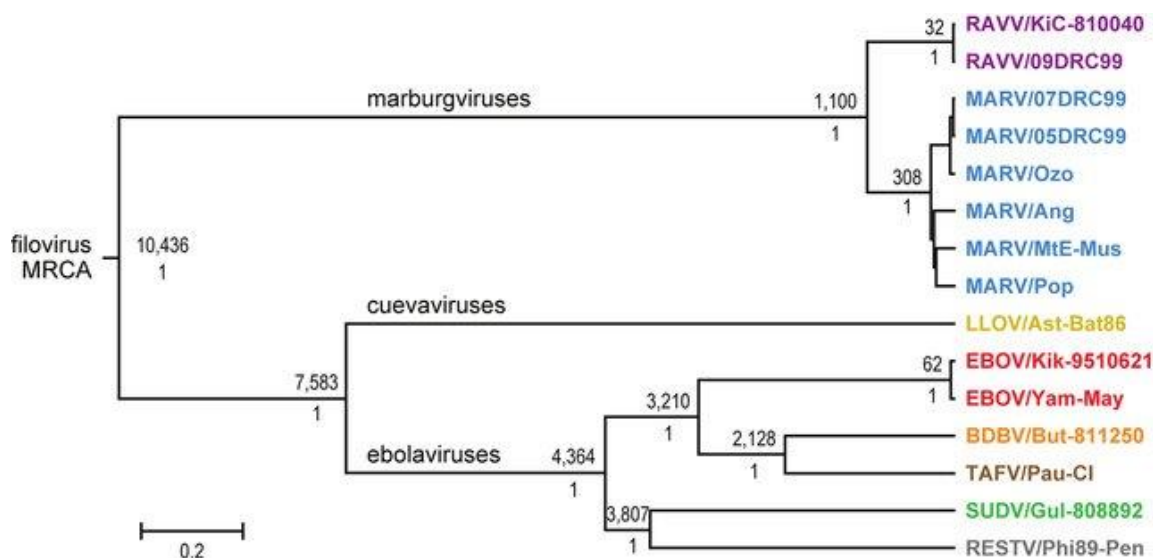
- *Xilang striavirus* (XILV; 2018)

5. Thamnovirusi:

- *Huangjiao thmanovirus* (HUJV; 2018)

^b Novootkrivena, predložena vrsta pronađena u slepim miševima u Angoli.

Na osnovu genetske bliskosti, odnosno udaljenosti, može se konstruisati filogenetsko stablo filovirusa nađenih u sisarima (slika 1).¹² Na slici je data i udaljenost do MRCA (*most recent common ancestor* – najskoriji zajednički predak), izražena u godinama. Genomski fosili predaka filovirusa pronađeni su u genomima više sisara, što svedoči o postojanju vrsta bliskih filovirusima pre više desetina miliona godina.¹³



Slika 1. Filogenetsko stablo filovirusa nađenih u sisarima (bez novootkrivenog BOMV). Nazivi izolata koji predstavljaju pripadnike iste vrste ispisani su istom bojom.¹²

2.1.3. Otkriće i rasprostranjenost virusa

Godine 1967. pojavila se hemoragijska groznica kod ukupno 32 osobe u Marburgu u Zapadnoj Nemačkoj i u Beogradu u SFRJ. Ubrzo je utvrđeno da su zaražene osobe, uglavnom naučnici i lekari, radile sa jetrama majmuna uvezenih iz Ugande. Uzročnik oboljenja bio je do tada nepoznat patogen – virus marburg.³ U Beogradu bio je zaražen virusolog dr Živko Stefanović, a ubrzo posle njega obolela je i njegova supruga.¹⁴ Oboje su preživeli, primivši plazmu rekoalescenata iz Nemačke, ali je u Nemačkoj sedam bolesnika umrlo.

Dve vrste virusa ebole pojavile su se gotovo istovremeno, 1977. godine, u dve zasebne epidemije^c u južnom Sudanu (danas Republika Južni Sudan) i severnom Zairu (danas Demokratska Republika Kongo).^{4,5} Epidemiju u Sudanu uzrokovao je, prema trenutnoj taksonomiji, *Sudan ebolavirus*, obolelo je 284 osobe, a preminula 151 ili 53%. U Zairu je epidemija bila još surovija – obolelo je 318 ljudi, a od toga je 280 ili 88% preminulo.

Ukupno, do 2014. godine, filovirusima bilo je zaraženo 2811 ljudi, od toga 2344 ebolavirusima i 467 marburgvirusima.^{15,16} Od posledica infekcije virusima ebole preminulo je 1563 osoba (67%), a od virusa marburg 373 osobe (80%). Bilo je sedam epidemija i pojedinačnih slučajeva *Sudan ebolavirusa*, sa prosečnom stopom smrtnosti od 53%, četrnaest epidemija i pojedinačnih slučajeva *Zaire ebolavirusa*, sa prosečnom stopom smrtnosti 78%, dve epidemije *Bundibugyo ebolavirusa*, sa stopom smrtnosti od 33%, kao i jedan slučaj *Tai Forest ebolavirusa* bez smrtnog ishoda.

Međutim, početkom 2014. godine izbila je prva (i jedina) prava epidemija EBOV u Gvineji, odakle se ubrzo proširila na Sijera Leone i Liberiju.¹⁷ Krhke institucije pružanja zdravstvene zaštite i zakasnela spoznaja da je reč o filovirusu, uzrokovali su brzinu širenja zaraze bez presedana, pri čemu je život izgubilo preko 11000 ljudi. Epidemija je ugašena tek 2016. godine. Od tada je došlo do četiri manje epidemije u DR Kongu, od kojih je jedna još uvek traje u vreme pisanja ovog rada. Kratak prikaz svih dosadašnjih slučajeva pojave filovirusa dat je u tabeli 1.

Tabela 1 Pregled dosadašnjih epidemija filovirusa

Godina	Lokacija	Virus	Broj slučajeva	Broj umrlih;%
1967.	Z. Nemačka, SFRJ	MARV	32	7; 22%
1975.	Južnoafrička Republika	MARV	3	1; 33%
1980.	Kenija	MARV	2	1; 50%
1987.	Kenija	MARV	1	1; 100%

^c U tekstu će reč epidemija biti korišćena i za, po geografskoj rasprostranjenosti i broju slučajeva, ograničene slučajeve pojave zaraze (*outbreak*) i za prave epidemije (*epidemic*). Postojala je samo prava epidemija – ona u Zapadnoj Africi.

1990.	SSSR	MARV	1	1; 100%
1998.	DR Kongo	MARV	154	128; 83%
2004.	Angola	MARV	252	227; 90%
2007.	Uganda	MARV	4	1; 25%
2008.	Uganda→SAD	MARV	1	0
2008.	Uganda→Holandija	MARV	1	1; 100%
2012.	Uganda	MARV	15	4; 27%
2014.	Uganda	MARV	1	1; 100%
1976.	Zair	EBOV	318	280; 88%
1977.	Zair	EBOV	1	1; 100%
1994.	Gabon	EBOV	52	31; 60%
1995.	Zair	EBOV	315	250; 79%
1996.	Rusija	EBOV	1	1; 100%
1996.	Gabon, JAR	EBOV	39	22; 56%
1996.	Gabon	EBOV	60	45; 75%
2001.	Gabon, R Kongo	EBOV	124	96; 77%
2002.	Republika Kongo	EBOV	143	128; 89%
2003.	Republika Kongo	EBOV	35	29; 83%
2004.	Rusija	EBOV	1	1; 100%
2005.	Republika Kongo	EBOV	12	10; 83%
2007.	DR Kongo	EBOV	264	187; 71%
2008.	DR Kongo	EBOV	32	15; 47%
2014.	Zapadna Afrika ^a	EBOV	28610	11308; 39%
2014.	Z.Afrika→druge zemlje ^b	EBOV	35	15; 43%
2014.	DR Kongo	EBOV	69	49; 71%

2017.	DR Kongo	EBOV	8	4; 50%
2018.	DR Kongo	EBOV	54	33; 61%
2018.	DR Kongo ^c	EBOV	traje	
1976.	Sudan, UK	SUDV	285	151; 53%
1979.	Sudan	SUDV	34	22; 65%
2000.	Uganda	SUDV	425	224; 53%
2004.	Sudan	SUDV	17	7; 41%
2011.	Uganda	SUDV	1	1; 100%
2012.	Uganda	SUDV	11	4; 36%
2012.	Uganda	SUDV	6	3; 50%
2007.	Uganda	BDBV	131	42; 32%
2012.	DR Kongo	BDBV	36	13; 36%
1994.	Obala Slonovače	TAFV	1	0

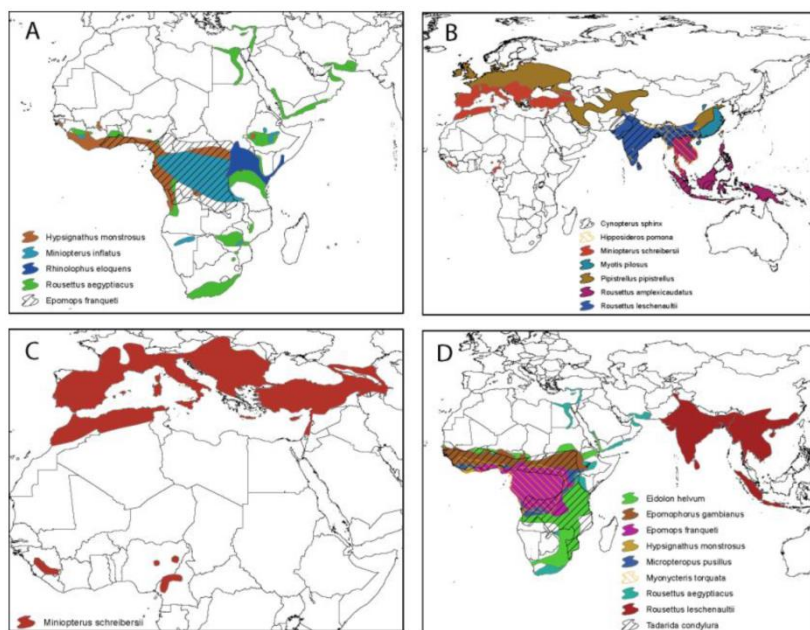
^aZahvaćene su bile Gvineja, Liberija i Sjeverna Leone. ^bEpidemija u tri zapadnoafričke zemlje proširila se na Mali, Nigeriju, Italiju, Senegal, Španiju, Sjedinjene Američke Države i Ujedinjeno Kraljevstvo, a podaci o ovim slučajevima dati su zbirno. ^cOva epidemija traje u vreme pisanja ovog rada.

Reston ebolavirus otkriven je 1992. godine, u jednoj ustanovi u kojoj su uzgajani primati na Filipinima, odakle je prenet i u Sjedinjene Države.¹⁸ Makaki majmuni su umirali od ovog virusa, ali kod ljudi on ne izaziva nikakve simptome. Laboratorijski je utvrđeno prisustvo ove vrste virusa kod tri čoveka na Filipinima.

Određene indicije postoje da su pojedine velike epidemije iz prošlosti (poput one koja je odnela živote 45% domorodačkog stanovništva Meksika 1576. godine, ili one zabeležene u Atini u toku Peloponeskog rata) bile hemoragijske groznice, međutim manje je verovatno da su ih izazvali baš filovirusi.^{19,20}

Prirodno stanište filovirusa nije još uvek sa sigurnošću poznato, ali je neupitno da je više epidemija otpočelo kontaktom ljudi sa zaraženim primatima ili sa slepim

miševima, što filoviruse čini zoonoznim^d virusima. Pionirsko istraživanje izvršeno je u Ugandi 2009. godine, nakon što se u toj zemlji godinu dana ranije završila epidemija koja je izbila među rudarima.²¹ Virusna RNK virusa marburg izolovana je iz zdravih slepih miševa vrste *Rousettus aegyptiacus*. Praćeno je oko 100000 jedinki, a RNK je nađena u oko 5000 jedinki, pri čemu je ovaj nivo zastupljenosti bio konstantan u toku devet meseci. Slepimi miševima normalno žive sa virusnim genetskim materijalom i smatra se da bi oni mogli biti dugoročni rezervoar filovirusa. Početkom druge decenije ovog veka otkriveno je prisustvo antitela reaktivnih na antigene RESTV i EBOV na Filipinima, u Bangladešu i Kini.^{22,23,24} Usled preklapajućih staništa pojedinih vrsta slepih miševa, i uzevši u obzir pronađena antitela, može se izraditi mapa geografske raspodele svih vrsta slepih miševa koje mogu biti potencijalni rezervoar filovirusa (slika 2).²⁵

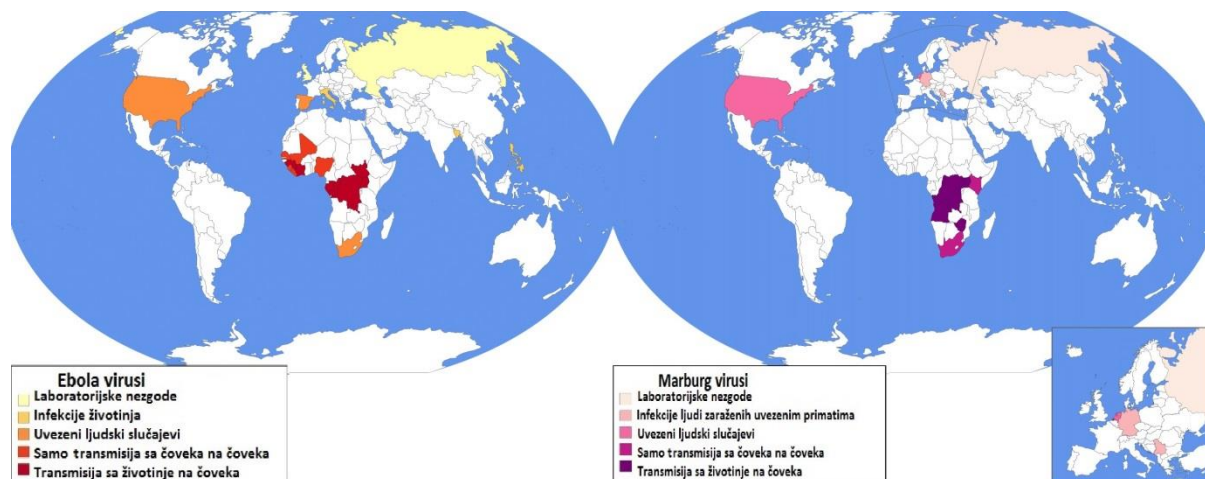


Slika 2. Geografska raspodela svih vrsta slepih miševa koje mogu biti potencijalni rezervoar filovirusa (A) *Marburg marburgvirus*; (B) *Reston ebolavirus*; (C) *Lloviu virus*; i (D) *Zaire ebolavirus*.

Empirijski, pokazalo se da su sve dosadašnje epidemije u Subsaharskoj Africi izbile približno u pojasu između 10 ° severne geografske širine i 10 ° južne geografske širine,

^d Zoonozni virusi su oni virusi koji se u prirodnim uslovima mogu preneti sa životinja na čoveka (transmisija).

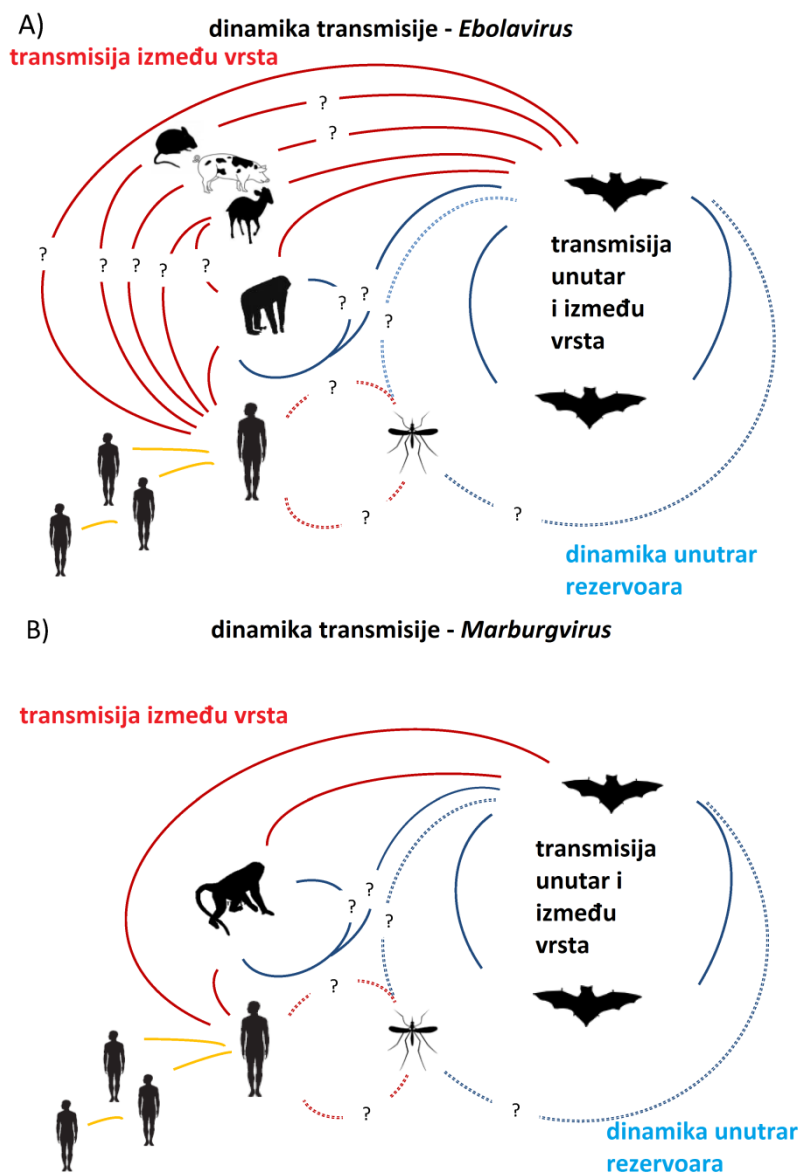
a geografska raspodela dosadašnjih epidemija i pojedinačnih slučajeva infekcija filovirusima data je na slici 3.²⁶



Slika 3. Geografska raspodela dosadašnjih epidemija i pojedinačnih slučajeva infekcija filovirusima (ebolavirusi levo, marburgvirusi desno).²⁶

2.2. Virusne bolesti - transmisija, simptomi, klinička slika

Epidemije filovirusa otpočinju bliskim kontaktom ljudi sa zaraženim slepim miševima ili primatima, a nije isključena ni mogućnost da i druge životinje posluže kao vektor virusa (slika 4).²⁵ Blizak kontakt podrazumeva dodir između sluzokože ili kože koja nije intaktna sa nekom telesnom tečnošću zaražene osobe ili životinje.²⁷



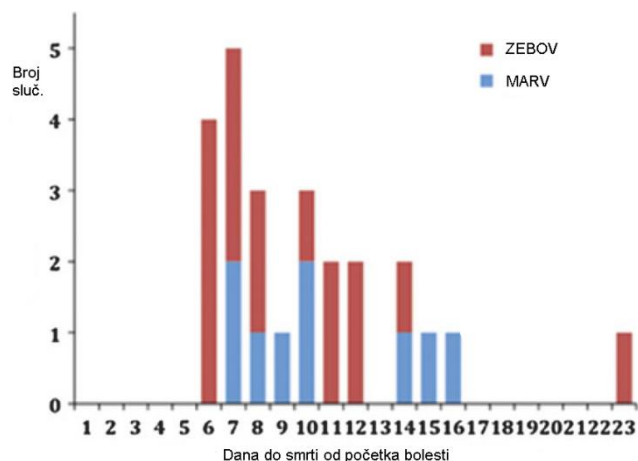
Slika 4. A. Putevi transmisije virusa ebole. B. Putevi transmisije virusa marburga; Pouzdani putevi transmisije prikazani su punom linijom. Nepotvrđeni putevi transmisije predstavljeni su isprekidanom linijom. Putevi koji su epidemiološki nepouzdati obeležni su znakom pitanja.²⁵

Od trenutka infekcije nastupa period inkubacije, koji traje slično kod svih filovirusa – od dva do 21 dan, a u izuzetnim slučajevima i duže.²⁸ U ovom periodu osoba nije infektivna. Posle isteka inkubacije, javlja se više simptoma koji nisu specifični.²⁹ Ovakvi simptomi nalikuju na simptome drugih, češćih bolesti u Subsaharskoj Africi, poput, na primer, malarije ili različitih groznica koje se javljaju u tropskom pojasu. Ovo neretko uzrokuje pogrešnu prvobitnu dijagnozu, što dalje olakšava prenošenje infekcije.

Simptomi uključuju povišenu telesnu temperaturu, drhtavicu, mučninu, glavobolju, malaksalost, dijareju. Telesna temperatura uglavnom prelazi 39 °C. U kasnijoj fazi bolesti dolazi do značajnog poremećaja rada srca i pluća – javlja se tahikardija i ubrzano disanje. Po ramenima, grudima i stomaku se krajem prve nedelje od početka bolesti javlja makropapularan osip, sličan varičelama, a u manjoj meri i po ostatku kože. Ovaj osip je jedan od najpouzdanijih dijagnostičkih spoljnih signala koji ukazuju da je reč o infekciji filovirusima, premda ga je kod osoba tamnije puti teže analizirati. Do hemoragije – krvarenja, dolazi nakon približno nedelju dana od početka bolesti, iz postojećih rana na telu, poput onih nastalih ubodom igle, na sluzokoži usne duplje, gastrointestinalnog trakta i drugde u unutrašnjosti organizma. Krv u stolici i mokraći javlja se u toku poslednjih dana bolesti. Sve ove pojave praćene su anurijom, upalošću očiju, delirijumom, ubrzanim disanjem, različitim mentalnim problemima i, povremeno, štucajem.^{29,30,31}

Kod obolelih dolazi do opadanja nivoa hemoglobina u krvi, ekstremnog smanjenja broja limfocita i trombocita, uz istovremeno povišen nivo granulocita i ukupnog broja leukocita. Utvrđen je povišen nivo azot-monoksida u okviru proinflatornog odgovora organizma. U odmaklim stadijumima bolesti javlja se poremećaj nivoa većeg broja enzima u krvi, dolazi do proteinurije i povišenog nivoa uree u krvi.^{29,30,31}

Kao posledica šoka, poremećenog pulsa i disanja, iscrpljenosti, nekroze organa kroz ćelijsku apoptozu (i druge vidove ćelijske smrti), leukocitoze, gubitka barijerne funkcije endotela i vaskularne disfunkcije, u velikom broju slučajeva nastupa koma, a potom i smrt. Stopa smrtnosti može biti jako visoka, mada varira u zavisnosti od epidemije, o čemu je bilo reči ranije u tekstu. U studiji u kojoj je detaljno opisano 25 fatalnih slučajeva infekcije EBOV-om i MARV-om utvrđeno je da je smrtnost naveća u drugoj nedelji manifestacije bolesti. Pacijenti koji su živi nakon prvih 14 dana bolesti imaju velike izgleda za preživljavanje. Oporavak je dug i traje više meseci, a praćen je anemijom, malaksalošću, glavoboljom i drugim različitim tegobama.^{29,31,32,33} Slika 5 ilustruje podatke o smrtnosti.²⁹



Slika 5. Grafički prikaz smrtnosti kod infekcija filovirusima u funkciji broja dana od pojave simptoma (x-osa: vreme od početka bolesti, u danima).²⁹

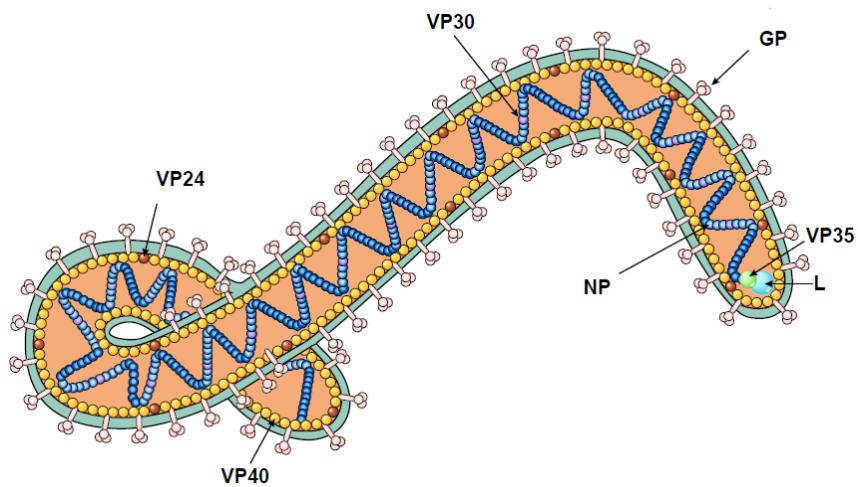
2.3. Struktura filovirusa

Obe vrste za ljude patogenih virusa – ebola i marburg – dosta se podudaraju po strukturi. Oba su RNK virusi, sa nesegmentisanom, jednolančanom, nukleinskom kiselinom, koja sadrži sedam monocistronskih gena. Sem genetskog materijala, virusi poseduju kapsid (proteinski omotač, što je odlika svih virusa), kao i dodatni glikoproteinski omotač.^{32,33}

Ribonuleinska kiselina virusa, duga 19000 nukleinskih baza, kodira sedam proteina i poseduje nekodirajuće sekvence i na 3' i na 5' kraju. Polazeći od 3' kraja, nalaze se geni koji kodiraju nukleoprotein (NP), virionski protein 35 (VP35), VP40, glikoprotein (GP), VP30, VP24 i RNK-zavisnu RNK polimerazu (L).

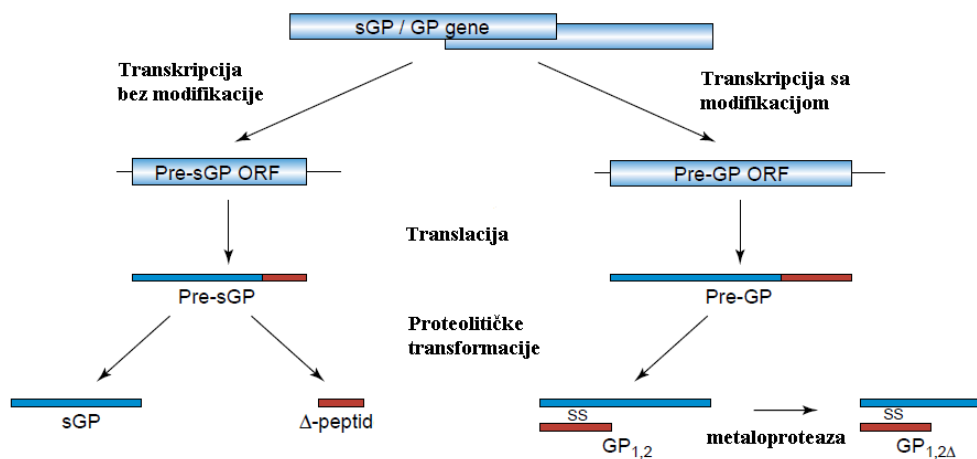
Nukleoprotein čini okosnicu omotača genetskog materijala – kapsida. Naredni protein VP35 je kofaktor polimeraze virusa, a VP40 je glavni protein matriksa, važan za strukturu virusa. Naredni gen kod virusa ebola transkribuje se u rastvorni Pre-sGP, iz koga kasnijom enzimski katalizovanom hidrolizom nastaje sGP. Informaciona RNK koja korespondira ovom genu takođe doživljava dodatne transformacije unutar zaražene ćelije, a nakon translacije koja sledi nastaje strukturni glikoprotein GP ili GP_{1,2}. Glikoprotein unutar zaražene ćelije trpi i post-translacione modifikacije nakon kojih poprima svoju konačnu strukturu, ključnu za sastavljanje potonjeg

glikoproteinskog omotača novih viriona. Kod virusa marburga ekspresijom analognog gena direktno nastaje GP. Naredni gen kodira VP30, koji je transkripcioni faktor. Potom sledi VP24, karakterističan za filoviruse, a predstavlja sporedni protein matriksa. Poslednji protein je enzim – polimeraza virusa L. Unutrašnjost virusa u formi supramolekulskog kompleksa - nukleokapsida čini virusna RNK konjugovana sa nukleoproteinom, uz VP30, VP35 i RNK polimerazu. Proteini VP40 i VP24 nalaze se u matriksu, sa unutrašnje strane spoljašnjeg omotača virusa.^{32,33,34} Slika 6 simbolično prikazuje virus Ebole.³⁵



Slika 6. Shematski prikaz Ebola virusa.³⁵

U ćeliji zaraženoj virusom ebole nastaje još jedan protein kao proizvod post-translacione modifikacije Pre-sGP proteina – vodorastvorni ssGP ili Δ -peptid. Takođe, vanćelijske metaloproteaze mogu dejstvom na GP_{1,2} dati GP_{1,2 Δ} . Slika 7 prikazuje moguću sudbinu sGP gena u ćeliji domaćina.³²

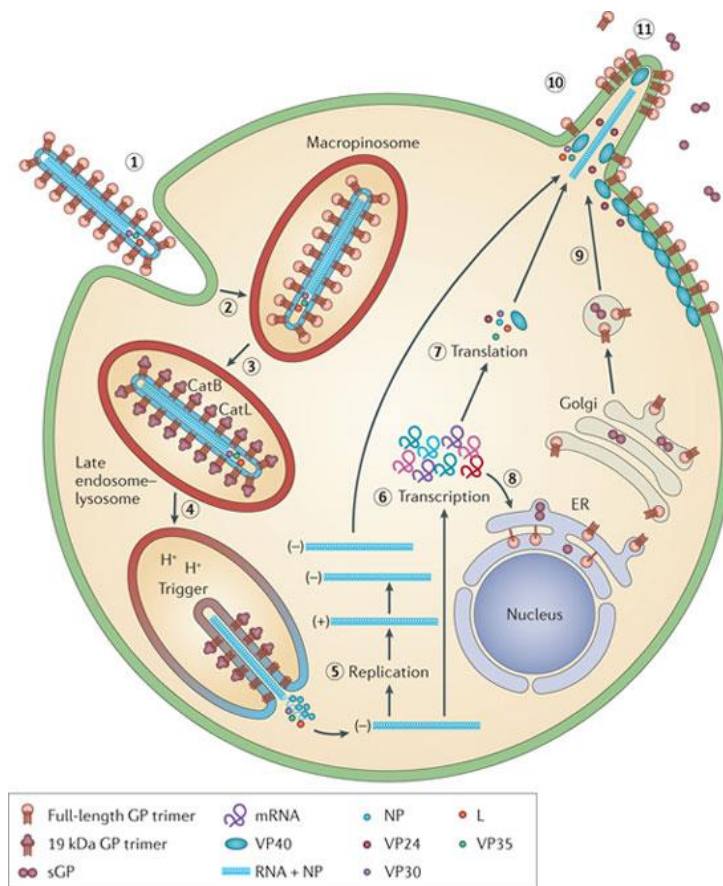


Slika 7. Sudbina GP gena virusa ebole u ćeliji domaćina. *ORF: *Open Reading Frame* – deo gena koji kodira protein (nema stop-kodona i dr.)³²

2.4. Replikacioni ciklus virusa

Virion dospeva do somatske ćelije nošen krvotokom ili limfom. Tačan mehanizam ulaska virusa u ćeliju nije razjašnjen do kraja. Izvesno je da je endocitoza posrednovana nekim od makromolekula sa površine ćelije domaćina, u prvom redu NPC1 proteinom. Niemann-Pick C1 (NPC1) je integralni membranski protein velikog broja ljudskih ćelija. Njegova primarna uloga je intracelularni transport holesterola do postlizozomskih destinacija, kao i transport različitih lipoproteina do kasnih endozomskih/lizozomskih (*late endosomes/lysosomes*, skraćeno LE/Ly) destinacija. Defekti u genu koji ga kodira dovode do genetske Niemann-Pick tip C bolesti.^{36,37} Utvrđeno je da su ulazak HIV virusa u ćeliju, kao i njegovo sklapanje i pupljenje u uskoj vezi sa mikrodomenima bogatim holesterolom, koji su u vezi sa NPC1 proteinom. Nedostatak ovog proteina povezan je sa akumulacijom holesterola i Gag proteina HIV-a u kasnim endozomima/lizozomima.^{38,39} Fibroblasti pacijenata obolelih od NPC genetske bolesti (nefunkcionalan NPC protein) otporni su na infekciju EBOV-om.^{40,41} Saharidne komponente virusnog GP krucijalne su za ostvarivanje interakcije sa ćelijskom membranom, naročito sa lektinima, na primer. U nekim slučajevima je, izgleda, moguća klasična pinocitoza od strane domaćina.^{31,32,33,34} Virus dospeva u citosol unutar endozoma i neophodno je da dođe do fuzije membrane endozoma i

spoljašnjeg omotača virusa. Endozomske proteaze katepsin B i L hidrolizuju GP_{1,2} na GP₁ i GP₂, nakon čega GP₂ jedinica dovodi do fuzije membrana.^{40,41,42,43} Kao posledica toga što je RNK virusa negativno polarizovana (neinfektivna), nakon ulaska nukleokapsida u citosol dolazi do njene replikacije u punoj dužini u infektivnu (replikativnu) antigenomsku RNK. Novonastala RNK potom biva replikovana dajući mnogostruko umnoženu virusnu, negativno polarizovanu RNK. Paralelno sa replikacijom, dolazi i do transkripcije RNK u sedam iRNK, svaka za po jedan od sedam gena filovirusa (slika 8). Informaciona RNK biva enkapsulirana virusnim nukleoproteinima, potom poliadenilovana, a na posletku njena translacija i modifikacija u ćelijskim ribozomima i Goldžijevom aparatu rezultuje mnogo puta umnoženim virusnim proteinima. Protein Pre-GP u Goldžijevom aparatu furinske proteaze hidrolizuju do GP₁ i GP₂, koji spajanjem disulfidnim mostom i daju GP_{1,2}. U toku ovih procesa transkripcije i replikacija RNK važna je katalizatorska i kofaktorska funkcija NP, VP30, VP35 i L. Na kraju, VP40 izaziva sklapanje novih, celih viriona i dovođenje nastalih ribonukleinsko-proteinskih kompleksa do membrane, stupajući u interakciju sa membranskim aktinom. Na membrani dolazi do spajanja sa GP, a onda do oslobađanja novih virusnih čestica, sposobnih da započnu novi replikacioni ciklus.^{31,32,33,34} Slika 8 shematski prikazuje ove procese.⁴⁴



Nature Reviews | Microbiology

Slika 8. Shematski prikaz replikacionog ciklusa virusa.⁴⁴

2.5. Patogeneza

Osim uloge u razmnožavanju virusa i učesća u njegovoj strukturi, proteini virusa imaju i uticaj na metabolizam zaraženih ćelija, ali i onih koje nisu podložne infekciji.

U ranoj fazi infekcije, glavni domaćin filovirusu u ljudskom organizmu jesu leukociti (monociti i makrofagi), kao i dendritske ćelije. Kada infekcija uznapreduje, virus je prisutan i u ćelijama endotela, hepatocitima, fibroblastima, a u manjoj meri i drugde u organizmu. Ćelije koje ne bivaju inficirane, ali koje uprkos tome doživljavaju ćelijsku smrt, su ćelije ubice i limfociti.^{31,32,45,46,47}

Postoje tri osnovna mehanizma ćelijske smrti - apoptoza (programirana ćelijska smrt, prilikom koje se umiruća ćelija postepeno smanjuje i na kraju razgrađuje na apoptozna tela); nekroza (ćelija i ćelijske organele bubre, nakon čega ćelijske membrane “cure”

odnosno materijal ističe i dolazi do vakuolizacije); i autofagija (kontrolisana reciklaža ukupnog ćelijskog sadržaja kroz formiranje vakuola sa dvostrukim membranama, autofagozoma, u kojima se vrši hidroliza i druge forme degradacija). Upravo kod ćelija koje nisu zaražene virusom – limfocita i ćelija ubica, uglavnom, ali ne isključivo, dolazi do apoptozne smrti, dok zaražene ćelije umiru na različite načine.^{33,48,49}

Nespecifični imunitet predstavlja prvu odbranu organizma, jer postoji i pre dospeća stranog organizma ili ksenobiotika i isti je za sve strane molekule ili organizme. Filovirusi inicijalno slabe upravo nespecifični imunitet. Zaražena ćelija proizvodi različite citokine, među njima interferone (IFN), koji predstavljaju signal odbrambenim ćelijama i mogu indukovati apoptozu zaražene ćelije, što virus pokušava da spreči. Postoje indicije da VP35 ometa funkcionisanje RIG-I i protein-kinaze R (PKR), koje imaju funkciju u produkciji interferona, na taj način sprečavajući apoptozu posredovanu mitohondrijama ćelije-domaćina i omogućujući nesmetano razmnožavanje virusa. Detektovan je povišen nivo imunoglobulinskih antitela odmah po nastanku infekcije, ali je kod fatalnih slučajeva zabeleženo da ovaj nivo ubrzo drastično opada. Veruje se da virusni proteini dospevaju u krvotok i da na neki način indukuju apoptozni odgovor kod limfocita: različitih T-ćelija i ćelija ubica, na taj način smanjujući i specifični imunitet organizma. Smatra se da u ovome ulogu igra GP virusa, ili neki od njegovih metabolita, ne samo neposredno, već i posredno, stupajući u interakciju prvo sa proteinima ćelijskih membrana i endoplazmatičnog retikuluma, usled čega dolazi do odvajanja ćelija od matičnih tkiva i njihove smrti. Druga bitna posledica oboljenja je gubitak barijerne funkcije endotela i vaskularna disfunkcija, premda broj ovih ćelija, iako zaraženih, ne opada značajno u toku bolesti. Jaka inflamatorna reakcija organizma, produkcija sekundarnih medijatora poput azot-monoksida verovatno je u neposrednoj vezi sa oštećenjima endotela i brzim smrtnim ishodom.^{32,33}

2.6. Terapeutske opcije

Još uvek ne postoji odobrena vakcina niti odobren terapeutik protiv filovirusa.⁵⁰ U narednom segmentu biće dat pregled najuspešnijih kandidata za lek ili profilaktik.

2.6.1. Vakcine

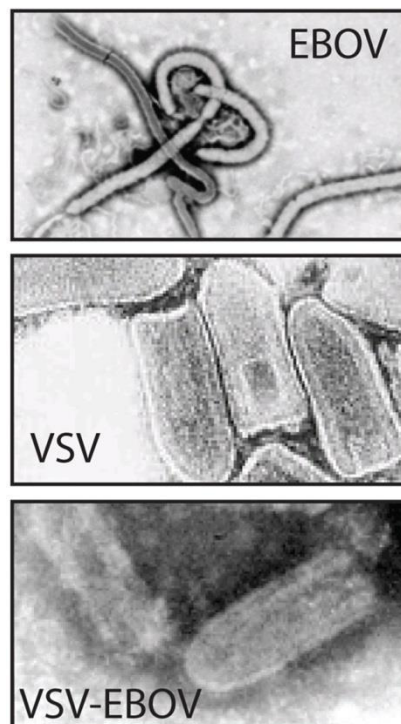
Uopšteno govoreći, za vakcine koje su trenutno u fazi kliničkih studija, kao i za one koje su ispitivane u prošlosti, važi ista metodologija istraživanja. Svi kandidati za vakcinu prvo se ispituju na miševima i zamorcima, ali se konačan sud o ulasku u kliničku fazu donosi na osnovu ispitivanja na “zlatnom standardu”, odnosno primatima.³⁴

Inaktivirani ili umrtvljeni celi virusi koriste se u klasičnom pristupu dobijanja vakcina. Ovaj pristup primenjen je i u istraživanju kod filovirusa, ali bez mnogo uspeha. Vakcine ovog tipa bile su efikasne jedino kod glodara, i to samo prilikom izlaganja životinja manjim količinama virusa. Takođe, bilo je problema sa reproduktivnošću rezultata. Stoga danas govorimo jedino o vakcinama novije generacije, odnosno vakcinama zasnovanim na virusnim vektorima – promoterima, DNK vakcinama i vakcinama zasnovanim na virusolikim česticama (*virus-like particle*, VLP).^{32,34,51}

DNK vakcine predstavljaju sintetičke, prečišćene plazmide, koji kodiraju jedan ili više proteina virusa. U slučaju filovirusa, istraživanja su najčešće zasnovana na GP i NP proteinima, pri čemu se vakcina sastoji samo od plazmida koji kodira GP ili NP, ili češće od adenovirusom-naglašenog koda GP ili NP. Sam adenovirus (serotip 5, skr. AdV) već je prisutan u ljudskom organizmu, a fragmenti sekvence nukleotida iz njegovog genoma podstiču ili naglašavaju ekspresiju gena pored kojih se u nukleinskoj kiselini nalaze. Zamenom gena adenovirusa genima filovirusa dobijaju se vakcine.^{34,52} Po analogiji sa ovim, razvijani su pristupi koji koriste vektore rekombinantnih virusa. Umesto nukleinske kiseline, koristi se ceo virus, na primer virus humane parainfluence tipa 3 (HPIV3) ili virus vezikularnog stomatitisa (VSV; rekombinantni virus vezikularnog stomatitisa - rVSV), što rezultuje jačim odgovorom imunog sistema. Iz genoma virusa koji je niske patogenosti za čoveka i koji izaziva lake tegobe, kao što je VSV, može se ukloniti gen ili geni koji su najveći patogeni (recimo G-gen kod VSV-a) i zameniti, na primer, GP genom virusa marburga ili ebole.^{52,53} Virusolike čestice treća su vrsta vakcina novije generacije. Geni određenih proteina filovirusa (GP, VP40, NP, VP24) unose se u formi sintetičkih plazmida ili u okviru modifikovanih genoma drugih virusa (poput bakulovirusa) u T-ćelije sisara ili Hi5 i Sf9 ćelije. Ekspresivani proteini virusa u ovim ćelijama dovode do pupljenja čestica sličnih virusu (prisustvo GP i VP40

je neophodan uslov). Ovako dobijene VLP, uz dodatak adjuvanata, predstavljaju vakcinu.^{34,54}

Nekoliko vakcinskih platformi dospelo je do naprednih faza kliničkih studija, pa će o njima biti rečeno nešto više. Naučnici iz Agencije za javno zdravlje Kanade (*Public Health Agency of Canada*) razvili su rVSV-ZEBOV vakcinu početkom ovog veka.⁵⁵ Kao što samo ime kaže, glikoprotein *Zaire ebolavirus* (EBOV, ranije ZEBOV) inkorporiran je u genom rekombinantnog virusa vezikularnog stomatitisa, slika 9. Imunološki značaj glikoproteina proizilazi iz tog što je on jedini protein filovirusa prisutan na površini viriona.⁵⁶ Vakcina se pokazala bezbednom i efikasnom u glodarima poput miševa, hrčkova i zamoraca.^{56,57,58} Nakon toga, utvrđeno je da vakcina pruža potpunu zaštitu primatima kada se primenjuje od 31. do 7. dana pre infekcije, a delimičnu zaštitu kada se primenjuje od trećeg do prvog dana pre infekcije.^{59,60,61,62}



Slika 9. Transmisiona elektronska mikroskopija virusa ebole (EBOV), virusa vezikularnog stomatitisa (VSV) i rVSV-(Z)EBOV.⁶³

Međutim, u nekoliko kliničkih studija u fazi I u toku 2014. i 2015. godine 22% učesnika imalo je groznicu nakon vaknacije, a primećena su i druga neželjena

dejstva.^{64,65} Na kraju je u toku epidemije u Zapadnoj Africi, klusterskim uzorkovanjem na velikoj skali, izvedena faza III kliničkog ispitivanja (u regionu Konakrija u Gvineji i u regionima Tomkolili i Bombali u Sijerli Leone).⁶⁶ Korišćen je isti pristup vakcinacije “u prstenovima” (ring vaccination), poput onog koji je korišćen prilikom iskorenjivanja velikih boginja. Sastavljeni su spiskovi osoba sa kojima su zaraženi bili u kontaktu i spiskovi onih sa kojima su ti kontakti bili u kontaktu, da bi potom ljudi sa spiskova bili nasumično svrstani u klastere 1:1, od kojih je jedan klaster odmah vakcinisan, dok je drugi vakcinisan nakon 21 dana od početka studije. U klasteru koji je odmah primio vakcinu (2119 osoba) nije bilo slučajeva ebole u prvih 10 dana od trenutka vakcinacije, dok je u drugom klasteru (2041 osoba) u istom periodu bilo 16 slučajeva ebole. Više od pola učesnika (53,9%, odnosno 3149 osoba) prijavilo je neka neželjena dejstva, ali je samo 80 učesnika prijavilo ozbiljnije tegobe.

Druge dve uspešne vakcine-kandidati koriste AdV pristup. I kod jedne i kod druge GP virusa ebole zauzima “rani region” nativnog adenovirusa, što rezultuje virusom koji ne može da se razmnožava.⁶⁷

Prva od ove dve vakcine razvijena je početkom 2000-ih od strane Nacionalnog instituta za alergije i infektivne bolesti Sjedinjenih Američkih Država (NIAID), polazeći od obične DNK vakcine.⁶⁸ Naporima NIAID-a brzo se priključio GlaxoSmithKline. Iz bezbednosnih razloga, prvi eksperimenti koristili su modifikovani EBOV GP u formi DNK vakcine, nakon čega se prešlo na neizmenjeni gen *wildtype* glikoproteina, koji se pokazao bezbednim u fazi I kliničkih studija.⁶⁹ Posle ovih obećavajućih rezultata, napravljena je nova vakcina koja je uključila je vektor adenovirusa 3 šimpanzi (cAd3).⁷⁰ Vakcina je sadržala gen glikoproteina i *Zaire* i *Sudan* vrste. U eksperimentima na primatima ispostavilo se da je potrebno još jedno pojačanje dejstva (*boost*) atenuisanom vakcinom poksivirusa (*modified vaccinia Ankara*, MVA), kako bi zaštita bila produžena na 10 meseci nakon vakcinacije. Na kraju, cAd3-EBO vakcina ušla je u fazu I kliničkih studija 2014. godine, u dve forme - *Zaire* GP i kao kombinacija *Sudan* i *Zaire* GP.^{71,72} Stvaranje antitela specifičnih za glikoproteine virusa uspešno je indukovano, uz pravilnu zavisnost od doze (*dose-dependant*), kod svih učesnika. Doze su se kretale od 1×10^{10} jedinica virusnih čestica (*viral particle units*, pu) do 2×10^{11} pu. Neželjena dejstva takođe su pokazala pravilnost u odnosu na

primenjenu dozu, pri čemu je 56% dobrovoljaca prijavilo blaga neželjena dejstva, dok je do 20% imalo povišenu telesnu temperaturu jedan dan nakon vakcinacije. Nije bilo ozbiljnih neželjenih dejstava. U zavisnosti od toga o kojoj je konkretno vakcini reč i u zavisnosti od primenjene doze, za zaštitu u trajanju od 48 nedelja može biti potrebna dodatna MVA vakcina (mereno titrima anitela).

Na posletku, treća uspešna platforma koristi ljudski AdV vektor, i to serotip Ad26, koji je ređi od uobičajenog serotipa Ad5, zbog čega je veća verovatnoća da će prevazići postojeći imunitet.^{73,74,75,76,77} Dve kombinacije vakcina prošle su fazu I kliničkih ispitivanja, pri čemu je u jednoj Ad26-ZEBOV korišćen kao osnovna vakcina, a MV-BN-Filo kao pojačanje (boost), dok je u drugoj bilo obrnuto. Vakcina za pojačanje primenjivana je dve, četiri ili osam nedelja nakon prvobitne vakcinacije. Jačina doze bila je 5×10^{10} pu za osnovnu vakcinu i 1×10^8 pu za vakcinu za pojačanje dejstva. Zdravstveno stanje učesnika praćeno je 360 dana nakon vakcinacije (duže nego u ijednoj drugoj studiji). Zaključeno je da je vakcina bezbedna i da pruža dugotrajnu zaštitu, naročito u slučaju kad je MVA-BN-Filo vektor u osnovnoj vakcini, dok je režim gde je Ad26-EBOV u osnovnoj vakcini bolji za bržu imunizaciju, odnosno za hitne slučajeve.

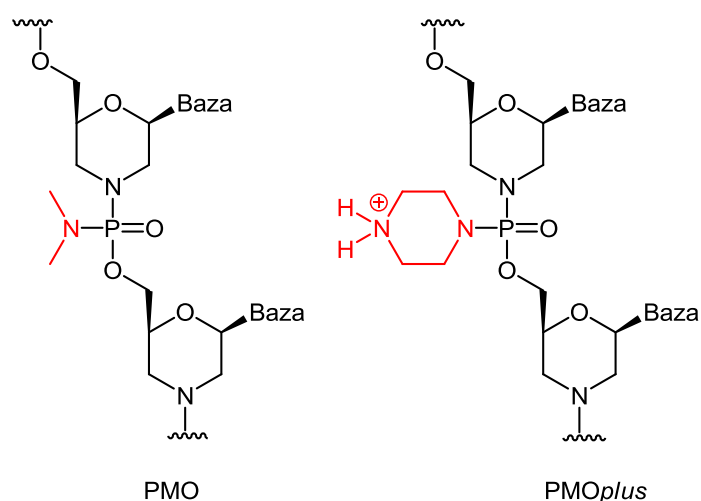
2.6.2. Makromolekulski terapeutici

Četiri pristupa koja se zasnivaju na različitim makromolekulima imala su zapažen uspeh u borbi protiv filovirusa.

Među prvima razvijen je terapeutik na bazi kratkih (ili „malih“) interferirajućih RNK (*small interfering RNA*, siRNA). Pretpostavilo se da bi sintetičke siRNK, komplementarne informacionim iRNK koje kodiraju proteine virusa, mogle da prekinu proces translacije virusa. Čelija domaćin prepoznala bi kompleks koji bi se nagradio između iRNK i komplementarnih siRNK i lizirala bi ga, na taj način „utišavajući“ gene virusa (*gene silencing*). Kanadska kompanija razvila je male lipidne nanočestice koje sadrže enkapsulirane siRNK komplementarne iRNK polimeraze L, proteina VP24 i polimeraznog kofaktora VP35 – preparat pod nazivom TKM-Ebola.^{78,79,80,81} Ovaj preparat, koji se primenjuje intravenozno, doživeo je zastoje u fazi I kliničkih studija tokom epidemije u Zapadnoj Africi, jer je državna regulatorna

ustanova Sjedinjenih Država za hranu i lekove (*Food and Drug Administration, FDA*) prolongirala istraživanje zbog bojazni o bezbednosti TKM-Ebole. Nažalost, u ograničenoj fazi II u Sijeri Leone pokazano je da formulacija ne povećava stopu preživljavanja u poređenju sa istorijatom preživljavanja u kontrolnim grupama.⁸¹

Slično ovom pristupu, kasnih 1990-ih sintetisani su antisens fosfodiamidatni oligomeri (*phosphorodiamidate morpholino oligomers, PMOs*) kao surogati RNK. Utvrđeno je da se njihova struktura može podešavati tako da bude komplementarna određenim nukleotidnim sekvencama, slično kao siRNK (shema 1). Početkom 2000-ih utvrđeno je da PMO molekuli koji imitiraju sekvence VP24, VP35 i polimeraze L virusa ebole pružaju zaštitu rezus makakiima.⁸² Potom je je jedna privatna kompanija razvila više formulacija pod nazivom AVI 6002, AVI 6003, AVI 7537 i AVI 7228, od kojih je svaka bila dizajnirana da bude komplementarna nekima od gena virusa ebole ili marburga, pri čemu su korišćene unapređene, *PMPplus* strukture (shema 1). U fazi I kliničkih studija pokazalo se da su ovi preparati bezbedni, da ih učesnici dobro tolerišu i da imaju potencijala da budu korišćeni kao profilaktici nakon potencijalno opasnog kontakta sa virusom ili zaraženom osobom.^{83,84} Međutim, nikakve informacije o daljem razvoju ove formulacije nisu objavljene u dostupnoj naučnoj literaturi.⁸⁵



Shema 1. Strukturni motivi PMO i PMOplus oligomera.⁸⁴

Agencija za javno zdravlje Kanade, Vojno-medicinski institut za infektivne bolesti Sjedinjenih Država (*United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases, USAMRIID*) i NIAID, učestvovali su u razvijanju terapeutika zasnovanog na

antitelima, pri čemu su se u istraživanje kasnije uključile i različite kompanije.^{86,87,88,89} Konkretno, koktel tri različita antitela, pod nazivom ZMapp, dobijen je iz miševa zaraženih virusom ebole. DNK koja kodira monoklonska antitela prikupljena je iz hibridoma proizvedenih kombinacijom ćelije slezine zaraženih miševa sa besmrtnom ćelijskom linijom mijeloma. Potom je DNK modifikovana genetskim inženjeringom da kodira antitela pogodna za ljudsku upotrebu, pa su ovakvi, izmenjeni geni, ubačeni u biljku duvana putem izmenjene bakterije *Agrobacterium*, koja inače napada biljke. Na posletku se iz umiruće biljke duvana skupljaju velike količine antitela. Kada je utvrđeno da je formulacija bezbedna za upotrebu na primatima, otpočele su kliničke studije.⁸⁶ Strah od nekontrolisanog širenja zapadnoafričke epidemije rezultovao je kliničkom studijom na zaraženim ljudima.⁸⁷ U kontrolnoj grupi koja je primala samo standardnu bolničku negu umrlo je 13 od 35 pacijenata (37%), u poređenju sa 8 od 36 pacijenata (22%) u grupi koja je pored standardne nege primila ZMapp. Statistička obrada podataka pokazala je da ZMapp primenjen na vreme povećava stepen preživljavanja za 91,2%.

Poslednja strategija koja će ovde biti spomenuta je ona koja se zasniva na makromolekulskim glikodendritskim strukturama, koja je u razvoju od početka ovog veka.⁹⁰ Interakcija GP virusa ebole sa ICAM-3-hvatajućim ne-integrinom (DC-SIGN) specifičnim za dendritske ćelije može biti inhibirana ugljenim hidratima koji imitiraju glikane GP virusa. Interakcija sa DC-SIGN ključna je za ulazak virusa u dendritske ćelije, koje su, kako je već rečeno ranije, važne za početnu fazu razmnožavanja virusa u organizmu. Za efikasnu interakciju neophodni su polivalentni ugljeni hidrati, pa su zbog toga dendritski polimeri sa saharidnim završecima bili adekvatno rešenje. Najefikasnijim su se pokazali oni sa fullerenskim ili čak VLP jezgrima sa do 1620 kopija manoze na površini.^{91,92} Kao potvrda koncepta, T-ćelije, inače otporne na ulazak virusa, transformisane su u susceptibilne ćelije dodatkom DC-SIGN. Rekombinantni VSV koji eksprimira GP virusa ebole, lakši za rad od prirodnog virusa, korišćen je u ogleđima u kojima su dendritski polisaharidi pokazali IC₅₀ vrednosti i do ~ 900 pM.

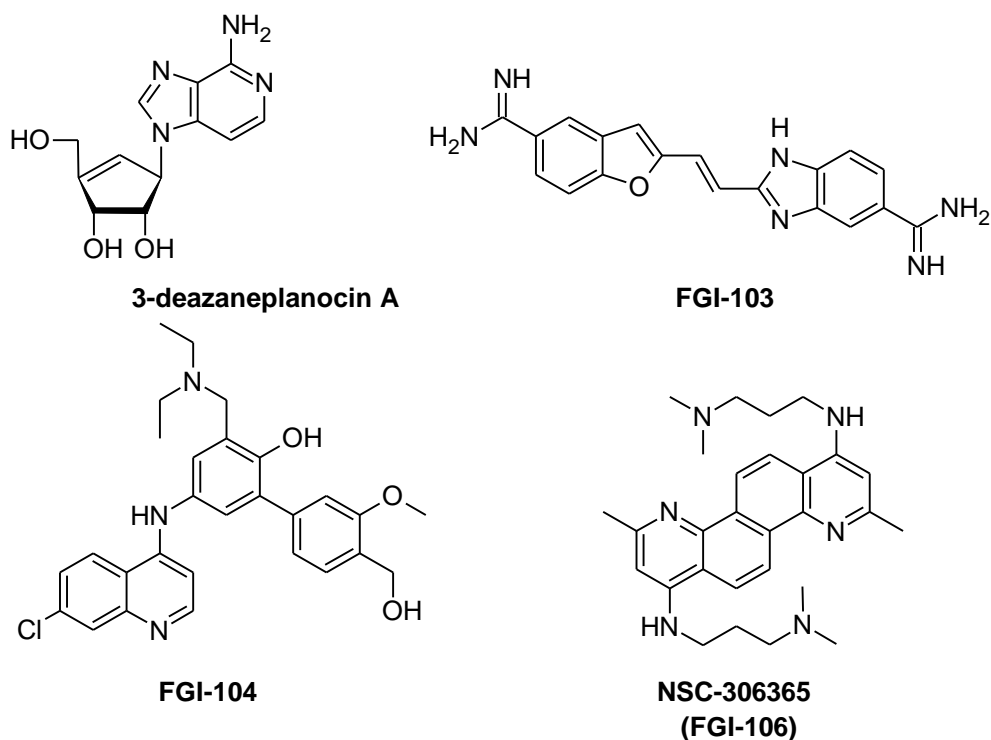
2.6.3. Mali molekuli

U poslednjih 20 godina sintetisan je, ili izolovan iz prirodnih izvora, veliki broj malih molekula aktivnih prema filovirusima. Ovde će biti dat hronološki prikaz najaktivnijih jedinjenja.

Krajem poslednje decenije prošlog veka otkriveno je da 3-deazaneplanocin A,⁹³ antitumorski lek i inhibitor sinteze S-adenozil-L-homocisteina, poseduje antifilovirusnu aktivnost. Utvrđena je $IC_{50} = 2 \mu M$, i porast lučenja interferona- α u zaraženim miševima. Jedinjenje (shema 2) je dovelo do izlečenja 5/5 zaraženih miševa jednom dozom 1 mg/kg prvog ili drugog dana nakon infekcije EBOV-om. Ova visoka aktivnost, dobijena u ranoj fazi istraživanja inhibitora virusa ebole, teško da je uporediva sa savremenim aktivnostima, naročito jer rezultati eventualnih daljih ispitivanja aktivnosti 3-deazaneplanocina A izostaju iz literature.^{94,95}

Osetan napredak na ovom polju dogodio se krajem prve decenije ovog veka. Američke kompanije *Functional Genetics* i *Integrated Biotherapeutics*, u saradnji sa USAMRIID, sprovele su jedan broj *high-throughput* skrininga (HTS), pri čemu je otkriven izvestan broj supstanci sa zapaženom antifilovirusnom aktivnošću. Iz ovog istraživanja proisteklo je više naučnih publikacija i patenata, a istakle su se tri vodeće strukture.

Jedinjenje koje je dobilo naziv FGI-104 (shema 2) sadrži *p*-aminofenolnu i aminohinolinsku farmakoforu i podseća na jedinjenja sa antimalarijskom aktivnošću. Utvrđena je $EC_{50} = 10 \mu M$, a jedinjenje dovodi do izlečenja 10/10 zaraženih miševa pri dozi 10 mg/kg, uz primenu jedan put na dan počevši sa danom inficiranja (nulti dan), pa do devetog dana infekcije.^{96,97} Postavljena je hipoteza da ovo jedinjenje inhibira Tsg101 protein (*Tumor Susceptibility Gene 101*), koji ima više važnih funkcija unutar ćelije, između ostalog u funkcionisanju endo-lizozomskog sistema. Ispostavilo se da ovaj protein (kao i E3 ubikvitin ligaza Nedd4, i protein AIP1/Alix) može stupiti u interakciju sa nekim od proteina različitih virusa, što omogućava ili olakšava pupljenje novih viriona.^{98,99,100} Na primer, utvrđeno je da se L-domeni VP40 proteina marburga vezuju za Tsg101, kao i da se L-domeni VP40 proteina ebole vezuju za Nedd4 i Tsg101.^{101,102,103,104} Iako se prvobitno mislilo da su ove interakcije neophodne za pupljenje virusa, kasnije je utvrđeno da proteini virusa mogu iskoristiti i druge proteine ESCRT-1 puta domaćina za transport do membrane i pupljenje.¹⁰⁵



Shema 2. Strukture jedinjenja 3-deazaneplanocin A, FGI-104, FGI-103 i FGI-106.

Druga aktivna struktura dobila je naziv FGI-103 (shema 2). Ovo jedinjenje poseduje benzo[*b*]furanski i benzoimidazolski prsten, kao i amidinsku-grupu, a pokazalo je izrazitu *in vitro* aktivnost, sa $EC_{50} = 0,1 \mu\text{M}$ (EBOV), odnosno $2,5 \mu\text{M}$ (MARV). U *in vivo* eksperimentu, jedinjenje je dovelo do izlečenja 10/10 miševa dozom 10 mg/kg , primenjivanom jednom dnevno prvog, ili nultog, drugog i petog dana.^{106,107} Mehanizam dejstva ostao je nerazjašnjen.

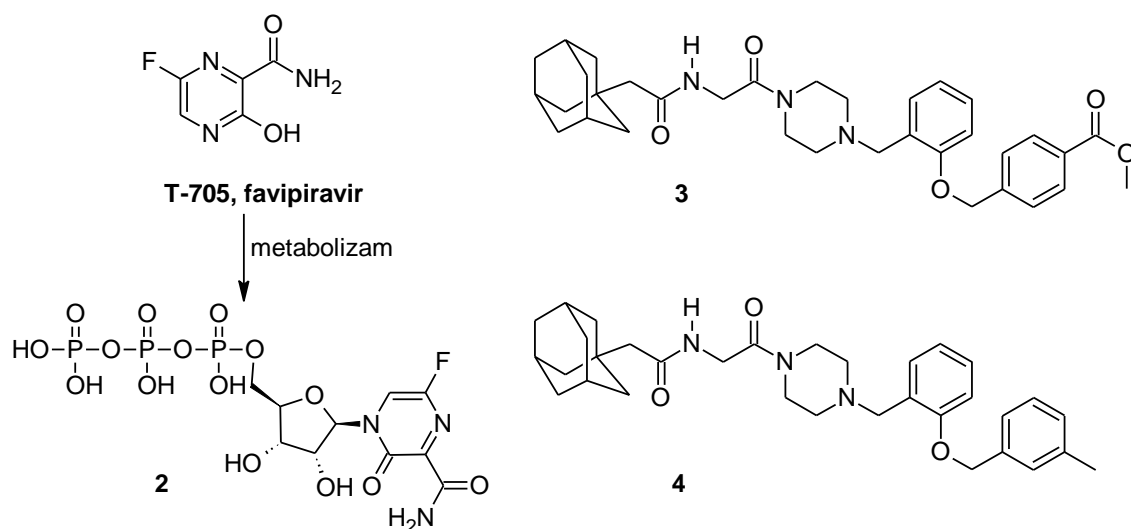
Poput 3-deazaneplanocina A, i FGI-103 i FGI-104 nisu ušli u naprednija ispitivanja, ili bar tako nešto nije objavljeno, a o razlozima za to može se samo spekulirati.

Treće jedinjenje za koje je putem HTS utvrđeno da poseduje izrazitu aktivnost je FGI-106 (NSC-306365, shema 2). Ovo jedinjenje poseduje dialkilamino-diazahrizenski prsten, sa dve amino-grupe na krajevima alkil-nizova. Autori istraživanja saradivali su na jedinjenju FGI-106 i njegovim analogima sa istraživačkom grupom profesora Šolaje sa Univerziteta u Beogradu, iz čega je proisteklo više posebnih i zajedničkih publikacija i patenata.^{97,108,109,110,111,112,113} Za jedinjenje NSC-306365 (FGI-106) utvrđeno je da poseduje ne samo antifelovirusnu aktivnost, već i to da u *in vitro*

uslovima inhibira veliki broj najrazličitijih vrsta patogenih virusa. U jednom od patenata tvrdi se da jedinjenje inhibira interakciju sa Tsg-101, poput FGI-104, te da samim tim ima mehanizam dejstva zasnovan na delovanju na ćeliju domaćina (*host-based mechanism*), u drugom patentu navodi se da jedinjenja ovog tipa deluju inhibirajući enzime kaspaze, dok se pak u jednom radu navodi da jedinjenje inhibira ulazak virusa u ćeliju. Za sam NSC-306365 (FGI-106) prvobitno je publikovano da poseduje inhibitornu aktivnost $IC_{50} = 0,1 \mu M$ i da dovodi do izlečenja 10/10 miševa dozom 5 mg/kg, primenjivanom jednom dnevno nultog, prvog, trećeg i petog dana. Međutim, u toku kasnijeg istraživanja utvrđeno je da ovakvi rezultati ne mogu biti reprodukovani. Kao i sa FGI-103 i FGI-104, usavršavanje *in vitro* i *in vivo* esejja dovelo je do spoznaje o nešto slabijoj aktivnosti ovih jedinjenja. Publikacija iz 2011. godine u prvi plan je istakla tri analogna jedinjenja, koja su se prilikom *in vitro* testiranja pokazala bolje od NSC-306365 (FGI-106), pri čemu su se IC_{50} vrednosti sva tri jedinjenja nalazile u opsegu od 2,5 do 5,0 μM , što je za red veličine lošija inhibitorna sposobnost od one objavljene u prvim patentima.

Potom je publikovano nekoliko studija sa jedinjenjima (shema 3) o kojima kasnije nije bilo više reči u dostupnoj literaturi, poput heterocikličnog jedinjenja **1** (EBOV $IC_{50} = 10 \mu M$, MARV $IC_{50} = 12,5 \mu M$), porfirina hlorin e6 (MARV $IC_{50} = 4,5 \mu M$) ili polifenola NSC-62914 (EBOV $IC_{50} = 5,2 \mu M$, profilaktička aktivnost u studiji na miševima).^{114,115,116} Slično je bilo sa jedinjenjima koja su se pojavila nešto kasnije, poput retinazona (EBOV $EC_{50} = 830 nM$), (-)-epigalokatehin-galata (EBOV $IC_{50} \sim 50 \mu M$) i nekih drugih jedinjenja.^{117,118,119,120} Jedinjenje LJ001, čija je struktura objavljena u časopisu *PNAS* 2010. godine, pokazalo je visoku inhibitornu aktivnost prema širokom spektru virusa (npr. EBOV $IC_{50} = 0,5-1 \mu M$).¹²¹ Međutim, ubrzo se proširila svest o postojanju “promiskuitetnih” jedinjenja, odnosno jedinjenjima koja imaju tendenciju da se pokažu aktivnim u većini esejja (*pan-assay interference compounds*, PAINS), a upravo je rodaninska funkcionalna grupa, prisutna kod LJ001, jedna od grupa povezanih sa PAINS svojstvima.¹²²

sprovesti studiju gde bi jedna grupa bolesnika primala favipiravir, dok druga, kontrolna grupa ne bi. Zbog toga je favipiravir dat svim učesnicima studije, koja se, usled ovakvog pristupa, ne smatra legitimnom. Ipak, utvrđeno je da je svih 99 pacijenata dobro podnelo terapiju favipiravirom, pri čemu je u toku terapije dolazilo do prosečnog smanjenja koncentracije virusa u uzorcima 48 preživelih pacijenata brzinom od 0,33 \log_{10} čestica po mL po danu.¹²⁶

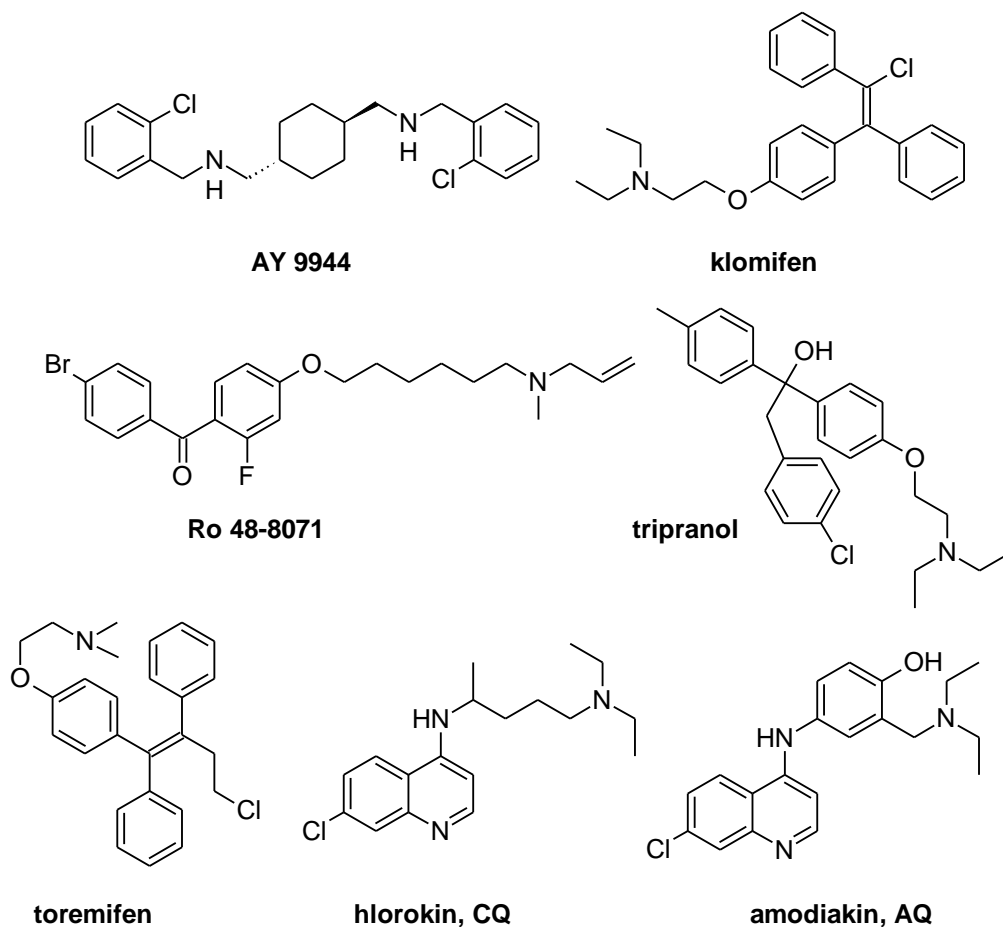


Shema 4. Strukture odabranih inhibitora filovirusa i metabolička transformacija favipiravira.

Veoma zapažena klasa jedinjenja, razvijena je u Harvardskoj školi medicine, u istraživačkoj grupi profesora Cunningham-a. Vodeća (*lead*) struktura otkrivena je putem HTS, nakon čega je sintetisana grupa strukturnih analoga.^{127,128,129} Najaktivnijim pokazala su se jedinjenja **3** (EBOV $IC_{50} = 0,02 \mu M$), i **4** (EBOV $IC_{50} = 0,35 \mu M$), a zajedničko za sve strukture je da poseduju adamantanski prsten, dve peptidne veze i piperazinski prsten (shema 4). Autori su utvrdili da jedinjenja inhibiraju ključnu interakciju GP i NPC,¹³⁰ na taj način sprečavajući ulazak virusa u ćeliju.

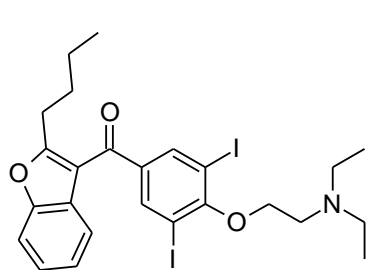
U toku 2013, 2014. i 2015. godine došlo je do zamaha u ispitivanju antifilovirusne aktivnosti već odobrenih lekova (*drug repurposing*), delimično i usled vanrednih okolnosti koje su nastale izbijanjem epidemije u Zapadnoj Africi.^{131,132,133,134,135,136} U studiji iz 2013. godine utvrđeno je da mnoga poznata jedinjenja (lekovi) poseduju određenu *in vitro* aktivnost na virus ebole, pri čemu su se kao najaktivnija izdvojila

četiri jedinjenja – AY 9944, Ro 48-8071, tripranol i klomifen (EBOV IC₅₀ = 1,65-2,42 μM; shema 5).¹³¹ Iako jedinjenja iz ove studije imaju različita farmakološka svojstva, primećeno je da sva pripadaju strukturama tipa CAD (katjonskim amfifilnim lekovima, *Cationic Amphiphilic Drugs*). Sva aktivna jedinjenja iz ove publikacije dovode do gomilanja holesterola u LE/Ly i sprečavaju ulazak virusa ebole u ćeliju. Oba ova fenomena dovedena su u vezu sa potencijalnom interakcijom sa NPC1 proteinom, ali mehanizam nije rasvetljen do kraja. Iste godine u okviru druge studije testirano je više selektivnih modulatora estrogenskog receptora (SERM-jedinjenja). Toremifen (shema 5) se pokazao najaktivnijim na različite filoviruse u *in vitro* uslovima, a prilikom testiranja na miševima bio je uspešan tek pri dozi 60 mg/kg, štiteći 5/10 miševa, dok je u istoj studiji i pri istim uslovima klomifen štatio 9/10 miševa.¹³⁶ U trećoj studiji iste godine izvršeno je testiranje različitih već odobrenih lekova, pri čemu su se među jedinjenjima čija je aktivnost interesantna našli hlorokin (CQ) i amodiakin (AQ). Ova jedinjenja potom će biti predmet još nekoliko studija, u kojima će se ispostaviti da prvobitni rezultati, sudeći po kojima hlorokin i amodiakin štite miševе na dozi 90 mg/kg, nisu podržani drugim *in vivo* studijama.^{133,134,137,138}

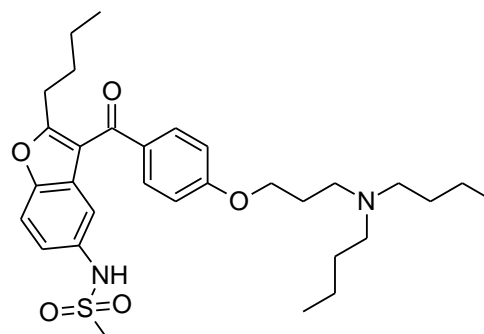


Shema 5. Strukture odabranih inhibitora filovirusa tipa CAD.

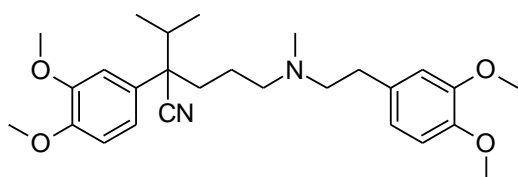
Godine 2014. utvrđeno je da jedinjenja koja su već klinički odobreni terapeutici amiodaron i donedaron (inhibitori više jonskih kanala i antagonisti andrenergičkih receptora; koriste se kao antiaritmici) i verapamil (blokator Ca^{2+} jonskih kanala L-tipa, antiaritmik i lek protiv hipertenzije) pokazuju značajan stepen inhibicije filovirusa (shema 6). Na primer, IC_{50} vrednosti za amidaron iznose za EBOV 2,02 μM , a za MARV 1,73 μM .¹³² Autori su primetili sličnost sa radom¹³¹ iz 2013. godine. I ova tri leka mogu se svrstati u jedinjenja tipa CAD, a njihove amonijum-soli imaju pKa vrednosti 8,5, 9,8 i 8,8 (redom amiodaron, donedaron i verapamil), pa je pretpostavljen i sličan mehanizam dejstva. Najaktivniji u *in vivo* studiji na miševima (eksperimenti izvođeni na grupama od po 10 C57BL/6 miševa) bili su antidepressant sertalin (štiti 7/10 miševa pri dozi 20 mg/kg/dan) i blokator Ca^{2+} kanala bepridil (štiti 10/10 miševa pri dozi 24 mg/kg/dan), čije su strukture date na shemi 6.¹³⁵



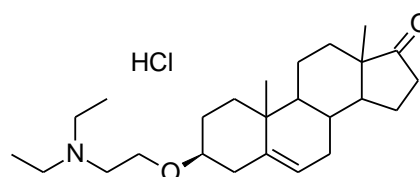
amiodaron



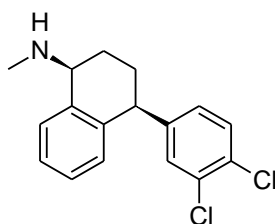
donedaron



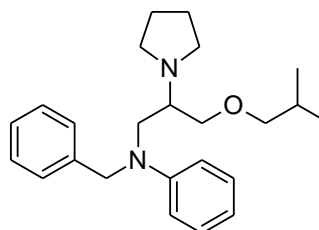
verapamil



U18666A



sertalin



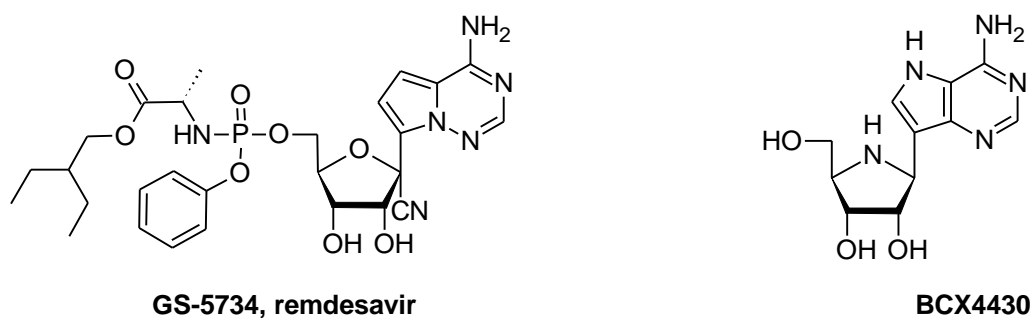
bepridil

Shema 6. Strukture odabranih inhibitora filovirusa tipa CAD.

Nedavno su publikacije zasnovane u najvećoj meri na eksperimentima sa klomifenom, toremifenom i U18666A (SERM jedinjenja; struktura jedinjenja U18666A data je na shemi 6) ponovo ukazale na značaj CAD strukturnog elementa.^{139,140} Ustanovljeno je da jedinjenja tipa CAD inhibiraju ulazak virusa u ćeliju, ali da ne stupaju u interakciju sa domenom A niti sa domenom C NPC1 proteina, pri čemu je domen C odgovoran za interakciju sa GP filovirusa. Dejstvo se ispoljava u LE/Ly fazi. Jedinjenja se protonuju i ostaju zarobljena u vakuolama, što dovodi do odvajanja kisele sfingomijelinaze od membrane vakuole, što pak dovodi do opadanja nivoa sfingozina (sprečena je hidroliza sfingomijelina). Nizak nivo sfingozina povezan je sa nemogućnošću da joni kalcijuma napuste LE/Ly kroz dvoporne jonske kanale (TPC1 i TPC2), što dovodi do akumulacije kalcijumovih jona. S druge strane, povišen nivo Ca^{2+} , povezan je, na nejasan način, sa

sprečenošću GP filovirusa da doživi konformacijsku promenu neophodnu za ininterakciju sa NPC1. Takođe, spekulise se da jedinjenja nisu sprečila acidifikaciju vakuola, neophodnu za funkcionisanje katepsina B i L, niti su na neki drugi način inhibirala katepsine B i L. O ovome će biće još reči u Našim radovima.

Na kraju, treba spomenuti dva derivata monosaharida, odnosno analoga nukleotida – BCX4430 i GS-5734 (shema 7). U razvoju ovih jedinjenja učestvovali su USAMRIID, NIAID i različite kompanije u privatnom vlasništvu u Sjedinjenim Državama. I jedno i drugo jedinjenje pokazuju jači afinitet prema prema RNK polimerazi virusa od afiniteta prema RNK polimerazi ljudske ćelije – domaćina. Drugim rečima, na način sličan favipraviru, ova dva jedinjenja inhibiraju umnožavanje virusa umećući se umesto nativnih nukleotida u korake umnožavanja RNK. Jedinjenje BCX4430 je ranije otkriveno u jednom HTS poduhvatu velikih razmera.¹⁴¹ Ova supstanca sa $IC_{50} \sim 3,4 \mu M$ (EBOV) prvi je mali molekul testiran na primatima. BCX4430 je lečio sve zaražene majmune dozom 15 mg/kg, uz primenu dva puta dnevno, 12 dana (eksperimenti vršeni na grupama od devet ili deset majmuna). U *in vitro* testovima novije jedinjenje GS-5734 ili remdesavir, pokazalo se kao superiornije (EBOV $IC_{50} = 0,06 \mu M$).¹⁴² Struktura se ponaša kao prolek, metabolišući se do trifosfata, koji se ugrađuje u rastući RNK lanac i prekida njegovu dalju sintezu. Jedinjenje nije aktivno u miševima, ali leči 6/6 zaraženih makaki majmuna (*Macaca fascicularis*) pri dozi 3,3 mg/kg/dan. U toku epidemije u Zapadnoj Africi dva pacijenta primila su GS-5734 (*compassionate use*^e), a u međuvremenu je ovo jedinjenje ušlo u prvu kliničku studiju.¹⁴³



Shema 7. Strukture odabranih nukleotidnih analoga inhibitora filovirusa.

^e *Compassionate use* predstavlja individualnu primenu neodobrenog, eksperimentalnog terapeutika, van kliničke studije, iz saosećanja i pod strogo kontrolisanim uslovima.
<https://www.ema.europa.eu/en/glossary/compassionate-use>

3. NAŠI RADOVI

U ovom delu biće predstavljeni rezultati dobijeni u toku izrade ove disertacije. Na početku, predstavljena je opšta zamisao koja proishodi iz pregleda literature i postojećih saznanja.

3.1. Osnovni koncept i hemijska sinteza

3.1.1. Sinteza diazahrizenskih derivata supstituisanih dvema istim alkilamino-grupama – prva grupa jedinjenja

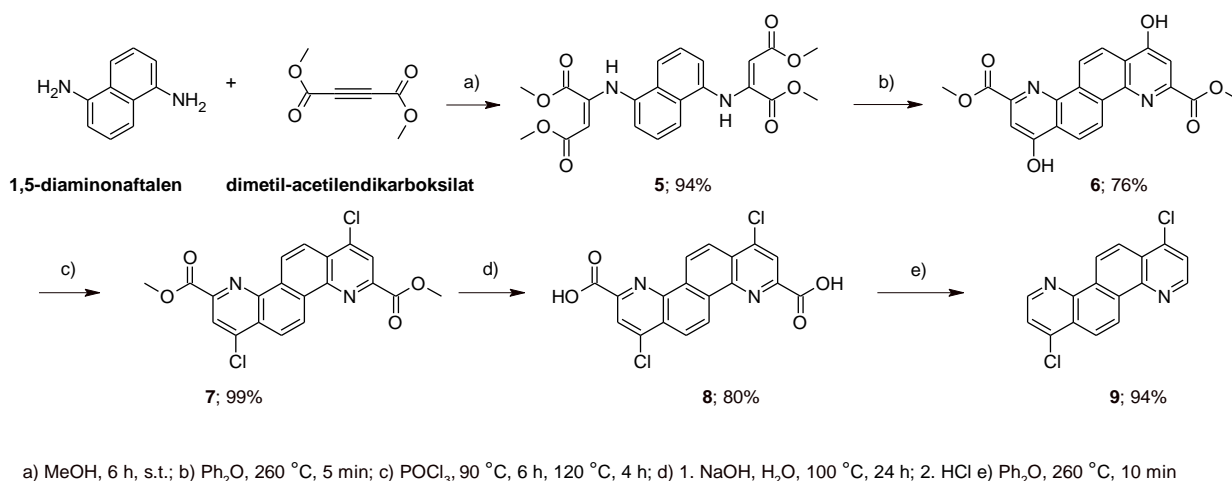
Kao što je rečeno u Opštem delu, istraživačka grupa profesora Šolaje u okviru koje je izrađena ova doktorska teza saradivala je sa USAMRIID na istraživanjima vezanim za jedinjenje NSC-306365 (FGI-106)^{97,108,109,110,111,112} i njegove derivate, koji spadaju u grupu supstituisanih diazahrizena.

Ideja na početku izrade ove doktorske disertacije, podstaknuta preliminarnim ogledima izvedenim na kraju izrade master teze kandidata, bila je da se dialkilamino-diazahrizeni učine manje lipofilnim, odnosno da se učine rastvorljivijim u vodi (čime bi mogla biti poboljšana njihova aktivnost i olakšana primena), kao i da se uspori njihova metabolička degradacija.¹⁴⁴ Da bismo postigli željene efekte, odlučili smo da sintetišemo diazahrizene koji u položajima 3 i 9 imaju vodonikove atome umesto metil-grupa.

Sinteza ovako izmenjenog diazahrizenskog jezgra zahtevala je drugačiji pristup u odnosu na onaj koji je primenjivan za sintezu diazahrizenskog prstena kod derivata NSC-306365 (FGI-106).¹¹¹

Polazna jedinjenja bila su komercijalno dostupni 1,5-diaminonaftalen i dimetil-acetilendikarboksilat. Ova dva jedinjenja reaguju u odnosu 1:2 u suvom metanolu, prema postupku opisanom u literaturi pri čemu pada talog tetraestra **5** (shema 8).¹⁴⁵ Termičkom ciklizacijom jedinjenja **5** u ključalom difenil-etru dobijen je tetraciklični aromatični sistem - diazahrizen **6**, dok se pokušaj konvencionalne ciklizacije Eaton-ovim reagensom pokazao neuspešnim.¹⁴⁶ Nukleofilnom aromatičnom supstitucijom, dejstvom fosfor-oksihlorida, derivat **6** preveden je u dihlorid **7**, u kvantitativnom

prinosu i uz očuvanje estarske funkcionalne grupe. Metil-estar **7** preveden je baznom hidrolizom u odgovarajuću dinatrijumovu so, a potom dejstvom HCl u dikiselinu **8**. Obe reakcione smeše su suspenzije. Nije se pribeglo direktnoj kiseloj hidrolizi estarske funkcije, jer hidroliza metil-estra značajno smanjuje već ograničenu rastvorljivost ovih derivata u kiselinama, dodatno usporavajući reakciju. Prilikom refluktovanja u difenil- etru dikiselina podleže termičkoj dekarboksilaciji u vrlo dobrom prinosu, pri čemu nastaje dihloraren **9**. Pokušaji dekarboksilacije odgovarajuće dinatrijum i dikalijum soli bili su neuspešni, kao i pokušaj dekarboksilacije dimetil-estra.¹⁴⁷ Krapch-ova dekarboksilacija dimetil-estra, radi direktnog dobijanja jedinjenja **9**, nije bila uspešna ni pod jednim od isprobanih uslova,^{148,149} verovatno usled slabe rastvorljivosti polaznog jedinjenja.

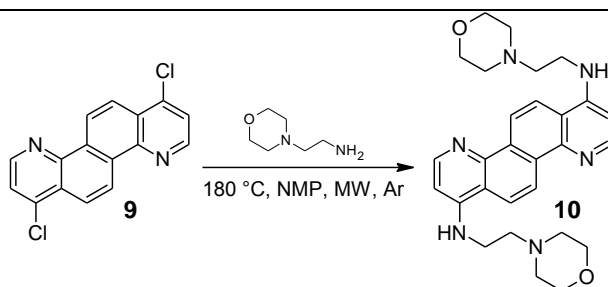


Shema 8. Prikaz sinteze 1,7-dihlor-4,10-diazahrizena.

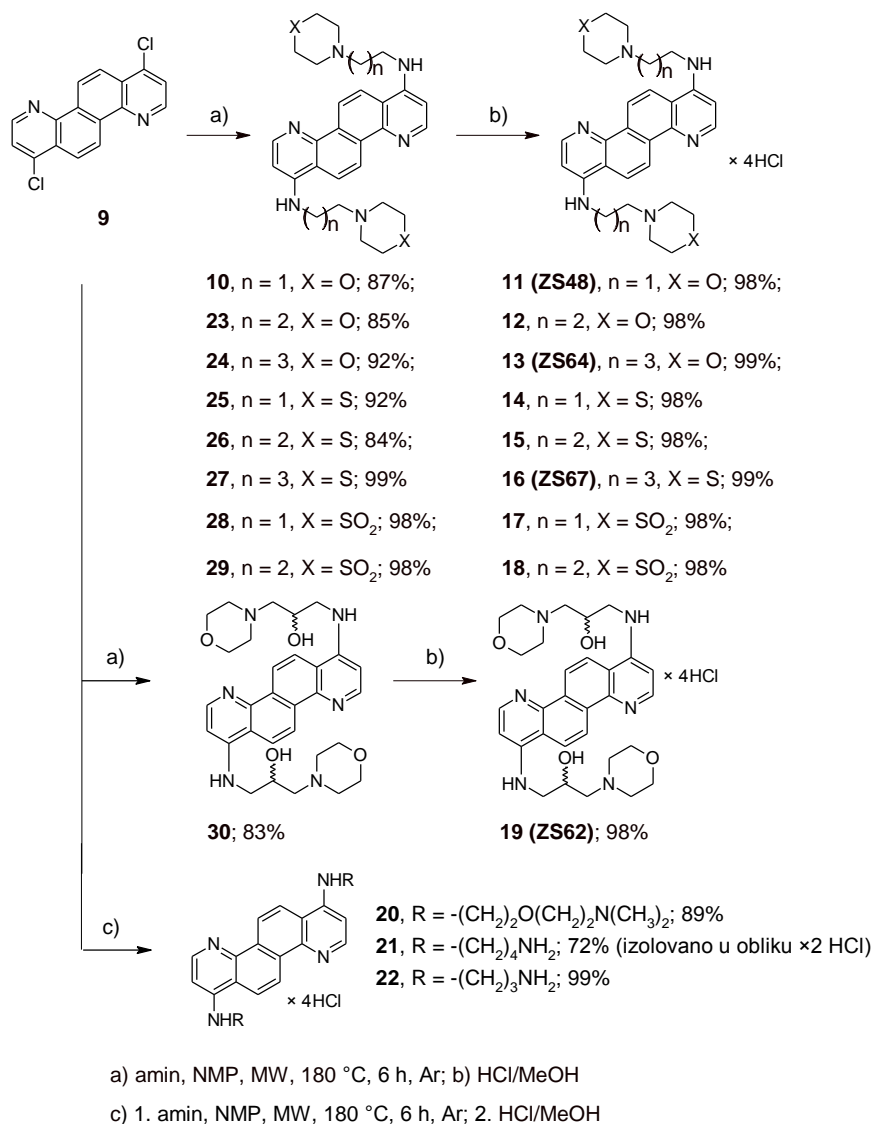
Dalja transformacija dihlordiazahrizena **9** obuhvatala je uvođenje alkilamino-segmenta nukleofilnom aromatičnom supstitucijom. Razvijeni su uslovi koji omogućavaju ovu reakciju pod mikrotalasnim uslovima, u NMP kao rastvaraču, pri čemu je značajno smanjena količina amina u odnosu na prethodno opisanu metodu u kojoj je amin služio i kao rastvarač (tabela 2).¹¹¹ Tri eksperimenta koja se opisana u tabeli odnose se na sintezu jedinjenja **10**.

Tabela 2. Optimizacija reakcionih uslova reakcije dihlordiazahrizena **9** i 2-(morfolin-4-il)etanamina.

Broj eksperimenta	Količina amina (mol. ekv.)	Rastvarač	Izvor zagrevanja	Trajanje reakcije (sat)	Prinos 10 (%)
1	30	sam amin	uljano kupatilo	60	81
2	6	NMP	uljano kupatilo	6	11
3	6	NMP	MW reaktor	6	87



Dakle, **9** i višak odgovarajućeg amina rastvoreni su u NMP u mikrotalasnoj kivetici, u atmosferi argona. Reakciona smeša podvrgnuta je mikrotalasnom zračenju u uređaju *Biotage Initiator 2.5* 6 h na 180 °C (shema 9), a željeni proizvodi dobijeni su u odličnom prinosu. Odgovarajuće tetrahidrohloridne soli dobijene su rastvaranjem jedinjenja u 40% HCl u suvom MeOH. Na ovaj način sintetisani su **11-22**.

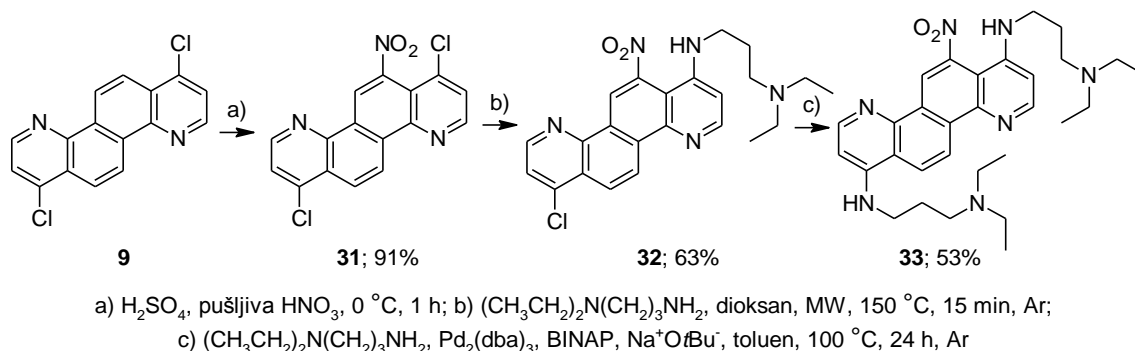


Shema 9. Prikaz sinteze derivata 1,7-dialkilamino-4,10-diazahrizena.

Amini korišćeni za sintezu konačnih derivata bili su ili komercijalno dostupni, ili su sintetisani iz odgovarajućih dibromalkana (videti eksperimentalni deo), koristeći ftalimid i jednostavnije amine, na način opisan u eksperimentalnom delu.

Delimična izmena dihlordiazahrizena **9** izvršena je nitrovanjem pušljivom azotnom kiselinom. Ovako dobijeno jedinjenje **31** može podleći selektivnoj supstituciji jednog atoma hlora – onog bližeg nitro-grupi. Ova transformacija odvija se brzo, potpomognuta dejstvom mikrotalasa, u dioksanu kao rastvaraču. Svi pokušaji supstitucije preostalog atoma hlora pod mikrotalasnim uslovima bili su neuspešni.

Supstitucija je izvedena tek Buchwald-Hartwig-ovom reakcijom aminovanja, u suvom, deaerisanom toluenu kao rastvaraču (shema 10).

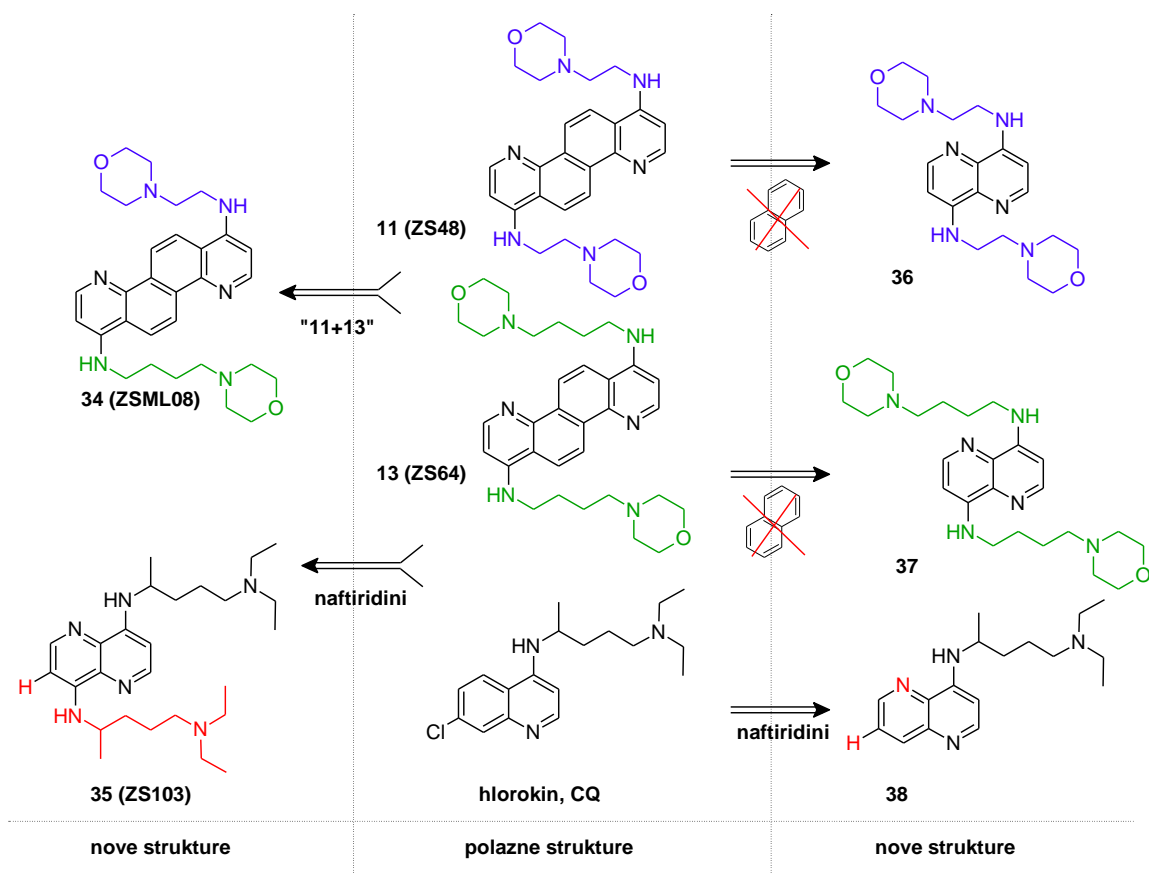


Shema 10. Prikaz sinteze derivata **32** i **33**.

3.1.2. Sinteza naftiridina i diazahrizenskih derivata supstituisanih dvema različitim alkilamino-grupama – druga grupa jedinjenja

Ostvarena je sinteza diazahrizenskih derivata supstituisanih dvema različitim alkilamino-grupama, kao svojevrsnih hibrida prvobitno sintetisanih diazahrizena (poput jedinjenja **34** (**ZSML08**), shema 11).

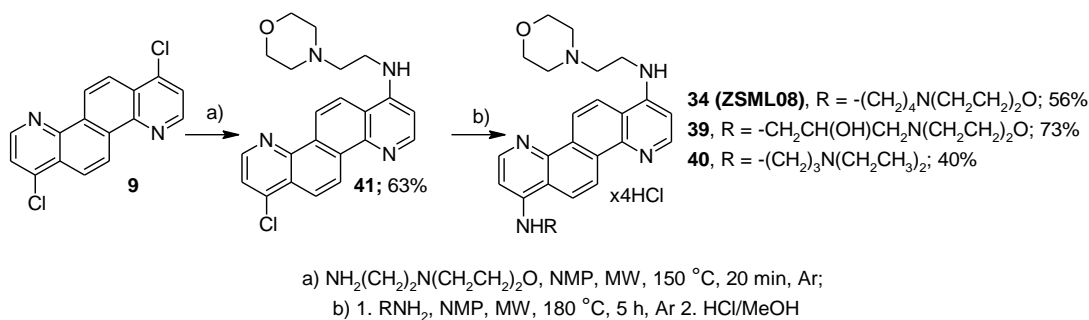
Nešto kasnije je izvršena sinteza derivata naftiridina. Naime, statistika odobrenih terapeutika ukazuje da veći broj aromatičnih prstenova u nekom jedinjenju može biti nepoželjna odlika za napredovanje molekula u status leka. Zbog toga su zamišljeni “umanjeni” diazahrizeni – bez dva centralna aromatična prstena.¹⁵⁰ Šta više, zamišljena jedinjenja ovog tipa – naftiridini – imaju strukturne sličnosti sa jedinjenjima koja imaju antifilovirusnu aktivnost, kao što je hlorokin (**35-38**; shema 11).^{133,134} U naftiridinima bio bi očuvan 4-aminopiridinski motiv, prisutan kod 4,10-diazahrizena, i kod hlorokina.



Shema 11. Prikaz zamišljenih modifikacija prvobitnih diazahrizenskih derivata.

3.1.2.1. Sinteza diazahrizenskih derivata supstuisanih dvema različitim alkilamino-grupama

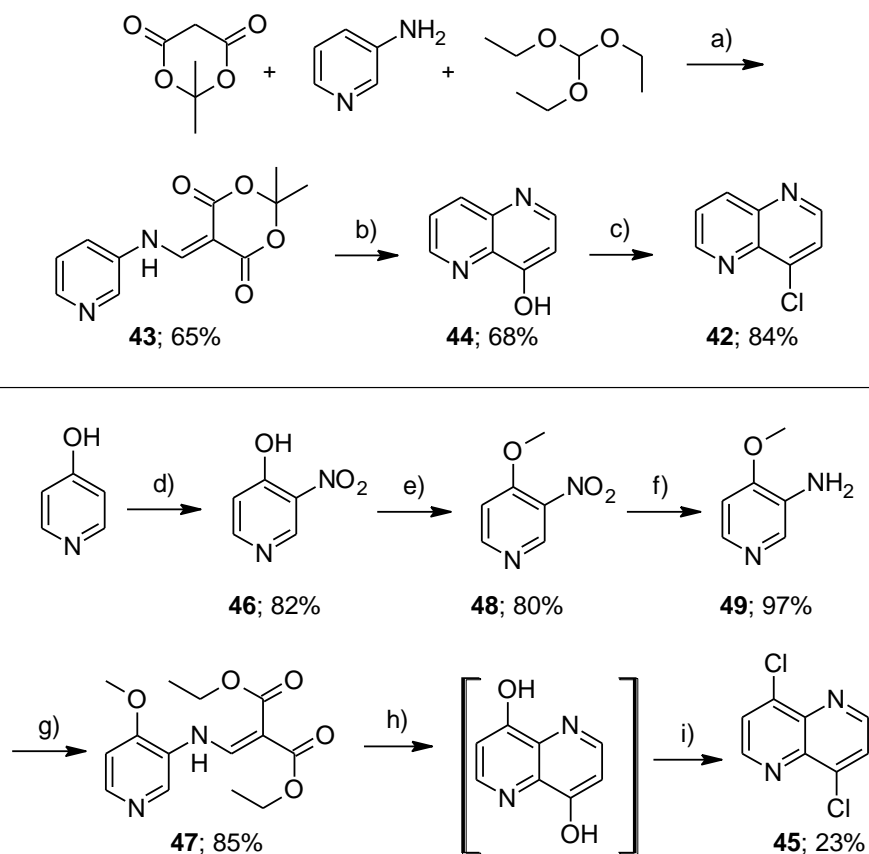
Razvijen je postupak za sintezu diazahrizenskih derivata supstuisanih dvema različitim alkilamino-grupama (**34**, **39** i **40**; shema 12). Da bi ova jedinjenja bila sintetisana, bilo je potrebno supstuisati samo jedan od dva atoma hlora u jedinjenju **9**. Ovo je moguće kada se reakcija izvodi u mikrotalasnom reaktoru na 150 °C tokom 20 minuta, u NMP, pri čemu nastaje jedinjenje **41**. Uslovi za ovu transformaciju pronađeni su posle većeg broja eksperimenata u kojima je varirana temperatura, vreme trajanja reakcije i rastvarač. Preostali hlor može se potom supstuisati drugim aminom na uobičajen način, primenjen kod prve grupe jedinjenja.



Shema 12. Pregled sinteze diazahrizenskih derivata supstituisanih dvema različitim alkilamino-grupama.

3.1.2.2. Sinteza naftiridinskih derivata

Ključni intermedijer **42** (shema 13) dobijen je na način analogan prethodno objavljenim procedurama.^{151,152} Jedinjenje **43**, koje je proizvod trokomponentne kondenzacije podleže ciklizaciji u ključalom difenil-etru, a dobijeni alkohol **44** je prečišćen sublimacijom. Brown-ova procedura za sintezu **45** je unekoliko izmenjena.¹⁵³ Nitrovanjem 4-piridona dobijen je **46**, koji je potom metilovan metil-jodidom u acetonu.¹⁵⁴ Redukcijom nitro-grupe dobijena je amino-grupa, koja potom podleže kondenzaciji sa dietil-etoksimetilenmalonom, pri čemu nastaje **47** u dobrom prinosu.¹⁵⁵ Zatvaranje drugog piridinskog prstena i dekarboksilacija izvršeni su produženim refluktovanjem u koncentrovanoj bromovodoničnoj kiselini. Na ovaj način izbegnuta je primena publikovanih procedura koje uključuju refluktovanje u hinolinu i termičku dekarboksilaciju pod sniženim pritiskom, čime je sinteza ubrzana i olakšana.¹⁵³ Na kraju, oba ključna intermedijera (**42** i **45**) dobijeni su reakcijom hidroksi-intermedijera sa POCl_3 .

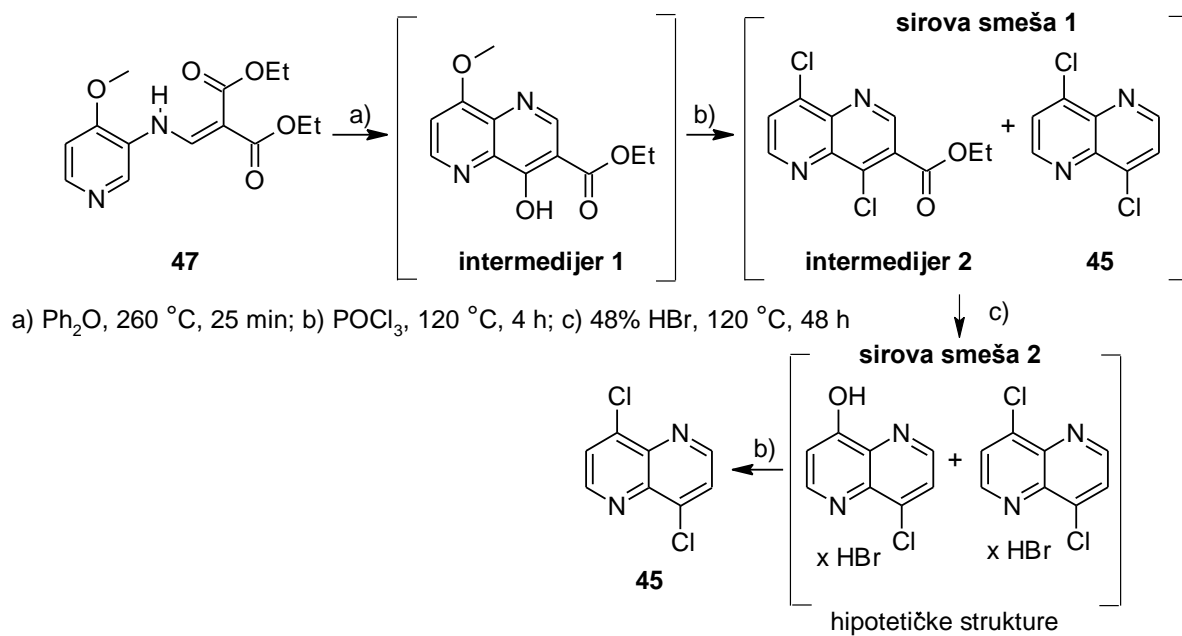


- a) EtOH, refluks; b) Ph₂O, 260 °C, 50 min; c) POCl₃, 115 °C, 15 min;
 d) KNO₃, H₂SO₄, 100 °C, 60 min; e) MeI, aceton, 40 °C; f) H₂, Pd/C, 5 bar, MeOH;
 g) dietil-etoksimetilenmalonat, EtOH, 80 °C; h) 1. Ph₂O, 260 °C, 50 min;
 2. POCl₃, 120 °C, 4 h, 3. 48% HBr, 120 °C, 48 h; i) POCl₃, 120 °C, 4 h

Shema 13. Sinteza monohlor- (**42**) i dihlora-naftiridina (**45**).

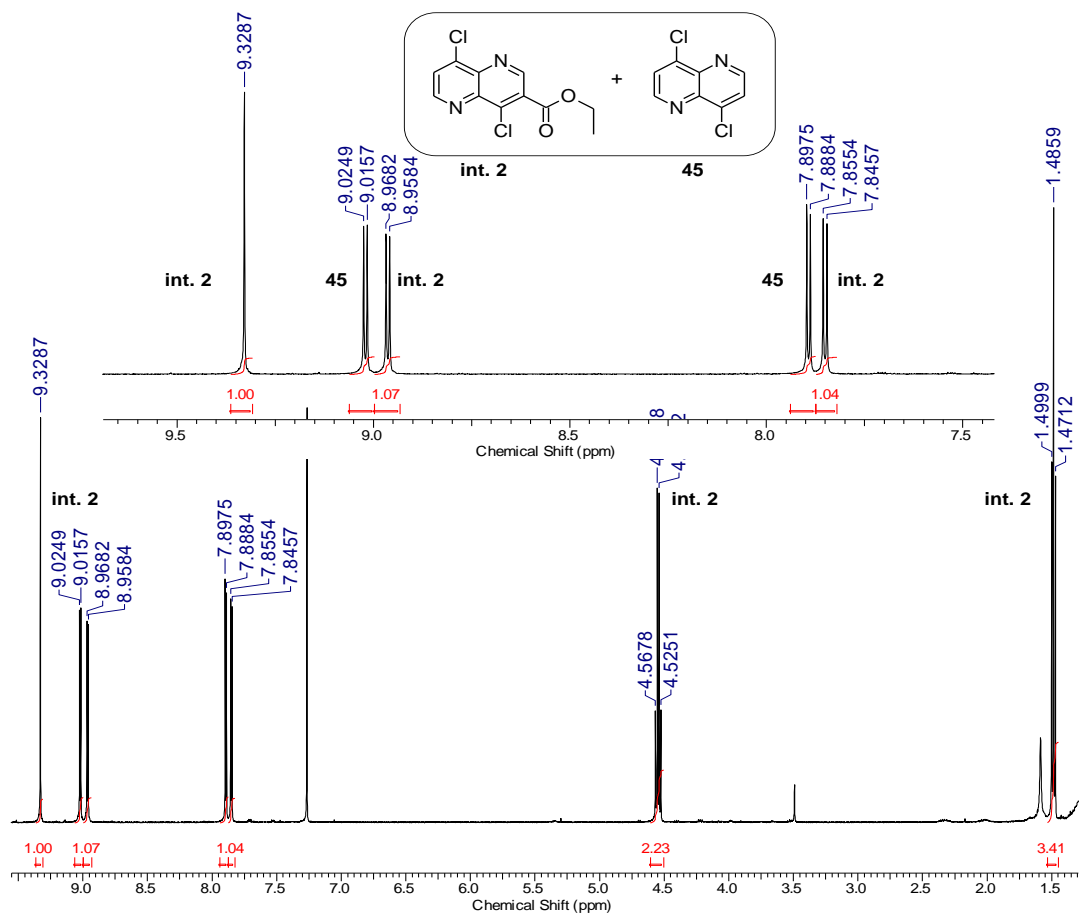
O strukturi intermedijera koji se javljaju u reakcionom putu od jedinjenja **47** do **45** može se nešto zaključiti posredno, analizirajući i poredeći ¹H NMR spektre “sirove smeše 1” i krajnjeg proizvoda (shema 14). Očito da posle ciklizacije u difenil-etru, refluktovanjem u fosfor-oksihloridu dolazi do delimične dekarboksilacije, pri čemu nastaje smeša **intermedijera 2** i **45** u odnosu 1:2 (videti ¹H NMR spektar smeše). Produženo refluktovanje u POCl₃ ne menja prinos niti menja odnos komponenata **sirove smeše 1**. Tretiranjem **sirove smeše 1** koncentrovanom bromovodoničnom kiselinom nastaje **sirova smeša 2**, iz čijeg je NMR spektra evidentno da dozi do potpune dekarboksilacije, i delimične supstitucije atoma hlora (NMR spektar je lošeg kvaliteta), pa je neophodna ponovna reakcija sa POCl₃. Na ovaj način razvijena je

metoda kojom se, u poređenju sa Brown-ovom procedurom, željeni 4,8-dihlor-1,5-naftiridin lakše sintetiše i dobija u neznatno većem prinosu, u istom broju reakcionih koraka.

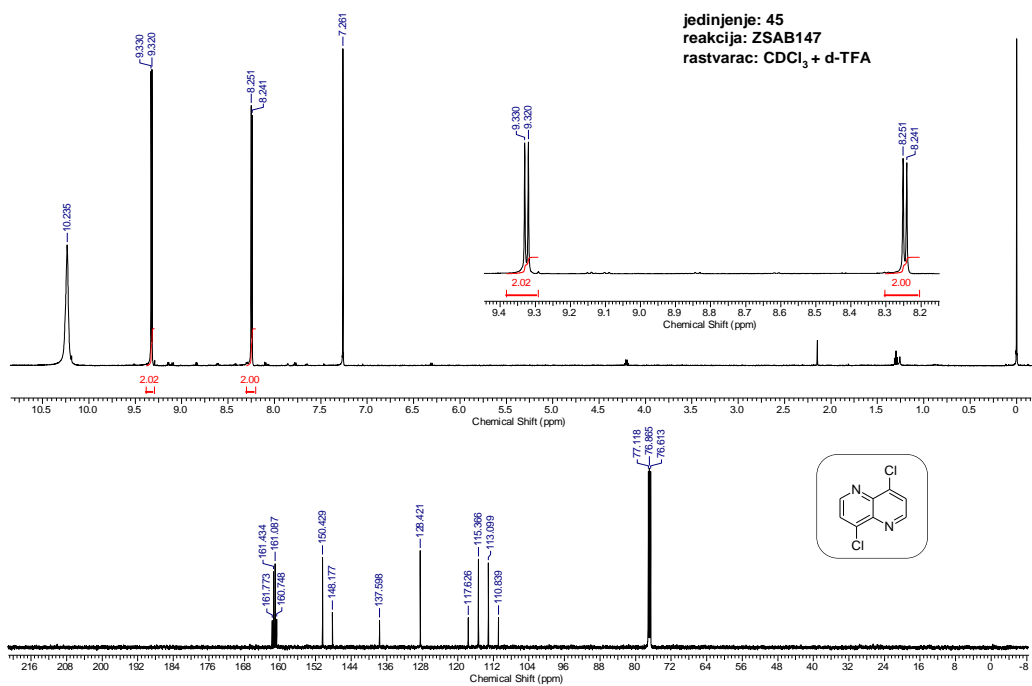


Shema 14. Intermedijeri u sintezi **45**.

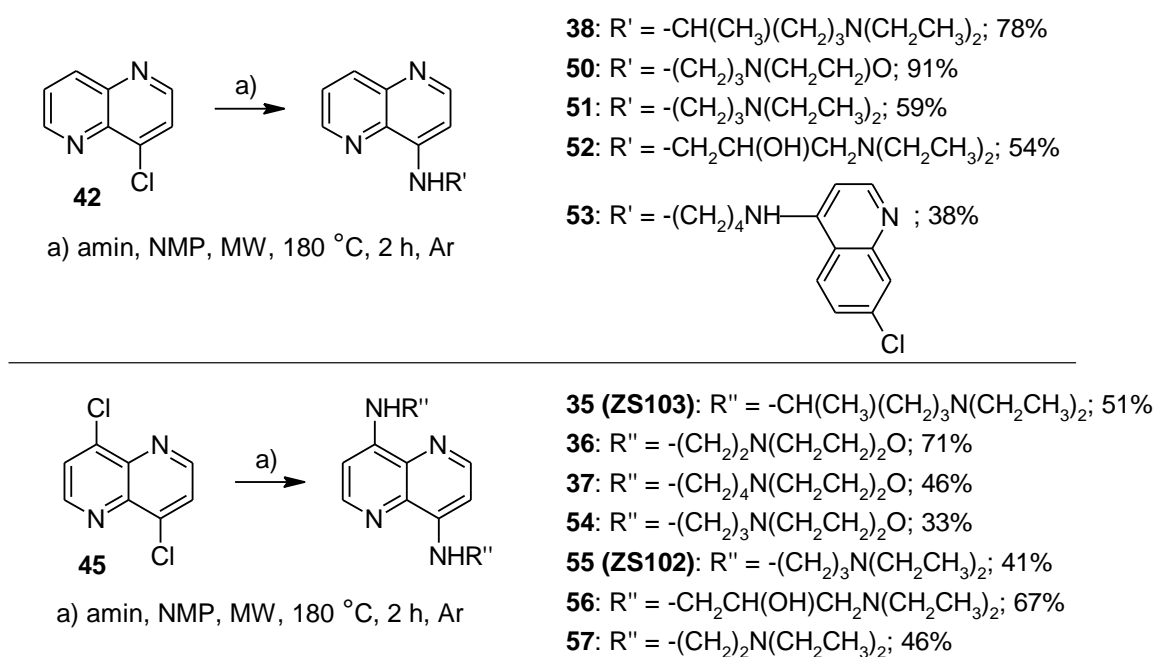
¹H NMR (500 MHz) spektar **sirove smeše 1**:



¹H NMR (500 MHz) spektr 45:



Nukleofilnom supstitucijom pod dejstvom mikrotalasa, polazeći od hlornaftiridina **42** ili dihlornaftiridina **45** dobijeno je 12 alkilamino-supstituissanih naftiridina (**35-38** i **50-57**; shema 15). Reakcija se odvija na 180 °C u inertnoj atmosferi argona. Ovo je ujedno i prva sinteza 4,8-dialkilamino-1,5-naftiridina opisana u dostupnoj hemijskoj literaturi.



Shema 15. Sinteza alkilamino-supstituissanih naftiridina.

3.2. Biološki testovi

Ovde će biti predstavljeni rezultati eksperimenata kojima je određivana *in vitro* i *in vivo* biološka aktivnost, kao i različitih eksperimenata za određivanje toksičnosti. Takođe, biće predstavljeni ogledi kojima ispitivan mehanizam dejstva naših inhibitora virusa ebole.

3.2.1. Biološka aktivnost i toksičnost prve grupe jedinjenja

Inicijalni test za određivanje biološka aktivnosti izveden je u ćeliji-domaćinu (*cell-based assay*), a rezultati će ovde biti predstavljeni kao *in vitro* aktivnost. Jedinjenja iz prve grupe jedinjenja (**11-19**, **32** i **33**) testirana su pri koncentraciji od 20 ili 10 µM,

posle čega su samo ona koja su okarakterisana kao aktivna testirana na nižim koncentracijama.^f Ukratko, HeLa ćelije-domaćini, prethodno inkubirane sa rastvorom jedinjenja date koncentracije, inficirane su virusom ebole (EBOV, ranije ZEBOV; multiplicitet infekcije 0,5), pa su posle 48 sati podvrgnute imunofluorescentnoj analizi (IFA) i *High Content Imaging* (HCI) eseju. Tom prilikom, određene su EC₅₀ i/ili EC₉₀ vrednosti, kao i citotoksičnost - CC₅₀.^{156,157} Diazahrizeni su testirani kao hidrohloridne soli (izuzev jedinjenja **32** i **33**), dok su naftiridini testirani u obliku slobodne baze, dakle kao nenaelektrisana jedinjenja (1,0% DMSO/voda).

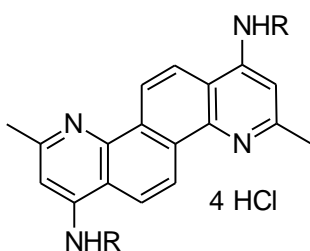
Tabela 3. Inhibitorna aktivnost i citotoksičnost jedinjenja u esejima sa HeLa ćelijama.

Jedinjenje	% inhibicije EBOV, (% citotoksičnosti), 20 μM	EBOV EC ₅₀ ^a , μM	CC ₅₀ ^b , μM
11 (ZS48)	100 (0)	0,70±0,13	> 20
12	100 (95)	2,5-5	
13 (ZS64)	100 (2) na 10 μM	0,34 ± 0,01	SI ~ 10
14	50 (0)	20	
15	100 (99)	0,625-1,25	
16	100 (0) na 5 μM	0,36 ± 0,06	SI ~ 10
17	neaktivno na 10 μM	> 10 μM	
18	neaktivno na 10 μM	> 10 μM	
19 (ZS62)	88 (0)	1,25-2,5	> 20
32	100	2,5	10
33	100 (100)	0,7	0,4
58	53		
59	96	2,5-5	

Eksperimenti su izvršeni u četiri replikata (n = 4). ^aEC₅₀ predstavlja koncentraciju jedinjenja pri kojoj ono dvostruko umanjuje broj ćelija inficiranih virusom ebole, u poređenju sa kontrolom (videti eksperimentalni deo); ^bCC₅₀ predstavlja koncentraciju

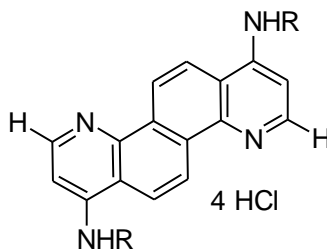
^f Jedinjenja iz druge grupe, kao novija, odmah su testirana na više koncentracija, pri čemu je određena njihova EC₅₀ vrednost.

pri kojoj jedinjenje uzrokuje dvostruko umanjeње vijabilnosti ćelija (videti eksperimentalni deo).



58: R = CH₂CH₂N(CH₂CH₂)O
53% inh. na 20 μM

59: R = CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂)₂O
96% inh. na 20 μM
IC₅₀ = 2,5-5 μM



11 (ZS48): R = CH₂CH₂N(CH₂CH₂)₂O
100% inh. na 20 μM
EC₅₀ = 0,70 μM

12: R = CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂)₂O
100% inh. na 20 μM
EC₅₀ = 2,5-5 μM

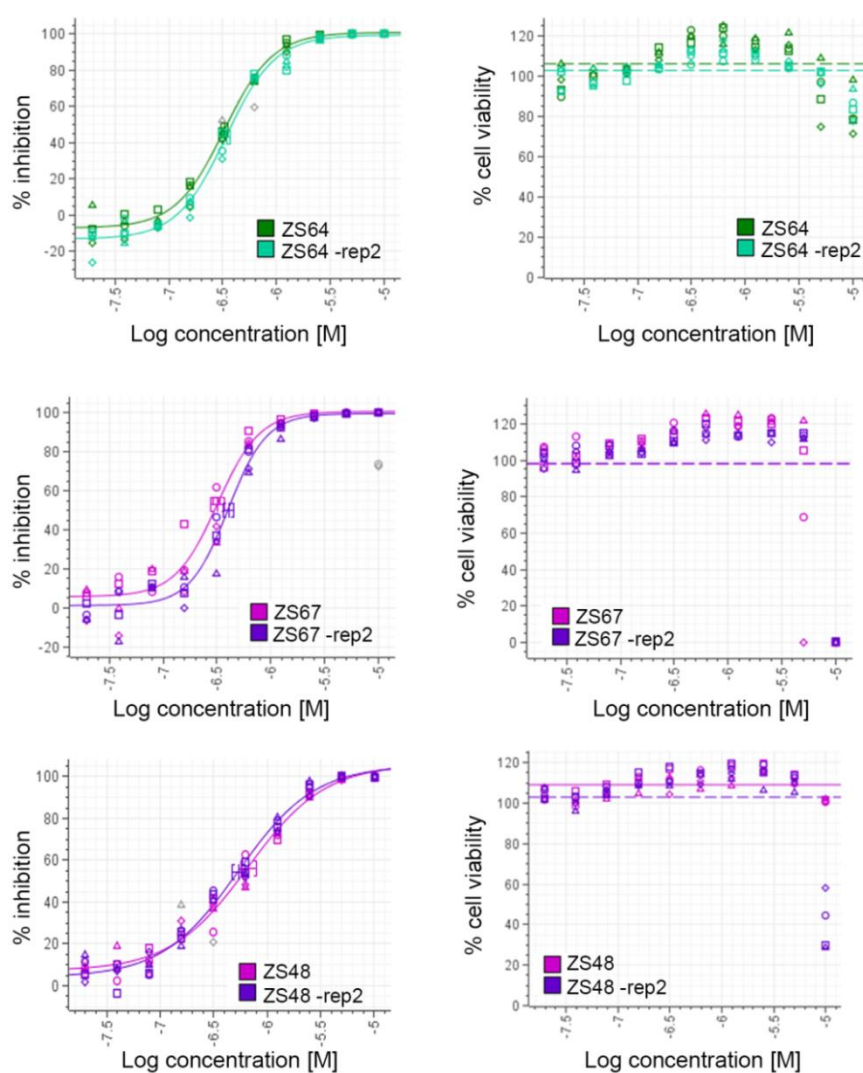
Shema 16. Poređenje aktivnosti jedinjenja sa metil-grupana **58** i **59**¹¹¹ sa njihovim desmetil-analozima **11 (ZS48)** i **12**.

Testiranjem grupe prvobitnih 11 diazahrizenskih derivata (tabela 3) utvrđeno je da je zamena metil-grupa vodonikom zaista rezultovala poboljšanom *in vitro* aktivnošću, kao što možemo videti poredeći jedinjenja sa metil-grupama **58** i **59**¹¹¹ sa njihovim desmetil-analozima **11 (ZS48)** i **12** (shema 16).

Ukupno 11 jedinjenja testirano je u prvom eseju, a od toga je devet vršilo inhibiciju virusa u opsegu 50-100% pri koncentraciji od 20 μM. Jedinjenja **17** i **18** sa sulfonskom funkcionalnom grupom pokazala su se neaktivnim. Nitro-jedinjenja **32** i **33** pokazala su umerenu do izraženu aktivnost, ali i toksičnost. Stoga, dalji ogledi sa derivatima koji poseduju sulfonsku- i nitro-grupu nisu rađeni.

Preostalih šest derivata pokazalo je zapaženu aktivnost. Derivati **12** i **15**, oba sa C3 metilenskim mostovima u bočnim nizovima, osim izražene aktivnosti na 20 μM (100%) pokazali su i gotovo jednaku toksičnost (≥ 95%) prema HeLa ćelijama. Stoga je od 11 jedinjenja preostalo četiri sa dobrom aktivnošću i niskom ili odsutnom toksičnošću – **11 (ZS48)**, **13 (ZS64)**, **16 (ZS67)** i **19 (ZS62)**.

Ova četiri derivata potom su podvrgnuta testiranju aktivnosti u zavisnosti od koncentracije. Aktivnost (i citotoksičnost) jedinjenja ispitana je na deset različitih koncentracija, (serija rastvora dobijena dvostrukim razblaživanjem koncentrovanijeg rastvora). Svako jedinjenje testirano je u četiri replikata (n = 4, što važi i za rezultate date u tabeli 4), a ogled je izvršen dva puta, u dva odvojena dana (shema 17). Najveću aktivnost ispoljio je jedinjenje **13 (ZS64)**, derivat koji poseduje C4 metilenski most u bočnom nizu - $EC_{50} = 0,34 \mu\text{M}$. Tio-analog jedinjenja **13 (ZS64)** – jedinjenje **16 (ZS67)**, takođe je pokazalo visoku aktivnost, $EC_{50} = 0,36 \mu\text{M}$ (tabela 3).



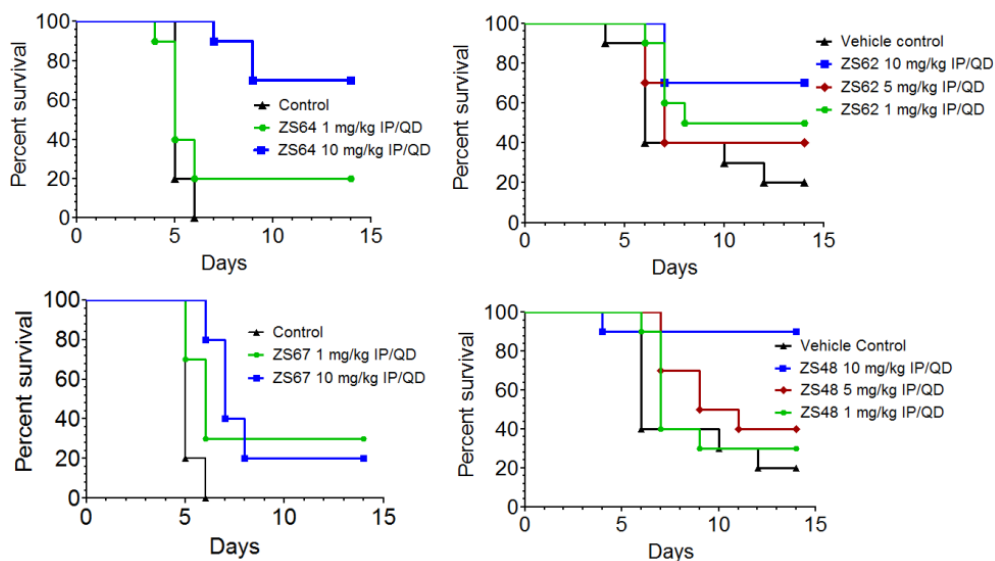
Shema 17. Grafički prikaz inhibicije virusa ebole (u procentima) u funkciji logaritma koncentracije; grafički prikaz citotoksičnosti. Prikazani su rezultati za jedinjenja, i **11 (ZS48)**, **13 (ZS64)** i **16 (ZS67)**. HeLa ćelije su tretirane jedinjenjima 2 h pre dodatka virusa ebole. Inkubacija sa virusom trajala je 48 h. Podaci su analizirani pomoću

Genedata softvera. Levi paneli pokazuju procenat inhibicije EBOV, dok desni pokazuju procenat promene vijabilnosti ćelija – odnosno citotoksičnost.

3.2.1.1. In vivo aktivnost

Četiri najaktivnija i najmanje toksična derivata - **11 (ZS48)**, **13 (ZS64)**, **16 (ZS67)** i **19 (ZS62)** podvrgnuta su ispitivanju *in vivo* aktivnosti u studiji na miševima (shema 18). Svi ogledi na miševima, u ovom i narednim poglavljima, sprovedeni su u skladu sa protokolima odobrenim od IACUC-a i u saglasnosti sa Aktom o dobrobiti životinja, PHS smernicama i drugim saveznim regulativama o eksperimentima na životinjama u Sjedinjenim Državama. Ustanove u kojima su ogledi izvedeni akreditovane su od strane Međunarodne asocijacije za procenu i akreditaciju brige o životinjama u laboratorijama i rade u skladu sa principima navedenim u Smernicama za staranje i upotrebu laboratorijskih životinja, *National Research Council* Sjedinjenih Država, 2011.

Korišćen je virus ebole (EBOV, ranije ZEBOV) adaptiran za eksperimente na miševima. Grupe od po deset Balb/C miševa inficirane su virusom ebole, intraperitonealnim putem u dozi 1000 jedinica formiranja plaka (1000 PFU – *plaque forming units*). Miševi su tretirani jednom dozom dnevno (QD), počevši od nultog dana (dana kada je izvršena infekcija, dva sata pre infekcije), zaključno sa šestim danom (ukupno sedam dana). Jedinjenja, koja su takođe primenjivana intraperitonealno, davana su u dozama 10, 5 i 1 mg/kg (**11 (ZS48)** i **19 (ZS62)**), odnosno 10 i 1 mg/kg (**13 (ZS64)** i **16 (ZS67)**), u formi puferisanog (fosfatni pufer) vodenog rastvora. Za svaki ogled postojala je kontrolna grupa miševa, koja je primala samo vodeni rastvor pufera, bez jedinjenja.



Shema 18. Rezultati *in vivo* testa sa diazahrizenskim derivatima **11 (ZS48)**, **13 (ZS64)**, **16 (ZS67)** i **19 (ZS62)**. Miševi (n = 10 miševa po grupi) su tretirani vodenim rastvorima jedinjenja, naznačenih koncentracija, intraperitonealnim putem. Dva sata posle prve doze miševi su inficirani pomoću 1000 PFU virusa ebole adaptiranog za upotrebu na miševima. Tretman je nastavljen u narednih šest dana. Sve *p*-vrednosti prilagođene su Dunnettovom metodom kako bi obuhvatile višestruka poređenja. **13 (ZS64)**: $p < 0,0001$ (10 mg/kg); **16 (ZS67)**: $p = 0,0017$ (10 mg/kg); **19 (ZS62)**: $p = 0,0247$ (10 mg/kg); **11 (ZS48)**: $p = 0,0029$ (10 mg/kg).

Iako su dva najaktivnija jedinjenja u *in vitro* esejima zasnovanom na ćelijama posedovala C4 metilenske mostove u bočnim nizovima, pokazalo se da njihove *in vivo* aktivnosti nisu slične. Tiomorfolinski derivat **16 (ZS67)** iskazao je slabu sposobnost da zaštiti miševima, kao i nepravilnu zavisnost aktivnosti od primenjene doze. Nasuprot njemu, jedinjenje **13 (ZS64)** pokazalo je jako dobru i pravilnu aktivnost, pri čemu je sedam od deset miševa zaštićeno pri dozi 10 mg/kg, a 2/10 dozom 1 mg/kg. Raznovrsnije mogućnosti metaboličkih transformacija jedinjenja sa dva atoma sumpora (**16 (ZS67)**) i činjenica da jedinjenja sa sulfonskim grupama ne poseduju aktivnost (**17, 18**) možda mogu objasniti ovu razliku u aktivnostima. U kontrolnom uzorku za **13 (ZS64)** i **16 (ZS67)** svi miševi su podlegli bolesti.

Primena jedinjenja sa etilenskim mostom u bočnim nizovima (**11 (ZS48)**) dovela je do preživljavanja 9/10 zaraženih miševa pri dozi 10 mg/kg, dok je pri manjim dozama stepen preživljavanja bio niži, sledeći pravilnu zavisnost od doze. Jedinjenje sa hidroksilnom grupom na središnjem C-atomu C3 mosta (**19 (ZS62)**) pokazalo je nešto

slabiju aktivnost, pri čemu je uz najvišu primenjenu dozu 10 mg/kg preživelo 7/10 miševa. U kontrolnom uzorku za **11 (ZS48)** i **19 (ZS62)** preživelo je 2/10 miševa.

3.2.2. Biološka aktivnost, toksičnost i ostala svojstva druge grupe jedinjenja

Druga grupa jedinjenja (**20-22**, **34-39** i **50-57**) testirana je pri polaznoj koncentraciji od 10 μM (tabela 4), a za određivanje biološke aktivnosti jedinjenja na nižim koncentracijama korišćeni su rastvori dobijeni konsektivnim dvostrukim razblaživanjem koncentrovanijih rastvora, polazeći od 10 μM . Na ovaj način jedinjenja su testirana na ukupno deset različitih koncentracija, u četiri replikata ($n = 4$).

Testirani su analozi prethodno sintetisanih diazahrizenskih derivata – **20**, **21** i **22**. Ova jedinjenja poseduju primarne amino-grupe na krajevima metilenskih bočnih nizova (**21** sa C4 metilenskim mostom i **22** sa C3 metilenskim mostom) ili etarsku grupu u središtu mosta u bočnim nizovima (**20**).

Takođe, testirani su i diazahrizenski derivati supstituisani dvema različitim aminoaklil-grupama (**34 (ZSML08)**, **39** i **40**). Oni predstavljaju svojevrjne hibride najaktivnijih derivata, **11 (ZS48)**, **13 (ZS64)** i **19 (ZS62)**.

Naposletku, ovom prilikom testirana su i sva jedinjenja naftiridinskog tipa. Jedinjenje **53** unekoliko odstupa od pravilnosti u ovoj grupi derivata, jer poseduje i dodatni 7-hlorhinolinski prsten, slično hlorokinu o čijoj aktivnosti je u opštem delu bilo reči.

Tabela 4. Inhibitorna aktivnost i citotoksičnost jedinjenja u esejima u HeLa ćelijama (i HFF ćelijama za derivate **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)**).

Jedinjenje	EBOV EC ₅₀ (μM)	EBOV EC ₉₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	SI ^a
11 (ZS48)	0,70	< 5	> 20	> 28,5
	0,55 ^b	1,36 ^a	> 20 ^a	> 36,5 ^a
20	3,53	6,74	7	2,0
21	~ 10	23,5	> 10	> 1
22	~ 10	20,5	> 10	> 1

34 (ZSML08)	0,26	0,85	8	30
	0,21 ^a	0,78 ^a	2,4 ^a	11,2 ^a
35 (ZS103)	0,78	4,73	> 10	> 13
36	neaktivno	-	> 25	-
37	2,24	9,9	> 25	> 11,2
38	~ 10	-	-	-
39	0,60	3,50	> 10	> 16,7
40	0,79	4,85	> 10	> 12,6
50	neaktivno	-	-	-
51	~ 10	-	-	-
52	neaktivno	-	-	-
53	2,87	13	> 25	> 8,7
54	~ 10	-	-	-
55 (ZS102)	4,82	37,4	> 10	> 2
56	neaktivno	-	-	-
57	14,1	62,6	> 25	> 1,8

^aIndeks selektivnosti (SI) = CC_{50}/EC_{50} ; eksperimenti su vršeni u četiri replikata (n = 4);
^bHFF ćelije.

Diazahrizenski derivati **20**, **21** i **22** nisu pokazali unapređenu aktivnost u odnosu na prethodne derivate (tabela 4).

Nekoliko bis-aminoalkil-naftiridinskih derivata (**35 (ZS103)**, **37** i **55 (ZS102)**) pokazalo se aktivnim. Jedinjenje **37** sa C4 metilenskim mostom (shema 14) i morfolinskim supstuentima iskazalo je veoma dobru aktivnost sa $EC_{50} = 2,24 \mu\text{M}$. Druga dva aktivna jedinjenja, **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)**, takođe imaju zapažene EC_{50} vrednosti, $4,82 \mu\text{M}$, odnosno $0,78 \mu\text{M}$. Izuzetno niska $EC_{90} = 4,73 \mu\text{M}$ nagoveštava eventualnu visoku potentnost ovog naftiridina.

Monosupstituisani naftiridinski derivati **38**, **50**, **51** i **52** su neaktivni, ili su slabo aktivni ($EC_{50} \geq 10 \mu\text{M}$). Jedini izuzetak je **53**, naftiridin koji poseduje 7-hlorhinolinski motiv. Ovo jedinjenje pokazalo je dobru aktivnost, sa $EC_{50} = 2,87 \mu\text{M}$. Međutim, kako ova klasa jedinjenja (monosupstituisani alkilamino-naftiridini) ne pokazuje obećavajuće rezultate, njihova dalja ispitivanja su obustavljena.

Diazahrizenski derivati sa različitim alkilamino-supstuentima **34 (ZSML08)**, **39** i **40** ispoljili su značajno bolju aktivnost u odnosu na diazahrizenske inhibitore iz prve grupe, sa EC_{50} vrednostima u opsegu od 0,26 do 0,79 μM , zadržavši nizak stepen toksičnosti. Jedinjenje **34 (ZSML08)**, sa $EC_{50} = 0,26 \mu\text{M}$ i $EC_{90} = 0,85 \mu\text{M}$ jedno je od najaktivnijih poznatih inhibitora virusa ebole.^{109,142,158} Ovo jedinjenje, kao i jedinjenje **11 (ZS48)** iz prve diazahrizenske grupe jedinjenja, odabrani su za dodatno testiranje na HFF ćelijama. Ćelije ljudskih fibroblasta predstavljaju primarne ćelije, za razliku od "besmrtnih" HeLa ćelija. Oba jedinjenja pokazala su se aktivnim, a dobijeni rezultati su u skladu sa HeLa esejom.

3.2.2.1. Farmakokinetička analiza i fizičko-hemijska svojstva

Rezultati *in vitro* testiranja jedinjenja **34 (ZSML08)**, **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)** bili su obećavajući, i na ovim jedinjenjima obavljani su ADME testovi (određivanje apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije - *absorption, distribution, metabolism, and excretion*; tabela 5). Naime, oba naftiridinska derivata, **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)** kao i diazahrizenski derivat **34 (ZSML08)**, pokazali su dobru stabilnost u plazmi ($> 85\%$, odnosno nešto nižu, 60% za **34 (ZSML08)**; posle 1 h), adekvatnu rastvorljivost na pH 7,4 ($> 50 \mu\text{g/mL}$), visoku stabilnost u mišjim i ljudskim mikrozomima, kao i nisku do umerenu inhibiciju CYP enzima. Jedinjenje **34 (ZSML08)**, najpotentniji *in vitro* inhibitor, podvrgnut je MDCK esej, u kom je pokazao dobru permeabilnost.

Tabela 5. ADME parametri jedinjenja **34 (ZSML08)**, **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)**.¹⁵⁹

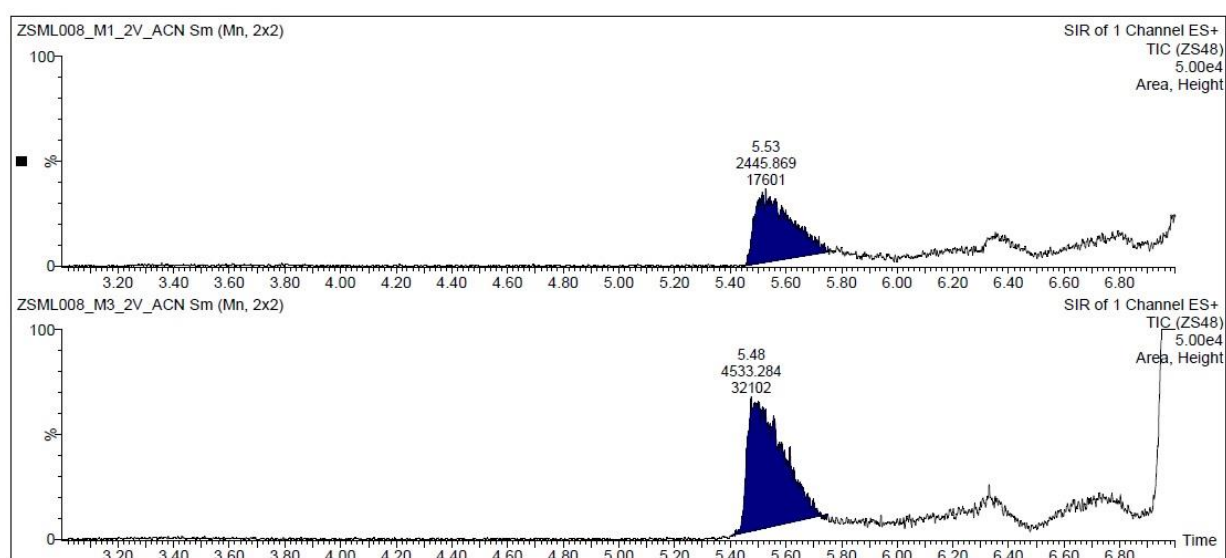
Testirani parametar	34 (ZSML08)	35 (ZS103)	55 (ZS102)
stabilnost u plazmi, 1 h, 37 °C (%) ^a	60	> 85	> 85
rastvorljivost, pH 7,4 (µg/mL) ^b	> 50	> 50	> 50
inhibicija CYP3A4 / BQ (µM) ^c	> 10	> 10	> 10
inhibicija CYP3A4 / DBF (µM) ^c	> 10	> 10	> 10
inhibicija CYP3A4 / BFC (µM) ^c	> 10	> 10	> 10
inhibicija CYP2D6 / AMMC (µM) ^c	> 10	8,0	> 10
inhibicija CYP2C19 / CEC (µM) ^c	> 10	3,6	> 10
klirens mišji/humani (µL/min/mg) ^d	22,3/32,9	32,9/< 23	< 23/< 23
mikrozomalno t _{1/2} mišje/humano (min) ^d	62,1/42,1	42/> 60	> 60/> 60
permeabilnost A→B (10 ⁻⁶ cm/s) ^e	39,3	-	-
permeabilnost B→A (10 ⁻⁶ cm/s) ^e	43,2	-	-

^aStabilnost u plazmi (udeo jedinjenja posle 1 h), posle inkubacije na 37 °C.

^bRastvorljivost jedinjenja, određena laserskom nefelometrijom, pri čemu je rasipanje svetlosti mereno u triplikatu. ^cIC₅₀ vrednost inhibicije CYP, određena na osnovu ukupnog fluorescentnog signala iz rastvora aktivnog citohroma P450, fluorescentnog supstrata i jedinjenja, inkubiranog na 37 °C. ^dKlirens u mišjem i humanom modelu; jedinjenja su inkubirana sa mikrozomima jetre u toku 1 h na 37 °C; u ovom testu t_{1/2} > 30 minuta smatra se dobrim rezultatom. ^ePrividna permeabilnost (P_{APP}) dobijena koristeći Madin Darby Canine Kidney (MDCK) ćelijsku liniju; A→B prolazak kroz membranu od apikalne do bazolateralne strane; B→A od bazolateralne do apikalne strane; tri biološka replikata.

Da bi se stekla saznanja o transportu diazahrizena, ispitane su interakcije jedinjenja **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** sa humanim serum albuminom (HSA) i alfa-1-kiselim glikoproteinom (AGP). Konstante vezivanja za proteine određene su praćenjem promena u fluorescentnim spektrima proteinima po dodatku različitih količina jedinjenja. Konstante vezivanja (K_{SV}) bile su (6,12 ± 0,20) × 10⁴ M⁻¹ za AGP i (8,85 ± 0,30) × 10⁴ M⁻¹ za HSA (**34 (ZSML08)**); i (8,12 ± 0,07) × 10⁴ M⁻¹ za AGP i (1,13 ± 0,04) × 10⁵ M⁻¹ za HSA (**11 (ZS48)**).^{160,161} Smatra se da su za lekove optimalne vrednosti konstanti vezivanja, pogodne za transport kroz krvotok, između 10⁴ M⁻¹ i 10⁶ M⁻¹, o čemu će kasnije biti reči.

Nadalje, tokom evaluacije *in vivo* toksičnosti najaktivnijeg jedinjenja **34 (ZSML08)** (videti dalje u tekstu) u eseju na zdravim miševima prikupljani su uzorci mišjeg seruma. Određivana je ukupna koncentracija jedinjenja u serumu, a tragano je i za mogućim metabolitima.¹⁶² Ukupna koncentracija jedinjenja **34 (ZSML08)** bila je u opsegu 0,35-1,20 μM 24 h posle primenjene poslednje doze 20 mg/kg (slika 10). Doza 20 mg/kg upotrebljena je tokom evaluacije toksičnosti, prilikom imitiranja uslova *in vivo* eseja antivirusne aktivnosti (20 mg/kg je dvostruko veća od najviše doze koja se primenjuje u *in vivo* eseju). Ono što se može zapaziti jeste da ovaj opseg koncentracija u plazmi detektovanog **34 (ZSML08)** obuhvata EC_{90} vrednost (0,85 μM) jedinjenja, i prevazilazi EC_{50} vrednost (0,26 μM HeLa; 0,21 μM HFF), a pri tome je niži od CC_{50} vrednosti u HeLa i HFF ćelijskim esejima (8 μM HeLa; 2,4 μM HFF), kao i od LC_{50} vrednosti 18,9 μM određene u eseju na zebricama (videti dalje u tekstu). Slično je i sa derivatom **11 (ZS48)**, koji se već pokazao efikasnim protiv virusa ebole u *in vivo* eseju na miševima. Ovo jedinjenje je u serumu detektovano u opsegu koncentracija od 0,46 do 1,03 μM , iako je eksperiment bio nešto drugačiji nego sa **11 (ZS48)**. Doza je bila 10 mg/kg, a uzorci su prikupljani petog i sedmog dana testiranja, od 5 minuta do 4 sata posle primenjene doze (ukupno 20 uzoraka). Zbog preglednosti, detalji ovih ispitivanja dati su u eksperimentalnom delu. Ni kod **34 (ZSML08)**, ni kod **11 (ZS48)** nisu pronađeni tragovi uobičajenih metabolita.¹⁶²



Slika 10. Hromatogrami kvantifikacije slobodnog **34 (ZSML08)** u mišjem serumu. Hromatogrami, dobijeni pomoću UHPLC/MS, predstavljaju uzorke iz dva miša,

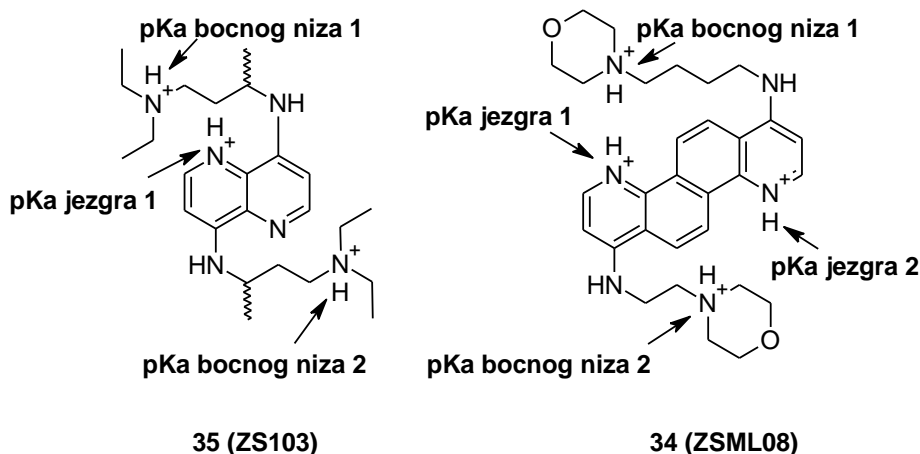
prikupljene 24 h posle poslednje doze 20 mg/kg/dan jedinjenja. Proizvodi redukcije (M+2), oksigenacije (M+16), dehidrogenizacije (M-2), bis-oksigenacije (M+32) niti kombinacije ovih procesa nisu detektovani.

Utvrđivanje kiselo-baznih karakteristika jedinjenja bitno je za određivanje mehanizma dejstva, kao i za različita druga eventualna razmatranja. U tu svrhu su potenciometrijskom titracijom, u četiri replikata, određene kiselinske konstante za ova četiri derivata (tabela 6, shema 19), kao i za hlorokin. U tabeli je dato i izračunato ukupno naelektrisanje jedinjenja na fiziološkom (krv) i lizozomskom (bitno za ispitivanje mehanizma dejstva) pH. Koristeći ACD/Labs softver izračunati su i antilogaritmi distribucionih koeficijenata (LogD) sva četiri jedinjenja na fiziološkom pH.¹⁶³

Tabela 6. Eksperimentalno određene kiselinske konstante odabranih jedinjenja; izračunati distribicioni koeficijenti.

Jedinjenje	pKa bočnog niza 1 ^a	pKa bočnog niza 2 ^a	pKa jezgra 1 ^b	pKa jezgra 2 ^b	Šarža na pH 7,35 ^c	Šarža na pH 5,00 ^c	clogD _{pH=7,3} ^d
11 (ZS48)	5,96	5,24	7,35	4,37	0,54	2,72	2,71
34 (ZSML08)	6,65	5,60	7,70	4,56	0,87	3,04	2,53
35 (ZS103)	10,81	8,41	5,72	/	1,94	2,84	1,36
55 (ZS102)	10,97	8,50	5,51	/	1,95	2,76	-0,18
CQ	9,18	/	7,45	/	1,54	1,99	1,53

^apKa vrednosti alkilamino-grupa na krajevima metilenskih bočnih nizova. ^bpKa vrednosti azotovih atoma aromatičnih jezgara. ^cUkupan stepen protonovanosti (naelektrisanje ili šarža) na fiziološkom pH = 7,35 i pH = 5,00 (lizozomi), izračunat na osnovu pKa vrednosti (uz aproksimiranje jonske sile rastvora na 0). ^dIzračunati logaritmi distribucionih koeficijenata na pH 7,3 (softver ACD/Labs Release 12,0).



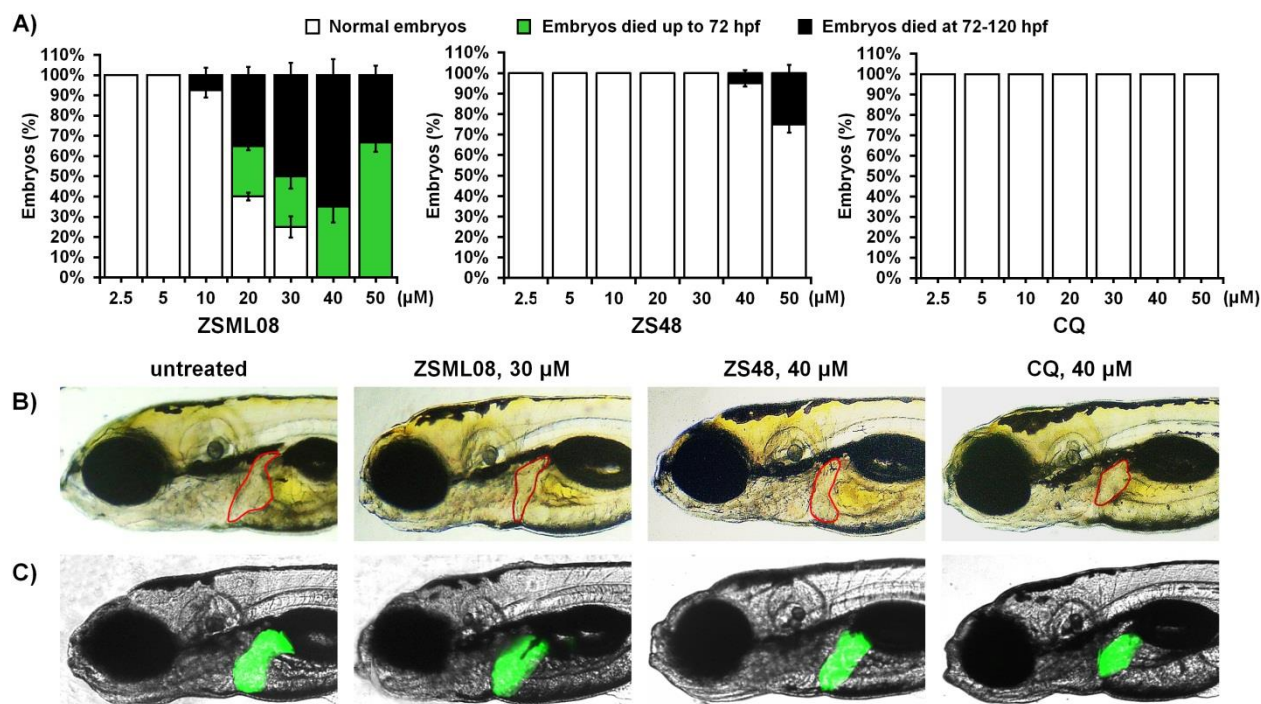
Shema 19. Lokacije protonovanja hrizenskih i naftiridinskih derivata

Pokazalo se da su naftiridinski derivati **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)**, što je bilo i očekivano, bazniji od diazahrizenskih derivata **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)**. Naftiridinska jedinjenja imaju dvostruko više naelektrisanje na fiziološkom pH. Ovo je u saglasnosti i sa njihovim izračunatim logD vrednostima, koje su veće kod diazahrizena. Naelektrisanje na fiziološkom pH zavređuje još par komentara. Diazahrizenski derivati **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** protonovani su manje od jednom ($< +1$) na fiziološkom pH, pri čemu je 79-93% naelektrisanja raspoređeno na azotovim atomima diazahrizenskog prstena, dok se ostatak naelektrisanja nalazi na azotovim atomima morfolinskih azota.^{164,165} Vrlo je verovatno da upravo ovo nisko naelektrisanje, ograničeno većinom na diazahrizensko jezgro, u okviru koga je delokalizovano rezonancijom, omogućava lakši transport diazahrizenskih derivata kroz membrane, u poređenju sa naftiridinskim derivatima **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)**. Naime, naelektrisanje naftiridinskih derivata je približno +2 i praktično je u potpunosti lokalizovano na baznim atomima azota na krajevima metilenskih bočnih nizova. Nasuprot ovome, na pH 5,0 (pH vrednost unutar lizozomskih vezikula), sva četiri jedinjenja približno su protonovana u istoj meri (oko tri puta). Što je stepen protonovanosti unutar vezikule veći, to će jedinjenja teže moći da napuste vezikulu.¹⁶⁶

3.2.2.2. Toksičnost jedinjenja

Inhibitori sa najboljim rezultatima (tabela 3, tabela 4), diazahrizenski derivati **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)**, podvrgnuti su detaljnoj evaluaciji toksičnosti u *in vivo* eseuju na

embrionima zebrica (*Danio rerio*). Zebrice se u novije vreme, potpuno ravnopravno sa drugim testovima, koriste kao model za ispitivanje različitih vrsta toksičnosti, a naročito su u upotrebi u ranoj selekciji jedinjenja u inicijalnim fazama razvoja lekova.^{167,168} Ovde je praćena je letalnost, teratogenost, kardiotoksičnost, hepatotoksičnost i mijelosupresivni efekat. Hlorokin (CQ) korišćen je kao kontrolno jedinjenje (slika 11).



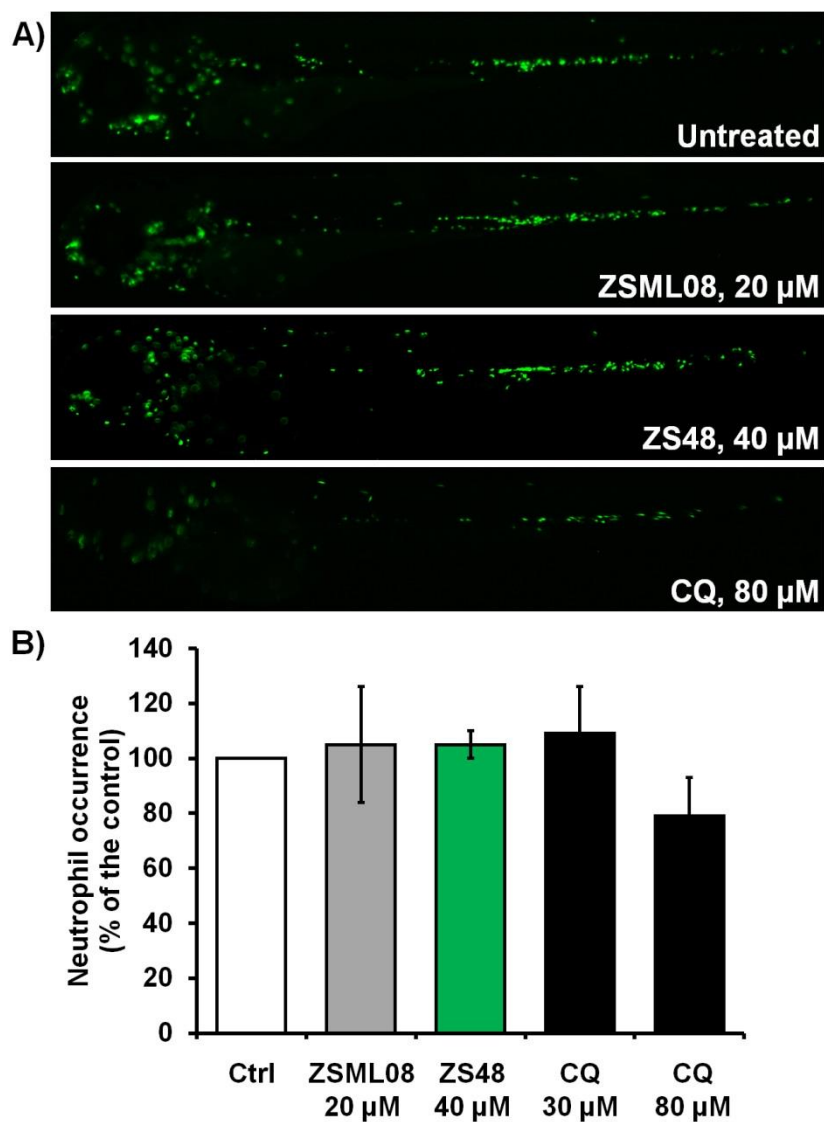
Slika 11. A. Rezultati esaja za utvrđivanje toksičnosti na embrionima zebrica u trenutku 120 hpf. Embrioni su izloženi dejstvu **34 (ZSML08)**, **11 (ZS48)** i **CQ**, a letalnost je izražena kao LC_{50} (µM). B. Morfologija prirodnih (*wild type*) embriona zebrica posle tretmana sa 30 µM **34 (ZSML08)**, 40 µM **11 (ZS48)** i 40 µM **CQ**. Jetra embriona oivičena je crvenom linijom. C. *In vivo imaging* morfologije jetre *Tg(l-fabp):EGFP* larva zebrica posle tretiranja sa **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** uz **CQ** kao kontrolu.

Derivati **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** ispoljili su letalnost koja je u funkciji primenjene doze. Jedinjenja nisu indukovala nikakve teratogene (razvojne) malformacije kod preživelih embriona. Kako su kardiotoksičnost i hepatotoksičnost dva najčešća negativna faktora koja dovode do odbacivanja terapeutika u razvoju, ove vrste toksičnosti ispitivane su svakodnevno od 72. do 120. časa posle fertilizacije (hpf – *hours post fertilization*). Nisu uočeni simptomi kardiotoksičnosti kod preživelih

embriona, poput perikardijalnog edema (slika 11B) ili poremećenog pulsa (primedba eksperimentatora autoru).

Za procenu hepatotoksičnosti ispitivano je dejstvo odabranih diazahrizenskih derivata na razvoj jetre (primenom jedinjenja 6 hpf, pre nego što je jetra formirana), kao i na funkciju jetre (primenom jedinjenja 72 hpf, kada je jetra potpuno funkcionalna). Korišćeni su transgeni *Tg(l-fabp:EGFP)* embrioni zebrića sa fluorescentno-obeleženom jetrom. Procena hepatotoksičnosti pravljena je na 120 hpf starim embrionima, koristeći indeks površine jetre (odnos površine jetre i bočne površine celog embriona). Ovakav način procene toksičnosti pokazao se kao adekvatno merilo oštećenja jetre.¹⁶⁹ Kao što se vidi na slici 11C, jedinjenja **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** ne menjaju indeks površine jetre, niti intenzitet njene fluorescencije, sve do koncentracije od 30 μM (**34 (ZSML08)**), odnosno 40 μM (**34 (ZSML08)**), bez obzira na trenutak primene jedinjenja (slika 11B, 11C). Drugim rečima, nema hepatotoksičnosti ni na koncentracijama 73 puta većim od EC_{50} (za **34 (ZSML08)**), odnosno 103 puta većim od EC_{50} (za **11 (ZS48)**). Nasuprot ovim jedinjenjima, **CQ** je značajno smanjio indeks površine jetre ($P < 0,05$) i njenu fluorescenciju na koncentracijama $\geq 30 \mu\text{M}$ (kada je primenjen 6 hpf; slika 11B, C), odnosno $\geq 80 \mu\text{M}$ (72 hpf; videti eksperimentalni deo).

Mijelotoksičnost je podvrsta toksičnosti koja se neretko ispoljava i kod klinički odobrenih terapeutika. Stoga je ispitivana toksičnost **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** prema neutrofilima. Korišćeni su transgeni *Tg(mpx:GFP)* embrioni zebrića sa fluorescentno-obeležanim neutrofilima. Na ovaj način, moguće je pratiti neposredno dejstvo jedinjenja na genezu i brojnost neutrofila. Ni jedan od dva derivata nije ispoljio toksičnost do koncentracije od 20 μM (**11 (ZS48)**), odnosno 40 μM (**34 (ZSML08)**), što je utvrđeno praćenjem ukupne fluorescencije (slika 12). Hlorokin (**CQ**) je pokazao izraženu mijelotoksičnost na dozama jednakim i većim od 80 μM .



Slika 12. Uticaj **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** na broj neutrofila u embrionima *Tg(mpx:GFP)* zebricama sa neutrofilima obeleženim pomoću GFP, 72 hpf. Fluorescencija neutrofila (A) i količina (B) posle tretmana sa **34 (ZSML08)**, **11 (ZS48)** i **CQ**.

Na posletku, određena je letalna koncentracija LC_{50} za ova dva derivata na embrionima zebrica. Koncentracija koja izaziva 50% mortaliteta kod embriona posle perioda od 120 hpf za jedinjenje **34 (ZSML08)** iznosi 18,9 μM , dok je za **11 (ZS48)** $LC_{50} = 72,1 \mu\text{M}$. Izmerena toksičnost približno je ~ 70-100 puta niža od izmerenih EC_{50} vrednosti za ova jedinjenja na HeLa i HFF ćelijama.

Razvoj mnogih potencijalnih terapeutika neretko biva zaustavljen zbog hepatotoksičnosti koja se ispoljava u prekliničkim i kliničkim studijama. U toku izrade ove teze nezavisno su testirani (**34 (ZSML08)**, **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)**) i efekti na

humane hepatocyte¹⁵⁹ – HepG2 ćelije, iako najnovija literatura ukazuje da su eksperimenti sa zebrićama pouzdaniji za procenu toksičnosti.¹⁷⁰ Panel eseja sastojao se od osam testova (tabela 7; u prvom redu nalaze se podaci klasičnog testa na hepatotoksičnost koji je izveden kada su ova jedinjenja testirana na malariju, što nije predmet ove teze). Sveukupno, praćen je broj hepatocita, veličina i intenzitet jedara, propagacija ćelijskog ciklusa, uticaj na masu i potencijal mitohondrija, uz dobre ili veoma dobre vrednosti koje su testirana tri jedinjenja pokazala. Uticaj na aktivnost p53 i sposobnost izazivanja steatoze (nagomilavanja lipidnih kapljica u ćelijama) takođe nisu bili izraženi. Najviša koncentracija pri kojoj su jedinjenja testirana bila je 1 mM (1000 μ M).

Tabela 7. Toksičnost **55 (ZS102)**, **35 (ZS103)** i **34 (ZSML08)** prema hepatocitima.

Jedinjenje/testirani parametar	55 (ZS102)	35 (ZS103)	34 (ZSML08)
HepG2 TC ₅₀ , 48h, (μ M) ^a	39,2	> 34,2	-
HepG2 TC ₅₀ , 24 h, broj ćelija (μ M) ^b	914	692	60,5
HepG2 TC ₅₀ , veličina jedara, 24 h, (μ M) ^c	> 1000	> 1000	60,9
HepG2 TC ₅₀ , intenzitet jedara, 24 h, (μ M) ^d	> 1000	354	62,1
zaustavljanje ćel. ciklusa HepG2 , TC ₅₀ , 24 h, (μ M) ^e	> 1000	98	57,2
HepG2 mitohondrijski potencijal, TC ₅₀ , 24 h, (μ M) ^f	950	655	35,2
HepG2 masa mitohondrija, TC ₅₀ , 24 h, (μ M) ^g	836	567	39,4
HepG2 steatoza EC ₅₀ , 72 h, (μ M) ^h	220	> 1000	> 500
HepG2 p53 aktivnost TC ₅₀ , 72 h, (μ M) ⁱ	> 1000	-	> 500

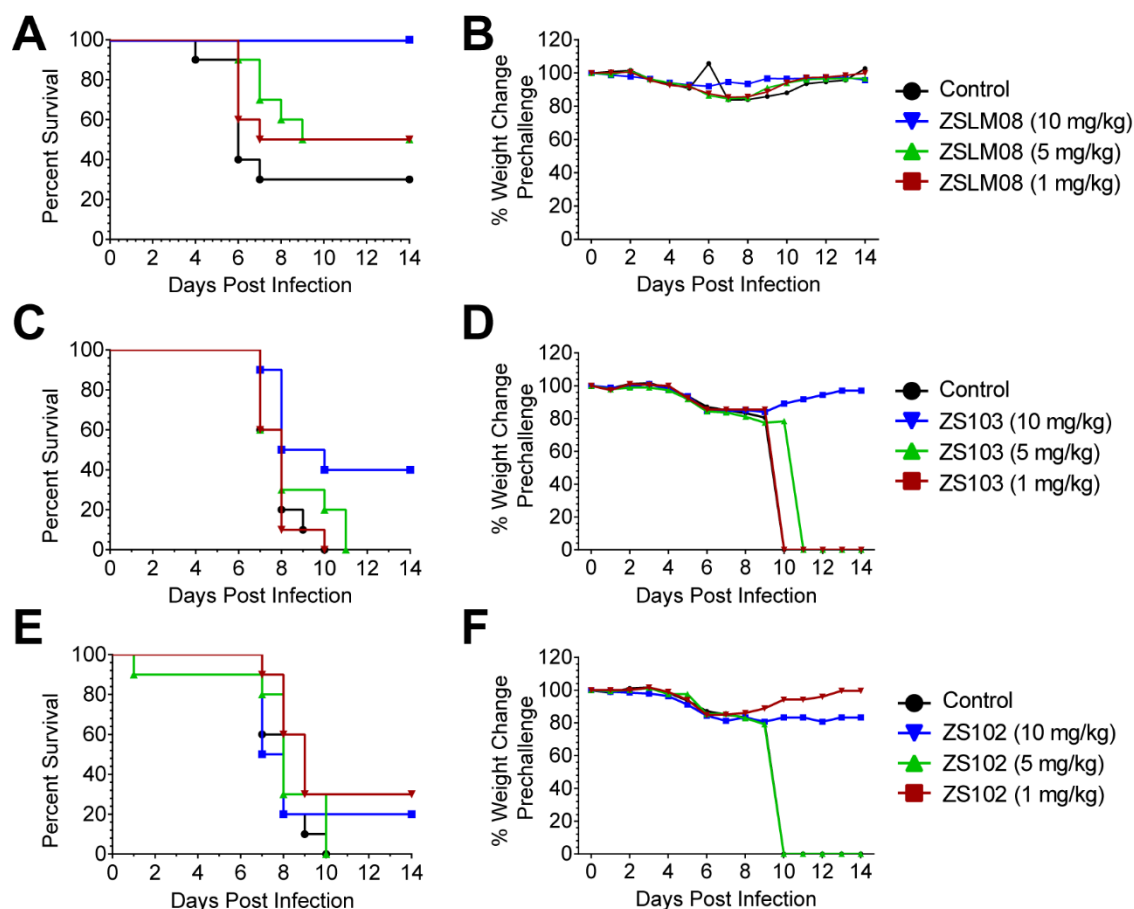
^aOsnovna hepatotoksična koncentracija (ćelijska linija izvedena iz karcinoma jetre - Hep G2) u eseju koji je trajao 48 h. ^bToksičnost ispoljena kroz smanjenje ukupnog prosečnog broja ćelija, u poređenju sa kontrolnom probom. ^cToksičnost ispoljena kroz veličinu jedara, određena merenjem prosečnih prečnika jedara u mikronima. ^dToksičnost ispoljena kroz promenu u prosečnoj fluorescenciji jedara. ^eToksičnost ispoljena kroz zaustavljanje ćelijskog ciklusa, izmerena kao odnos broja ćelija u 2N i broja ćelija u 4N fazi ćelijske deobe (broj diploidnih, odnosno broj tetraploidnih ćelija). ^fToksičnost ispoljena kroz uticaj na mitohondrijski potencijal, ispoljena kroz prosečni procenat intenziteta mitohondrijalne fluorescencije u poređenju sa kontrolom. ^gToksičnost ispoljena kroz uticaj na masu mitohondrija, praćena kroz promene u površini mitohondrija. ^hSteatoza, prosečna promena u površini lipidnih kapljica u

ćelijama. ⁱp53 aktivnost, izmerena kroz promene u prosečnoj fluorescenciji posle izazivanja odnosno vizualizacije anti-p53 fluorescentnim telom.

3.2.2.3. *In vivo* testovi na miševima

Radi procene tolerabilnosti, grupe od šest zdravih miševa podvrgnute su intraperitonealnim (IP) dozama jedinjenja **34 (ZSML08)** (20 mg/kg, dvostruko viša doza od najviše koja se koristiti u *in vivo* eseju procene aktivnosti), odnosno **11 (ZS48)**. Eksperiment je u potpunosti oponašao uslove *in vivo* eseja za određivane aktivnosti jedinjenja (ukupno sedam doza, jedna doza dnevno u periodu od sedam dana). Praćen je opšti izgled i ponašanje miševa, dva puta dnevno, ukupno 28 dana posle poslednje primenjene doze. Nisu zabeležene nikakve manifestacije akutne toksičnosti.

Imajući u vidu ove vrlo povoljne rezultate i ispitivanja, pristupilo se evaluaciji *in vivo* aktivnosti novog diazahriznskog derivata **34 (ZSML08)**, kao i naftiridinskih derivata **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)**.¹⁷¹ O mišjem modelu korišćenom za određivanje antivirusne potencije postoji dosta publikacija.^{106,109,134,135,172,173} Jedinjenja su testirana na tri koncentracije, 10, 5 i 1 mg/kg (slika 13). Diazahrizenski derivat **34 (ZSML08)** iskazao je aktivnost koja je, uglavnom, u funkciji primenjene doze. Na najvišoj primenjenoj dozi jedinjenje je štitilo 10/10 miševa, dok je na obe niže doze preživelo 5/10 miševa. Iako preživljavanje miševa u kontrolnoj grupi nije uvek uniformno, ipak je statistički značajan ($p = 0,0013$) povišen stepen preživljavanja u grupi koja je primala dozu 10 mg/kg. Kod preživelih miševa primećen je minimalan gubitak težine uz povraćaj posle osmog dana (slika 13B). Takođe, preživelo je 4/10 miševa koji su tretirani jedinjenjem **35 (ZS103)** pri dozi 10 mg/kg (slika 13C-D). Jedinjenje **55 (ZS102)** pokazalo je najslabiju aktivnost. *In vivo* potentnost jedinjenja u ovom slučaju dobro je korelisana sa aktivnošću ova tri derivata u ćelijskom eseju, poređani od najviše do najniže aktivnosti: **34 (ZSML08) > 35 (ZS103) > 55 (ZS102)**.

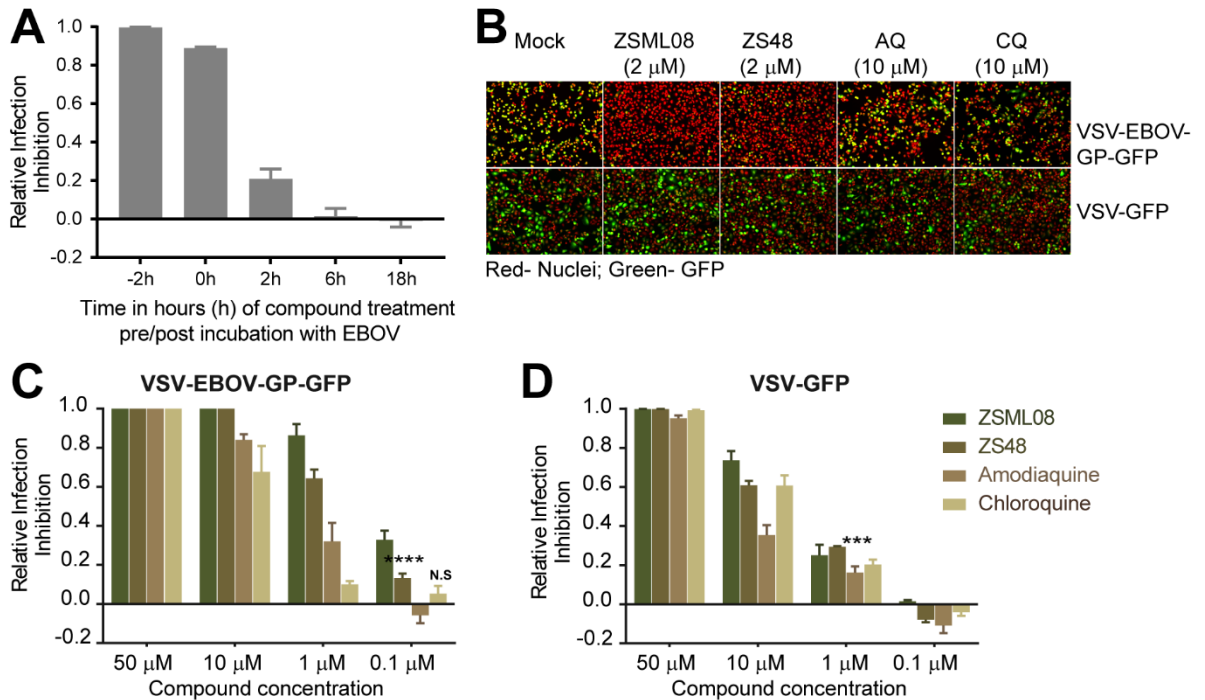


Slika 13. Rezultati *in vivo* testiranja jedinjenja **34 (ZSML08)**, **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)**. Miševi ($n = 10$ miševa po grupi) su tretirani rastvorima jedinjenja, naznačenih koncentracija, intraperitonealnim putem. Dva sata posle prve doze miševi su intraperitonealnim putem inficirani pomoću 1000 PFU virusa ebole adaptiranog za upotrebu na miševima. Tretman rastvorima jedinjenja nastavljen je u narednih šest dana. Grafički prikaz procenata promene telesne mase dati su u odnosu na masu miševa “nultog” dana. Jedinjenje **34 (ZSML08)** (A-B); **55 (ZS102)** (C-D), **35 (ZS103)** (E-F). p -vrednosti evaluirane su pomoću *long-rank* testa, radi poređenja preživljavanja sa kontrolnom grupom. **34 (ZSML08)** $p = 0,0013$ (10 mg/kg); **35 (ZS103)**, $p = 0,017$ (10 mg/kg); **55 (ZS102)** $p = 0,03$ (1 mg/kg).

3.2.3. Ispitivanje mehanizma dejstva

3.2.3.1. Jedinjenja 34 (ZSML08) i 11 (ZS48) sprečavaju ulazak virusa u ćeliju

Poznato je da je meta jedinjenja tipa CAD ulazak virusa ebole u ćeliju domaćina, kao posledica modifikovanog funkcionisanja LE/Ly, odnosno sprečene fuzije membrane virusa sa lizozomskom membranom.^{131,174} Prvi eksperiment koji je izveden je evaluacija ulaska virusa u ćeliju u funkciji vremena dodatka jedinjenja – TCA esej (*Time of Compound Addition*).



Slika 14. (A) Ulazak virusa u ćeliju u funkciji vremena dodatka jedinjenja (TCA esej) u kom su ćelije tretirane ili je tretman simuliran (*mock treatment*) jedinjenjem **34 (ZSML08)** (2 μ M) 2 h pre dodatka virusa (-2 h), ili istovremeno sa dodatkom virusa (0 h), ili u različitim trenucima posle inkubiranja sa EBOV [multiplicitet infekcije[§], (MOI) = 10, 24 h], što je bilo praćeno IFA i HCI esejima kako bi se odredio nivo eksprimovanog GP. Step en infekcije u svakom vremenskom razmaku normalizovan je rezultatom iz kontrolne probe. (B) Ekspresija GFP u HeLa ćelijama, koje su prethodno tretirane testiranim jedinjenjima u toku 2 h, a potom rVSV-EBOV-GP-GFP ili VSV-GFP u toku 8 h ili 6 h. Ćelije su vizualizovane pomoću Cell MaskDeep Red reagensa. (C-D) Isto kao (B), s tim što su ćelije tretirane, ili je tretman simuliran rastvorima jedinjenja navedenih koncentracija, a potom inficirane pomoću rVSV-EBOV-GP-GFP (C) ili VSV-GFP (D). Relativna inhibicija infekcije dobijena je normalizacijom procenta ćelija koje eksprimuju GFP rezultatom iz kontrolne probe. Podaci su dati uz \pm SD (standardna devijacija) u tri replikata i predstavljaju tri nezavisna eksperimenta. *p*-vrednosti evaluirane su višestrukim t-testovima i ***, *P* < 0,0001.

Kao što slika 14A pokazuje, tretiranje ćelija jedinjenjem 2 h pre infekcije, ili u trenutku infekcije (0 h) neophodno je za inhibiciju ulaska jedinjenja u ćeliju, odnosno za aktivnost. Tretirati ćelije jedinjenjem 2 h posle infekcije, kada je već došlo do ulaska virusa u ćeliju, pokazalo se iluzornim.¹⁷⁵

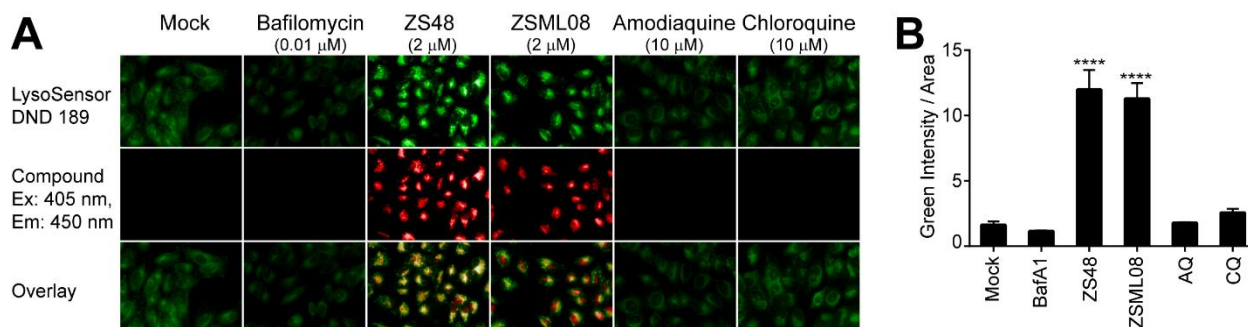
Naredni ogled imao je za cilj da utvrdi da li je sprečavanje ulaska virusa u ćeliju posledica remećenja funkcije LE/Ly, ili uticaja na rane endozome i druge faktore bitne

[§] Multiplicitet infekcije predstavlja odnos infektivnog agensa i ćelija-meta odnosno ćelija-domaćina.

za ulazak. Korišćen je rekombinantni virus vezikularnog stomatitisa (rVSV) koji eksprimira zeleni fluorescentni protein (GFP), kao i, u jednoj varijanti, svoj nativni GP (rVSV-GP) ili, u drugoj varijanti, GP virusa ebole (rVSV-EBOV-GP), umesto nativnog GP.¹⁷⁶ Prisustvo VSV-GP već u ranim endozomima dovoljno je za ulazak tog virusa u ćeliju, dok je kod GP virusa ebole neophodno da protein bude prisutan u funkcionišućim kasnim endozomima/lizozomima.¹⁷⁷ Dakle, ukoliko jedinjenja modifikuju LE/Ly, onda će njihov uticaj biti veći na ulazak virusa vezikularnog stomatitisa u ćelije kada je on modulisan pomoću EBOV-GP nego onda kada je modulisan pomoću nativnog GP. Kao što je prikazano na slici 14(B-D) čak i pri koncentraciji 0,1 μM jedinjenja **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** merljivo inhibiraju rVSV-EBOV-GP, dok je uticaj na VSV-GP značajno manje izražen. Na višim koncentracijama VSV infekcija bila je inhibirana bez obzira na to koji je GP eksprimovan, premda su na najvišoj koncentraciji (50 μM) jedinjenja već citopatična. Dva kontrolna jedinjenja, **CQ** i **AQ**, pokazala su slabiju potentnost.^{111,133,137} Sveukupno, eksperiment je pokazao da **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** imaju sposobnost da spreče upravo ulazak virusa u ćeliju, i da to čine remeteći, na neki način, funkcionisanje LE/Ly sistema. Takođe, jedinjenja su daleko aktivnija od kontrolnih **AQ** i **CQ**, sa kojima dele određene strukturne motive i karakteristike.

3.2.3.2. Derivati 11 (ZS48) i 34 (ZSML08) su lizozomotropni i modifikuju kisele vezikule

Jedinjenja CAD tipa slobodno difunduju u ćelije, a kada se nađu u kiselim vezikulama bivaju protonovana i ostaju zarobljena. Promene u fiziologiji i morfologiji LE/Ly do kojih dolazi usled toga mogu rezultovati onesposobljenjem virusa za fuziju. Sniženje pH unutar LE/Ly neophodno je za lizu EBOV-GP do lizirane, fuzogene forme, neophodne za ulazak virusa u citosol.¹⁷⁸ U sledećem stupnju ispitivanja mehanizma delovanja (MOA) inhibitora ispitivan je uticaj **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** na morfologiju i intravezikularni pH, primenjujući mikroskopiju na živim ćelijama i koristeći komercijalno dostupni fluorescentni reporter LysoSensor DND 189.

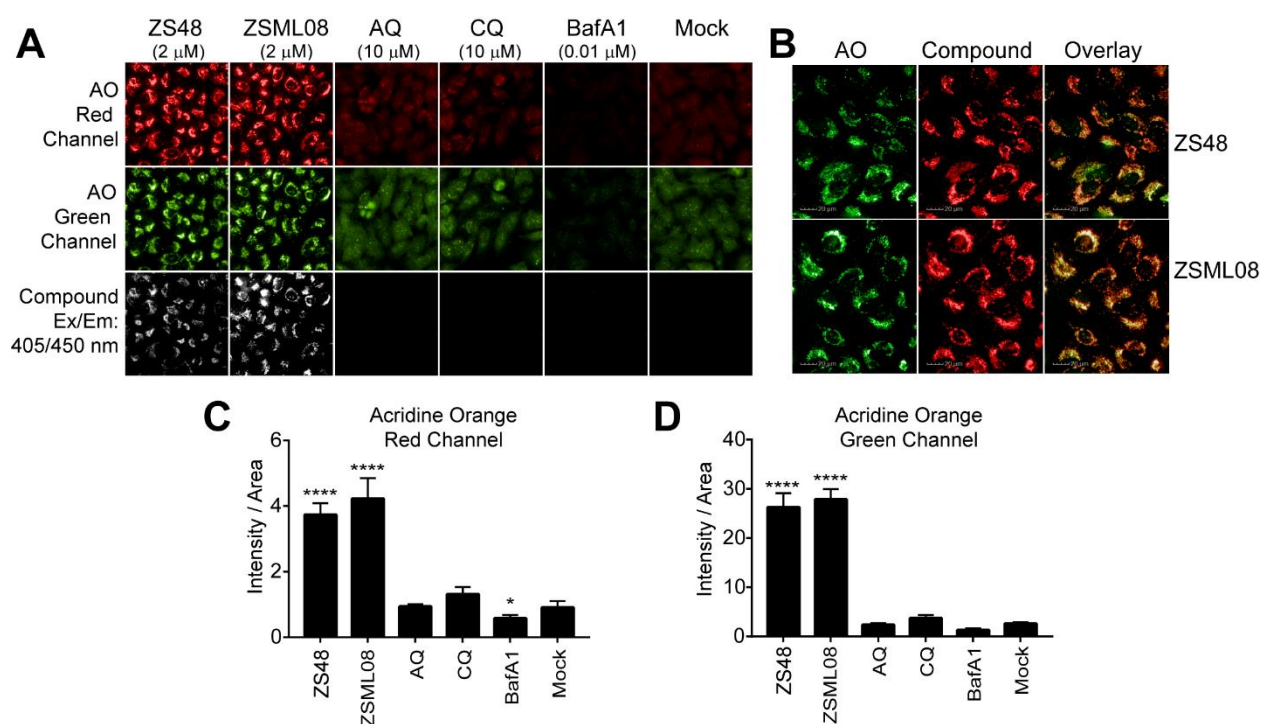


Slika 15. HeLa ćelije su simulirano tretirane (*mock treatment*) ili tretirane Bafilomicinom A1 (**BafA1**) koncentracije 0,01 μM , jedinjenjem **11 (ZS48)** koncentracije 2 μM , **34 (ZSML08)** koncentracije 2 μM , **AQ** koncentracije 10 μM i **CQ** koncentracije 10 μM u toku 1 h, posle čega su ćelije tretirane 10 minuta reagensom LysoSensor DND 189. (A) Ćelije su isprane i vizualizivane koristeći ekscitaciju/emisiju na 443/505 nm za LysoSensor DND 189, a 405/450 nm za testirana jedinjenja. (B) Odnos intenziteta i površine emitovane fluorescencije LysoSensor DND 189 reagensa na prikupljenim slikama, poput onih pod (A), analiziran je Columbus softverom za analizu slika. Svaka vrednost data je sa \pm SD, replikovana u osam bunarčića, pozicioniranih na mikrotitar ploči sa 96 bunarčića, pri čemu je bilo oko 3000 ćelija po bunarčiću, predstavljajući tri nezavisna ogleđa. *p*-vrednost evaluirana je kroz One Way Anova analizu. ****, *p* < 0,0001.

LysoSensor DND 189 lokalizuje se u LE/Ly i ispoljava promenljiv intenzitet fluorescencije, u funkciji pH. Intenzitet njegove fluorescencije je u funkciji pH vrednosti okruženja, pri čemu ovaj reporter fluorescira najjače između pH 4,0 i 5,0. HeLa ćelije su prvo tretirane jedinjenjima u toku 1 h, a potom su obojene pomoću LysoSensor DND 189 reagensa. Jedinjenja **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** su i sama fluorescentna, što omogućava njihovu vizualizaciju, uz ekscitaciju na 405 nm i emisiju na 450 nm. Pod uslovima vizualizacije LysoSensor DND 189 reagensa, jedinjenja ne daju sopstveni signal. Kao što se vidi na slici 15A, oba diazahrizenska derivata izrazito su ko-lokalizovana sa LysoSensor DND 189, što sugeriše da ona, poput LysoSensor DND 189 reagensa, slobodno difunduju u ćelije, a potom u LE/Ly postaju višestruko protonovana i zarobljena ($\sim \text{ZSH}_3^{3+}$, tabela 6, shema 19). Uz to, **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** su uzrokovali grupisanje LE/Ly u guste klastere, u poređenju sa kontrolnom probom, gde su LE/Ly malobrojniji i raspršeni u citoplazmi (slika 15, A-B). Iznenađujuće je to što u prisustvu jedinjenja dolazi do pojačane fluorescencije kiselih vezikula, što odbacuje mogućnost da jedinjenja, bazna kakva jesu, neutrališu ili alkališu LE/Ly. Fluorescencija LysoSensor DND 189 oštro opada pri promeni pH od 4,0 ka 0,5,

kao i od 4,0 prema 9,0.¹⁷⁹ Moguće objašnjenje pojačane fluorescencije jeste pojačana apsorpcija LysoSensor DND 189 reagensa od strane umnoženih i uvećanih LE/Ly, kada su jedinjenja prisutna. U prisustvu kontrolnih CAD jedinjenja, **CQ** i **AQ**, dolazi do vrlo malog porasta intenziteta fluorescencije u poređenju sa kontrolom (slika 15B), dok druge promene nisu zapažene. Bafilomicin A1 (**BafA1**), inhibitor vakuolarne H⁺ ATPaze koja reguliše nisku pH vrednost u lumenu vezikula, očekivano je smanjio intenzitet fluorescencije.¹⁸⁰ Ovaj eksperiment potvrđuje prisustvo (ulazak) naših jedinjenja u LE/Ly, pri čemu jedinjenja ne dovode do promene pH u vezikuli.

Lizozomotrofno slabo bazno jedinjenje akridin-oranž (AO) korišćeno je da bi se utvrdilo uvećavaju li **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** zapreminu kiselih vezikula. Monomer AO vezuje se za DNK i RNK i fluorescira u zelenoj oblasti. Ukoliko AO ostane apsorbovan i zarobljen unutar kiselih vezikula, u formi AOH⁺, dolazi do njegove oligomerizacije i fluoresciranja u crvenom delu spektra. Porast intenziteta crvene fluorescencije srazmeran je porasti koncentracije AOH⁺ u LE/Ly.¹⁸¹ Nije primećeno da jedinjenja fluoresciraju pod uslovima vizualizacije AO.



Slika 16. HeLa ćelije prethodno su tretirane, u toku 2 h, naznačenim jedinjenjima, posle čega su inkubirane sa akridin-oranžom (AO) 30 min. Pre vizualizacije na naznačenim talasnim dužinama ćelije su isprane. (A) Lokalizacije AO, **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)**. (B) Slike su uvećane da bi se lakše mogla uočiti ko-lokalizacija AO sa **11**

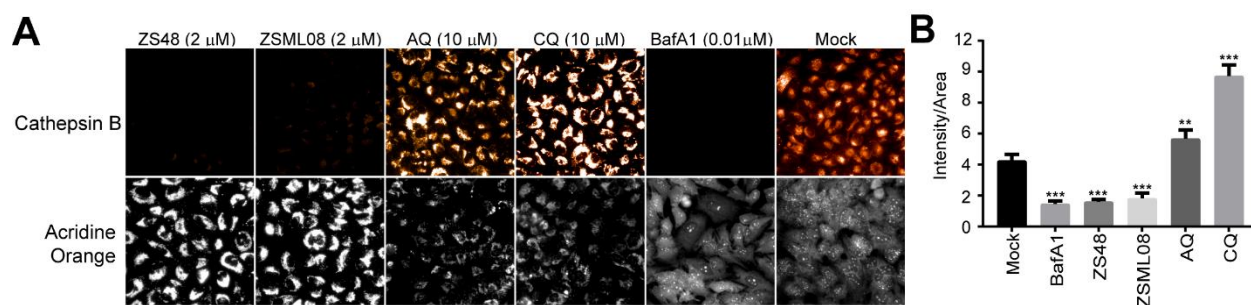
(ZS48)/34 (ZSML08). (C) i (D) Ukupni prosečni količnik između intenziteta fluorescencije AO i fluorescentne površine, dobijen u HCI eseju. Svaka vrednost data je sa \pm SD, replikovana u osam bunarčića, pozicioniranih na mikrotitar ploči sa 96 bunarčića, pri čemu je bilo oko 3000 ćelija po bunarčiću, predstavljajući tri nezavisna oglada. *p*-vrednost evaluirana je kroz One Way Anova analizu. ****, $P < 0,0001$. *, $P < 0,05$.

Na slici 16 prikazan je izražen efekat koji su **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** imali na intenzitet i distribuciju fluorescencije AO. Zapažen je značajan porast fluorescencije u crvenoj oblasti (slika 16A) što ukazuje na uvećanje kiselih vezikula. Takođe, jedinjenja su bila ko-lokalizovana sa AO (slika 16B) što potvrđuje opservaciju iz oglada sa LysoSensor DND 189 reagensom. Molekuli AO bili su lokalizovani u vezikulama koje su bile gusto klasterizovane u perinuklearnom regionu. Fluorescencija u zelenoj oblasti u ovoj regiji bila je izrazito slaba (emisija na 480 nm), što ukazuje da se mala količina AO vezala za nukleinske kiseline. Drugim rečima, uvećani i umnoženi LE/Ly apsorbovali su i zarobili najveći deo AO u formi AOH^+ . Ovakav efekat bio je primetno slabiji, ali ipak prisutan, i kod ćelija tretiranih pomoću **CQ** i **AQ**.

Naredni ogled osmišljen je da ispita kako derivati utiču na one aspekte funkcije lizozoma koji direktno utiču na ulazak virusa ebole.

3.2.3.3. 34 (ZSML08) i 11 (ZS48) onemogućavaju pravilno funkcionisanje katepsina B

U narednom ogledu ispitivan je uticaj diazahrizenskih derivata na funkcionisanje katepsina B i L, enzima koji se nalaze unutar LE/Ly i ključni su za lizu EBOV-GP, neophodnu za generisanje virusa kompetentnog za fuziju membrana. Aktivnost amodiakina i hlorokina ranije je u potpunosti pripisivana njihovoj sposobnosti inhibicije aktivnosti katepsina.¹⁸² Korišćen je peptidni reporter, koji slobodno difunduje u sve ćelijske organele i vezikule, i specifično crveno fluorescira kada pretrpi hidrolizu određenim katepsinom. HeLa ćelije tretirane su jedinjenjem **11 (ZS48)** ili **34 (ZSML08)** 12 h, pa su potom inkubirane 1 h sa peptidnim reporterom. Posle ovoga ćelije su ispirane i snimane.



Slika 17. Aktivnost katepsina B u ćelijama tretiranim sa **11 (ZS48)** ili **34 (ZSML08)**. HeLa ćelije tretirane su jedinjenjima **11 (ZS48)**, **34 (ZSML08)**, **AQ**, **CQ** ili **BafA1** u toku 12 h, posle čega su tretirane Magic Red reagensom 10 min, ili akridin-oranžom (*Acridine Orange*, AO), 30 min. (A) Ćelije su isprane, a potom vizualizovane uz odnos ekcitacije i emisije 590/630 nm za fluorescenciju Magic Red reagensa, odnosno 520/560 nm za fluorescenciju AO. Pojačan intenzitet fluorescencije Magic Red indikacija je aktivnosti katepsina B. (B) Količnik prosečnog intenziteta fluorescencije koju emituje Magic Red i površine koja fluorescira određen analizom dobijenih slika kroz HCA. Svaka vrednost data je sa \pm SD, replikovana u osam bunarčića, pozicioniranih na mikrotitar ploči sa 96 bunarčića, pri čemu je bilo oko 3000 ćelija po bunarčiću, predstavljajući tri nezavisna ogleda. *p*-vrednost evaluirana je kroz One Way Anova analizu. ***, $P < 0,001$. **, $P < 0,01$.

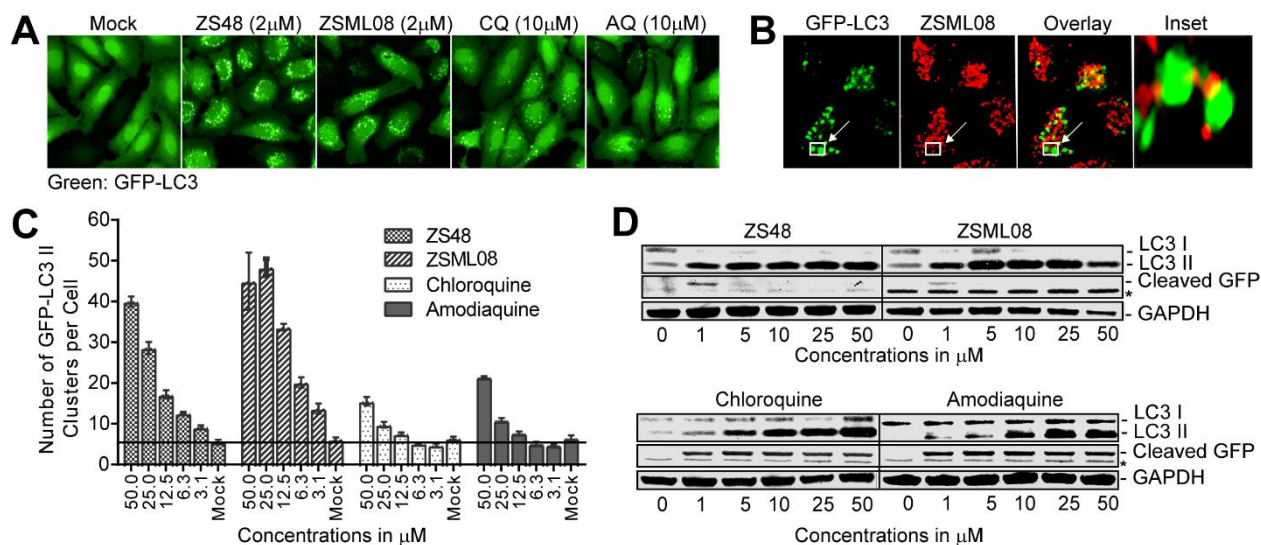
Kao što se može videti na slici 17 (A i B), postoji značajan pad u aktivnosti katepsina B u ćelijama tretiranim sa **11 (ZS48)** ili **34 (ZSML08)**, u poređenju sa kontrolnom probom. Uz to, došlo je do pojačane hidrolize peptidnog reportera u prisustvu **CQ** i **AQ**, što protivreči ranijim publikacijama, u kojima se tvrdilo da **CQ** i **AQ** sprečavaju acidifikaciju kiselih odeljaka, inhibitorajući pri tom katepsin B.¹⁸² Radi kontrole korišćen je i bafilomicin A1, koji je, očekivano, snižavao aktivnost katepsina B. Diazahrizenski derivati ispoljili su sličan uticaj i prilikom kraćeg dejstva na ćelije (6 h), a takođe su inhibirali i katepsin L.

3.2.3.4. **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** sprečavaju fuziju lizozoma sa autofagozomima

Neka CAD jedinjenja, poput **CQ** i **AQ**, sprečavaju pravilno sazrevanje lizozoma remeteći sposobnost lizozoma da stupe u fuziju sa vezikulama koje sadrže kargo,^h uključujući LE koje sadrže NPC1 i autofagosome.^{183,184} Ovi poremećaji mogu sprečiti

^h Kargo predstavlja sve one proteine zbog kojih vezikula postoji, odnosno čijem transportu služi.

transport virusa ebole do kasnog endozoma koji sadrži NPC1, na taj način sprečavajući ulazak virusa u ćeliju. U okviru našeg istraživanja ispitivana je fuzija lizozoma sa autofagozomima koristeći LC3 marker. LC3-I, koji se nalazi u citosolu, u toku autofagije biva transformisan u LC3-II koji se selektivno inkorporiše u membranu autofagozoma. Fuzijom autofagozoma i lizozoma nastaju autolizozomi. Posledica poremećaja ove fuzije jeste akumulacija LC3-II klastera.



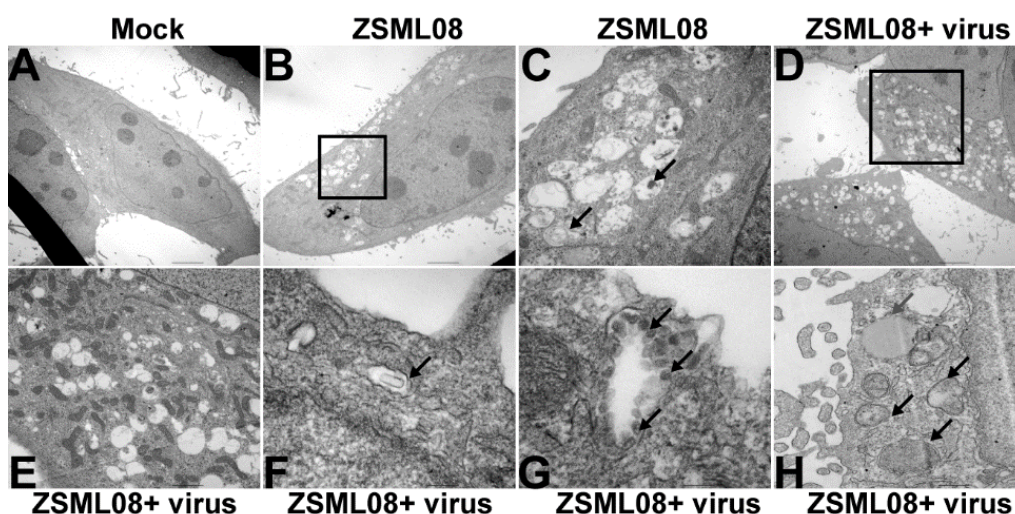
Slika 18. (A) HeLa ćelije koje stabilno eksprimuju GFP-LC3 tretirane su jedinjenjima **11 (ZS48)**, **34 (ZSML08)**, **AQ** i **CQ** u toku 4 h, posle čega su vizualizovane žive ćelije radi utvrđivanja eventualnog prisustva klasterovanja GFP. (B) Konfokalne slike, uvećane u odnosu na (A) kako bi bio utvrđen prostorni raspored vezikula koje sadrže **11 (ZS48)** ili **34 (ZSML08)**, kao i raspored GFP-LC3-II klastera. Može se primetiti da GFP klasteri nisu ko-lokalizovani sa **11 (ZS48)** ili **34 (ZSML08)**, kao i da su u nekim trenucima klasteri i jedinjenja blizu jedni drugih, dodirujući se ivicama. Belo uokvireni kvadrati predstavljeni su uveličanom slikom. (C) HeLa ćelije, kao kod (A), tretirane su navedenim koncentracijama jedinjenja u toku 4 h, posle čega su vizualizovane. Analiziran je ukupan broj GFP klastera po ćeliji. Svaka vrednost data je sa \pm SD, replikovana u osam bunarčića, pozicioniranih na mikrotitar ploči sa 96 bunarčića, pri čemu je bilo oko 500 ćelija po bunarčiću, predstavljajući tri nezavisna ogleda. (D) *Western blot* ćelijskih lizata HeLa ćelija koje su bile izložene restvorima jedinjenja navedenih koncentracija, u toku 6 h. * indikuje nespecifične trake.

Mikroskopijom je izvršena analiza LC3-II klastera koristeći HeLa ćelije koje eksprimuju GFP-LC3. Oba diazahrizeska derivata, kao i kontrolna jedinjenja **CQ** i **AQ**, dovela su do povišene klasterizacije GFP-LC3-II u odnosu na slepu probu, premda je ovaj efekat bio izraženiji kod diazahrizena (slika 18A). Nadalje, GFP-LC3-II klasteri

većinom nisu bili ko-lokalizovani sa vezikulama-nosiocima **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** (slika 18B). Tek u pojedinim slučajevima dolazilo je do perifernog preklapanja, što sugeriše da je došlo upravo do sprečene fuzije lizozoma i autofagozoma. Ove opservacije dodatno su potvrđene *Western blot* analizom, jer se pokazalo da je povišen nivo eksprimovanog LC3-II u funkciji primenjene koncentracije jedinjenja (slika 18D), pri čemu su ćelije naročito bile osetljive prema **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)**. Na kraju, praćenjem nivoa otpuštenog GFP primećena je jasna razlika u mehanizmu inhibicije autofagije između diazahrizenskih derivata i kontrolnih jedinjenja (slika 18D). Naime, GFP-LC3-II, koji je u membrani autolizozoma okrenut prema lumenu trpi degradaciju, kojoj prethodi hidroliza, odnosno otpuštanje GFP. U eksperimentima u kojima se **CQ** koristi u koncentracijama ispod 50 μM ne dolazi do potpune inhibicije funkcije lizozoma, zahvaljujući čemu dolazi do akumulacije otpuštenog GFP (slika 18D). Međutim, kako su diazahrizenski derivati mnogo potentniji, oni efikasno sprečavaju degradaciju GFP-LC3-II jer onemogućavaju formiranje autolizozoma. Sveukupno, dokazano je da **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** zaustavljaju fuziju autofagozoma sa LE/Ly vezikulama, mnogo efikasnije od hlorokina i amodiakina.

3.2.3.5. 34 (ZSML08) dovodi do ekspanzije vezikularnih odeljaka

Na posletku, korišćena je elektronska mikroskopiju radi vizualizacije načina na koji **34 (ZSML08)** utiče na transport virusa ebole i morfologiju vezikula u HeLa ćelijama. Do ovog oglada nije primećena značajna razlika u ponašanju između **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)**, pa je ogled izveden samo sa jednim jedinjenjem, aktivnijim **34 (ZSML08)**.



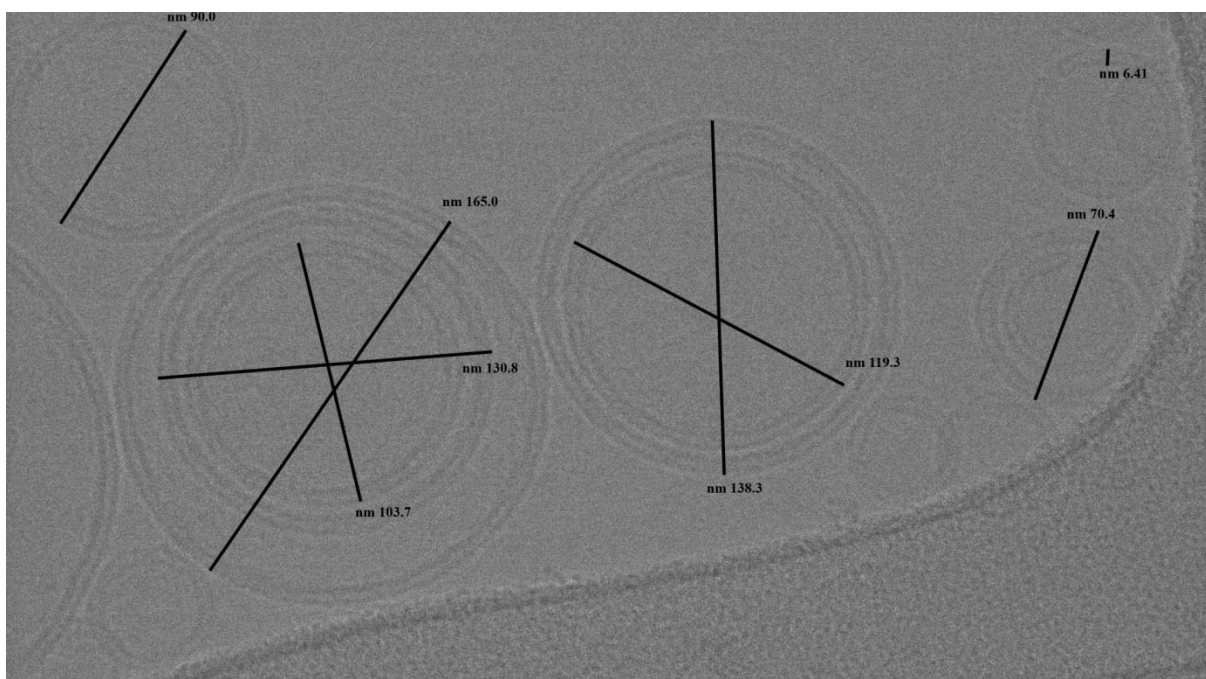
Slika 19. Elektronska mikroskopija HeLa ćelija tretiranih jedinjenjem **34 (ZSML08)**. Ćelije su simulirano tretirane (*mock treatment*; A) ili prethodno tretirane u trajanju od 2 h jedinjenjem **34 (ZSML08)**, posle čega je sledila simulirana (B-C) ili prava inkubacija sa rVSV-EBOV-GFP u toku 2 h (F) ili 6 h (D, E, G-H) posle čega su preparati pripremljeni za mikroskopiju. Crno uokvireni kvadrati na slikama (B) i (D) uvećani su na (C) i (E). Crne strelice na (C) usmerene su ka lamelarnim vezikulama koje sadrže granule, dok u (F) pokazuju štapićaste VSV-EBOV virusolike čestice. Na (G) one ukazuju na multivezikule sa odeljcima, a u (H) pokazuju dvostruke membrane autofagozoma.

HeLa ćelije su ili tretirane, ili je tretman simuliran (*mock treatment*) jedinjenjem **34 (ZSML08)** u toku 2 h, a potom su ili inficirane VSV-EBOV-GP-GFP u toku 2 h ili 6 h, ili nisu bile inficirane. Bez obzira da li su bile inficirane virusom ili ne, kod ćelija koje su bile inkubirane sa **34 (ZSML08)** uočen je povećan broj i povećan volumen vezikula u poređenju sa kontrolom (slika 19 A-D). U ovim vezikulama došlo je do akumuliranja lamelarnih struktura, lipida, manjih vezikula i agregata, što implicira defekte u hidrolitičkoj funkciji lizozoma. U ranim fazama infekcije (posle 2 h) i u prisustvu **34 (ZSML08)** unutar vezikula došlo je do nagomilavanja VSV-EBOV-GFP virusolikih čestica u obliku metaka, što ukazuje da jedinjenje dovodi do internalizacije, odnosno “zarobljavanja” virusa (slika 19F). Uočeno je i nekoliko vezikula sa dvostrukim membranama i moguće je da je reč o autofagozomima (slika 19H). Do ekspanzije vezikula dolazilo je samo na jednoj strani jedra, što potvrđuje prethodne opservacije. Sveukupno, ovaj ogled predstavlja poslednju potvrdu pojačane ekspanzije vezikula i modifikovanog funkcionisanja lizozoma u prisustvu jedinjenja **34 (ZSML08)**.

3.3. Pokušaj poboljšanja aktivnosti jedinjenja dostavom lipozomima

U toku izrade ove disertacije želeli smo takođe da enkapsulacijom jedinjenja u liposome povećamo njihovu biodostupnost. Ukratko, sonikacijom (ultrazvučna sonda) u puferisanom vodenom rastvoru (pH = 7,4) metodom tankog filma generisani su lipozomi sastavljeni od fosfatidilholina žumanceta i holesterola. Jedinjenje **10** (slobodna baza jedinjenja **11 (ZS48)**) se prilikom formiranja lipozoma ugrađuje u lipidni dvosloj, što je utvrđeno NMR spektroskopijom. Lipozomi su vizualizovani pomoću krio-TEM mikroskopa (slika 20), za šta dugujemo zahvalnosti doktoru Xi-ju Jiang-u (University of California, Berkeley) i profesoru Velimiru Radimiloviću (Tehnološko-metalurški fakultet; SANU). Formulacija je primenjena na zdravim

miševima, pod uslovima koji imitiraju *in vivo* ebola esej, i nije ispoljila nikakvo negativno dejstvo na ponašanje i izgled miševa. Na posletku, lipozomi su testirani na miševima zaraženim virusom ebola, pod istim uslovima pod kojima su testirani mali molekuli (i.p. primena tokom sedam dana). Nažalost, lipozomi nisu doprineli povećanom preživljavanju miševa u poređenju sa kontrolnom grupom – svi miševi su na kraju esejja podlegli bolesti. Premda smo smatrali da bi intravenozna primena formulacije bila adekvatnija, takav test nije bilo moguće organizovati. Stoga ovi ogledi neće biti detaljno izloženi.



Slika 20. Krio-TEM slika lipozoma (uveličanje 40000×).

3.4. Diskusija

U okviru ove teze sintetisano je dvanaest 1,7-dialkilamino-4,10-diazahrizena. Posle inicijalnih testova, utvrđeno je da pojedini derivati imaju poboljšanu aktivnost u odnosu na ranije analoge, koji su služili kao uzor.¹¹¹ Nekoliko jedinjenja, naročito **11 (ZS48)**, **13 (ZS64)** i **19 (ZS62)** pokazalo je i izrazito dobru *in vivo* aktivnost, zbog čega je nastavljeno istraživanje daljih modifikacija ove strukture. Posebno su se istakli derivati

11 (ZS48) i **13 (ZS64)**, čija aktivnost dobro koreliše sa primenjenom dozom, i koji štite 9/10 miševa (**11 (ZS48)**), odnosno 7/10 miševa (**13 (ZS64)**) pri dozi 10 mg/kg.

Prilagođavanjem heterocikličnog prstena sa ciljem smanjenja hidrofobnosti i poboljšanja rastvorljivosti sintetisana je grupa derivata 1,5-naftiridina. Nažalost, od dvanaest jedinjenja ovog tipa, izraženiju inhibitornu aktivnost pokazala su samo četiri – **35 (ZS103)**, **36**, **53** i **55 (ZS102)**. Jedinjenje **53** jedini je predstavnik naftiridina supstituisanih jednom alkilamino-grupom, i svoju aktivnost verovatno duguje prisustvu dodatnog 7-hlorhinolinskog prstena. Preostala tri aktivna naftiridina (**37**, **54** i **57**) su bis-alkilamino-derivati, ali poseduju konstante inhibicije unekoliko inferiornije u odnosu na hrizene.

Finim podešavanjem diazahrizenske strukture, odnosno kombinujući strukturne elemente prisutne u **11 (ZS48)**, **13 (ZS64)** i **19 (ZS62)**, dobijena su tri veoma aktivna jedinjenja, **34 (ZSML08)**, **39** i **40**, sa veoma dobrim indeksima selektivnosti (*in vitro*). Naftiridini **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)**, kao i diazahrizen **34 (ZSML08)** podvrgnuti su ADME studiji, u kojoj su pokazali dobre rezultate. Šta više, najaktivnija jedinjenja, **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)**, prošla su temeljnu procenu toksičnosti kroz različite eseje na zebricama i miševima i tom prilikom pokazala su se kao bezbedna u najvećoj meri.

Naftiridini **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)**, kao i diazahrizen **34 (ZSML08)**, podvrgnuti su potom *in vivo* testu aktivnosti u miševima, slično jedinjenjima **11 (ZS48)**, **13 (ZS64)** i **19 (ZS62)**. Jedinjenje **34 (ZSML08)** pokazalo je izraženu aktivnost koja je dobro korelisana sa primenjenom dozom, štiteći 10/10 miševa pri dozi 10 mg/kg. Telesna masa miševa tretiranih jedinjenjem **34 (ZSML08)** nije se menjala tokom celog oglada, što ukazuje da jedinjenje zaista sprečava posledice oboljevanja od virusa ebole. Jedinjenje **34 (ZSML08)** jedno je od retkih poznatih jedinjenja koje štiti sve miševe kada se primenjuje u prilično niskoj dozi 10 mg/kg.

Može se pretpostaviti da je inferiorna aktivnost naftiridina (**35 (ZS103)**) je štitio 4/10 miševa pri najvišoj dozi, **55 (ZS102)** 2/10) povezana sa njihovim fizičko-hemijskim karakteristikama. Kao što je već pomenuto, visoko nalektrisanje ovih jedinjenja na fiziološkom pH, u poređenju sa hrizenskim derivatima, kao i niski distribucioni

koeficijenti, verovatno otežavaju ulazak jedinjenja u ćeliju, odnosno prolazak kroz nepolarnu ćelijsku membranu.

Diazahrizenski derivati **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** prisutni su niskoj, ali konstantnoj koncentraciji u serumu, u toku najmanje prva 4 h posle primene doze (ogled sa **11 (ZS48)**), odnosno najmanje 24 h posle poslednje doze (ogled sa **34 (ZSML08)**). Ova činjenica, uz podatak o K_{SV} , može sugerisati kako ova jedinjenja ispoljavaju visoku efikasnost, a nisku toksičnost (**34 (ZSML08)**: 0,35-1,20 μM vs. $LC_{50(34 (ZSML08))} = 18,9 \mu\text{M}$ i **11 (ZS48)**: 0,46-1,03 μM vs. $LC_{50(11 (ZS48))} = 72,1 \mu\text{M}$). Naime, proteini koji su glavni transporteri u plazmi, HSA i AGP, neretko sprečavaju da lekovi dođu do svoje mete vezujući se za jedinjenje isuviše, ili pak nedovoljno, jako. U slučaju **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** konstante vezivanja imaju vrednost koja se empirijski pokazala optimalnom za vezivanje i otpuštanje lekova (K_{SV} između $10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$).^{185,186,187}

Ranije je rečeno da značajan broj terapeutika, odobrenih od strane FDA, koji inhibiraju virus ebole, poseduje CAD strukturu i ispoljava EC_{50} približnog reda veličine 10 μM .^{131,133,135,136,188,189,190} Jedinjenja iz ove teze, iako poseduju CAD strukturalni motiv, značajno su potentnija, pokazujući da mogu efektivno da inhibiraju 50% infekcije pri koncentracijama za red ili za gotovo dva reda veličine nižim od dosada poznatih jedinjenja. Kinetika njihovog ulaska u ćeliju i jače zadržavanje u lizozomima, što može biti posledica specifične strukture i pKa profila, verovatno igra važnu ulogu. Naime, diazahrizenski derivati poseduju nisko, delokalizovano naelektrisanje na fiziološkom pH, što može omogućiti lakši transport kroz membrane, da bi u kiselim odeljcima postajali izrazito pozitivno naelektrisani. Dobra permeabilnost na fiziološkom pH koji **34 (ZSML08)** pokazuje u MDCK esaju ide ovome u prilog.

Tradicionalno, smatralo se da amodiakin i hlorokin remete funkciju lizozoma povisujući pH lumena.¹⁹¹ Lizozomi vrše degradaciju ćelijskog i vanćelijskog materijala, bilo putem fagocitoze, endocitoze ili autofagije. Optimalan pH za funkcionisanje različitih lizozomskih lipaza, nukleaza, proteaza, fosfataza i sl. jeste približno 4,5-5,0. Hidrolitička aktivnost se može zaustaviti ukoliko dođe do alkalizacije, ili ma kakvog porasta pH u lumenu, što dalje dovodi do akumulacije raznolikog materijala u lizozomima. Ogledi izvedeni u ovoj tezi pokazali su da jedinjenja **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)**, kao i kontrolni hlorokin i amodiakin, nisu uzročnici alkalizacije lizozoma,

što se može zaključiti iz fluorescentnih spektara LysoSensor DND 189 reagensa i akridin-oranža. Pre par godina jedna studija takođe je pokazala da iako hlorokin možda dovodi do porasta pH u lumenu lizozoma, ova promena je kratkotrajna (oko 30 min) i posle 2-4 h stanje se vraća u normalu.¹⁹² I drugi pokazatelji ukazuju da prilikom duže inkubacije ćelija sa lizozomotrofima neće doći do alkalizacije u lizozomima.¹⁹³ Podaci iz ove teze ukazuju, takođe, da promena pH nije način na koji diazahrizenski derivati inhibiraju virus ebole.

Svakako je najupečatljivije zapažanje rapidno uvećanje lizozoma uzrokovano prisustvom jedinjenja **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)**. Do uvećanja dolazi za manje od sat vremena od trenutka dodatka jedinjenja u niskoj koncentraciji od 1 μ M. I drugi lizozomotrofi mogu dovesti do ove pojave, ali mnogo sporije i pri koncentraciji višoj za dva reda veličine (na primer hlorokin). Nedavno se pokazalo da lizozomotrofi indukuju ekspanziju lizozoma putem aktivacije mreže za koordinovano poboljšanje i regulaciju lizozoma (coordinated lysosomal enhancement and regulation; CLEAR), koja kontroliše ekspresiju više gena značajnih za funkcionisanje lizozoma.¹⁹² Akumulacija jedinjenja unutar lizozoma okidač je za program “lizozomskog stresa” što dalje za posledicu ima mnogobrojne druge ćelijske procese, od navedene aktivacije CLEAR mreže i poremećene kalcijumske signalizacije, do translokacije transkripcionih faktora, poput TFEB i TFE3, u jedro.

Činjenica da su jedinjenja **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** indukovala rapidno uvećanje lizozoma, ne mora nužno da znači da jedinjenja aktiviraju lizozomsku funkciju. Druga slična lizozomotrofna jedinjenja, kao što je poznato, izazivaju nešto drugo – defekte u hidrolitičkoj funkciji, što je očito slučaj i sa diazahrizenima.¹⁹² Elektronska mikroskopija koja je u toku ovog rada primenjivana pokazala je da ovi derivati dovode do akumulacije različitog nedigestovanog materijala u lizozomima, poput agregata različitih membrana, vezikula i lipida. Međutim, nasuprot drugim lizozomotrofnim jedinjenjima, **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** veoma brzo inaktiviraju katepsine. Kao što je ranije naglašeno, iako su starija istraživanja ukazivala da hlorokin i amodiakin inhibiraju katepsine povisujući pH, podaci dobijeni u okviru ovog rada, kao i oni objavljeni drugde,¹⁹² ukazuju da aktivnost katepsina u lizozomima može zapravo porasti i to kao posledica adaptiranja lizozoma na stres usled delovanja **AQ** i **CQ**.

Možda je upravo inhibicija katepsina i hidrolitičkih procesa uopšteno rečeno, u kombinaciji sa ekspanzijom lizozomskih odeljaka, upravo ono što izdvaja diazahrizenske derivate u odnosu na druge lizozomotrofe.

Jedinjenja **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** sprečavaju ulazak virusa ebole u ćeliju onda kada su prisutni u toj sredini pre ili u trenutku pojave virusa. Mikroskopija je pokazala, saglasno sa ranijim opservacijama drugih naučnika o CAD jedinjenjima, da diazahrizenski derivati ne sprečavaju endocitozu virusa, već upravo kasne faze ulaska virusa u ćeliju, odnosno fuziju membrana virusa i domaćina. Poremećaji koje **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** uzrokuju u ovom putu mogli bi imati veze sa sprečavanjem proteolitičke funkcije katepsina ili pak sa ometenim transportom viriona do LE/Ly odeljaka koji sadrže NPC1. Fuzija kasnih endozoma koji sadrže NPC1 sa lizozomima bitna je za generisanje GP virusa kompetentnog za fuziju. Ranije je pokazano da razni faktori unutar domaćina koji regulišu fuziju LE i Ly utiču na infekciju virusom ebole, poput Rabs-a, SNARE proteina, HOPS-kompleksa i jona kalcijuma.^{40,194} Isti ovi faktori regulišu fuziju lizozoma i autofagozoma.¹⁹⁵ U toku izrade ove disertacije pokazano je da diazahrizeni onemogućuju fuziju između LE/Ly i autofagozoma. Očito ova jedinjenja sprečavaju da dođe do infekcije tako što sputavaju transport glikoproteina virusa ebole do odgovarajućih LE/Ly odeljaka ili tako što sprečavaju nastanak GP osposoljenog za fuziju.

Poznato je da prilikom hronične upotrebe jedinjenja tipa CAD indukuju fosfolipidozu pri koncentracijama koje su terapijski relevantne.^{190,196} Ovakav fenomen sličan je onome što se dešava kao posledica NPC oboljenja, kada dolazi do akumulacije lipidnih čestica unutar ćelijskih vezikula usled poremećaja mehanizma skladištenja lipida. Međutim, kada je reč o tretmanu oboljenja izazvanog virusom ebole, potencijani benefiti mogli bi prevazilaziti eventualne neželjene efekte. Nagomilavanje lipidnih čestica je reverzibilno, prestaje kada prestane primena CAD jedinjenja i ne zahteva kliničko lečenje, a upravo deluje da bi tretman oboljenja izazvanog ebolom bio relativno kratkog trajanja – od nekoliko nedelja do par meseci.

U ovoj disertaciji pokazali smo da naša jedinjenja **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** sprečavaju normalno funkcionisanje kasnih endozoma i lizozoma, čime sprečavaju transfer virusa u citosol. Virus ostaje zarobljen u kiselim odeljcima ćelije. Međutim, u

poređenju sa tipičnim predstavnicima jedinjenja tipa CAD (amodiakinom i hlorokinom) koji su obrađivani u više publikacija, diazahrizeni brže penetriraju lizosome, uvećavaju ih, ujedno inhibirajući aktivnost katepsina B i L i ne dovodeći do alkalizacije lumena kasnih endozoma/lizozoma. Ova disertacija pokazala je da postoji značajan potencijal za dalje razvijanje struktura tipa **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** u potrazi za lekom protiv filovirusa.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Hemijska sinteza i spektralni podaci

Tačke topljenja određivane su na aparatu Boetius PMHN i nisu korigovane. Infracrveni spektri snimani su na Thermo-Scientific Nicolet 6700 FT-IR Diamond Crystal spektrofotometru. Položaji apsorpcionih traka izraženi su u cm^{-1} . Oznake intenziteta apsorpcionih traka u IR spektrima su: j - jaka, sr - srednja, sl - slaba. ^1H NMR i ^{13}C NMR spektri snimani su na Bruker Ultrashield Advanced III spektrometru na 500 i 125 MHz u navedenom rastvaraču, a kao inertni standard korišćen je TMS. Hemijska pomeranja izražena su u ppm, konstante kuplovanja (J) u Hz, multiplicitet signala označen je kao s (singlet), ps (proširen singlet), d (dublet), dd (dvostruki dublet), t (triplet), m (multiplet). ESI MS spektri snimani su na Agilent Technologies 6210 Time-Of-Flight LC/MS instrumentu u pozitivnom jon-modu sa $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 1/1$ sa 0,2% HCOOH kao nosećim rastvaračem uzorka. Uzorci su rastvarani u čistom CH_3CN , CH_3OH ili H_2O (HPLC čistoće). Za reakcije katalizovane mikrotalasima korišćen je *Biotage Initiator 2.5* uređaj i odgovarajuće mikrotasne kivete. Za tankoslojnu hromatografiju korišćene su ploče SiO_2 i RP-18 (Merck). Za dry-flash hromatografiju korišćen je SiO_2 .

Čistoća jedinjenja određivana je HPLC metodom pomoću Waters 1525 HPLC dual pump uređaja, opremljenog Alltech Select degasirajućim sistemom i dvostrukim λ 2487 UV-VIS detektorom, i Agilent 1200 HPLC sistemom opremljenim Quat pumpom (G1311B), injektorom (G1329B) 1260 ALS, TCC 1260 (G1316A) i detektorom 1260 DAD VL+ (G1315C). HPLC analiza izvršena pomoću osam metode:

Metod A: Oktadecil silika-gel korišćen je kao stacionarna faza (Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 \times 150mm, 1,8 μ , S.N. USWKY01594). Jedinjenja su rastvorena u vodi. Finalne koncentracije bile su ~ 1 mg/mL, a injekcione zapremine bile su 2,5 μL za jedinjenja **12** i **17**, 3,0 μL za jedinjenja **34** (**ZSML08**) i **39**, 4,0 μL za jedinjenja **20**, **21**,

22 i 40, a 5 μL za jedinjenja **13 (ZS64)**, **14, 15, 16 (ZS67)**, **18 i 19 (ZS62)**. Eluent: 0,2% mravlja kiselina u vodi (A) i metanol (B). Talasna dužina: 254 nm.

Metod B: Oktadecil silika-gel korišćen je kao stacionarna faza (Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 \times 150mm, 1,8 μ , S.N. USWKY01594). Jedinjenja su rastvorena u vodi. Finalne koncentracije bile su \sim 1 mg/mL, a injekcione zapremine bile su 2,5 μL za jedinjenja **12 i 17**, 3,0 μL za jedinjenja **34 (ZSML08)** i **39**, 4,0 μL za jedinjenja **20, 21, 22 i 40**, a 5 μL za jedinjenja **13 (ZS64)**, **14, 15, 16 (ZS67)**, **18 i 19 (ZS62)**. Eluent: 0,2% mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Talasna dužina: 254 nm.

Metod C: Oktadecil silika-gel korišćen je kao stacionarna faza (Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 \times 150mm, 1,8 μ , S.N. USWKY01594). Jedinjenja su rastvorena u metanolu. Finalne koncentracije bile su \sim 1 mg/mL, a injekcione zapremine bile su 0,5 μL za jedinjenja **51, 52 i 56**, 1 μL za jedinjenja **35 (ZS103)** i **38**, 2 μL za jedinjenja **50, 54 i 55 (ZS102)** i 3 μL za jedinjenja **36, 37, 53 i 57**. Eluent: voda (A) i metanol (B). Talasna dužina: 239 nm (**35 (ZS103)**, **54, 56**), 253 nm (**38, 50, 51, 52**), 328 nm (**55 (ZS102)**), 338 nm (**53**), 341 nm (**36, 37, 57**).

Metod D: Oktadecil silika-gel korišćen je kao stacionarna faza (Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 \times 150mm, 1,8 μ , S.N. USWKY01594). Jedinjenja su rastvorena u metanolu. Finalne koncentracije bile su \sim 1 mg/mL, a injekcione zapremine bile su 0,5 μL za jedinjenja **35 (ZS103)**, **38, 51, 52, 55 (ZS102)** i **56** i 1 μL za jedinjenja **36, 37, 50, 53, 54 i 57**. Eluent: voda (A) i acetonitril (B). Talasna dužina: 239 nm (**35 (ZS103)**, **38, 50, 51, 52, 54, 55 (ZS102)** i **56**), 338 nm (**53**), 341 nm (**36, 37, 57**).

Metod E: Oktadecil silika-gel korišćen je kao stacionarna faza (Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 \times 150mm, 1,8 μ , S.N. USWKY01594). Jedinjenja su rastvorena u metanolu. Finalne koncentracije bile su \sim 1 mg/mL, a injekciona zapremina bila je 1,0 μL za jedinjenja **32 i 33**. Eluent: voda (A) i metanol (B). Talasna dužina: 254 nm.

Metod F: Oktadecil silika-gel korišćen je kao stacionarna faza (Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 \times 150mm, 1,8 μ , S.N. USWKY01594). Jedinjenja su rastvorena u metanolu. Finalne koncentracije bile su \sim 1 mg/mL, a injekciona zapremina bila je 1,0 μL za jedinjenja **32 i 33**. Eluent: voda (A) i acetonitril (B). Talasna dužina: 254 nm.

Metod G: Oktadecil silika-gel korišćen je kao stacionarna faza (Symmetry C18 analitička kolona, 4,6 mm × 150 mm, 5 μm, serijski broj 021336278136 37). Jedinjenja su rastvorena u vodi. Finalne koncentracije bile su 0,1 – 0,5 mg/mL, a injekciona zapremina bila je 10 μL za jedinjenje **11 (ZS48)**. Eluent: 0,2% mravlja kiselina u vodi (A) i metanol (B). Talasna dužina: 254 nm.

Metod H: Oktadecil silika-gel korišćen je kao stacionarna faza (Nucleosil C18 analitička kolona, 4 mm × 150 mm, 5 μm). Jedinjenja su rastvorena u vodi. Finalne koncentracije bile su 0,1 – 0,5 mg/mL, a injekciona zapremina bila je 10 μL za jedinjenje **11 (ZS48)**. Eluent: 0,2% mravlja kiselina u vodi (A) i metanol (B). Talasna dužina: 254 nm.

Čistoća svih jedinjenja bila je > 95%.

Opisi opštih postupaka

A: opšti postupak za sintezu 1,7-bis(alkilamino)-4,10-diazahrizena.

Jedinjenje **9** i višak odgovarajućeg amina (broj molova naveden je kod svakog jedinjenja) se rastvore u NMP u mikrotalasnoj kivetu, u atmosferi argona. Reakciona smeša se podvrgne mikrotalasnom zračenju u *Biotage Initiator 2.5* uređaju na 180 °C tokom 6 h. Nakon što se ohladi na sobnu temperaturu, smeša se izlije na led-vodu. Dobijeni proizvod se procedi, ispere vodom i suši pod sniženim pritiskom.

B: opšti postupak za sintezu 1,7-bis(alkilamino)-4,10-diazahrizen hidrohlorida.

Odgovarajući bazni oblik jedinjenja se rastvori u 40% HCl u suvom MeOH, pa se potom rastvarač ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak suspenduje se u EtOH, posle čega se EtOH ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom.

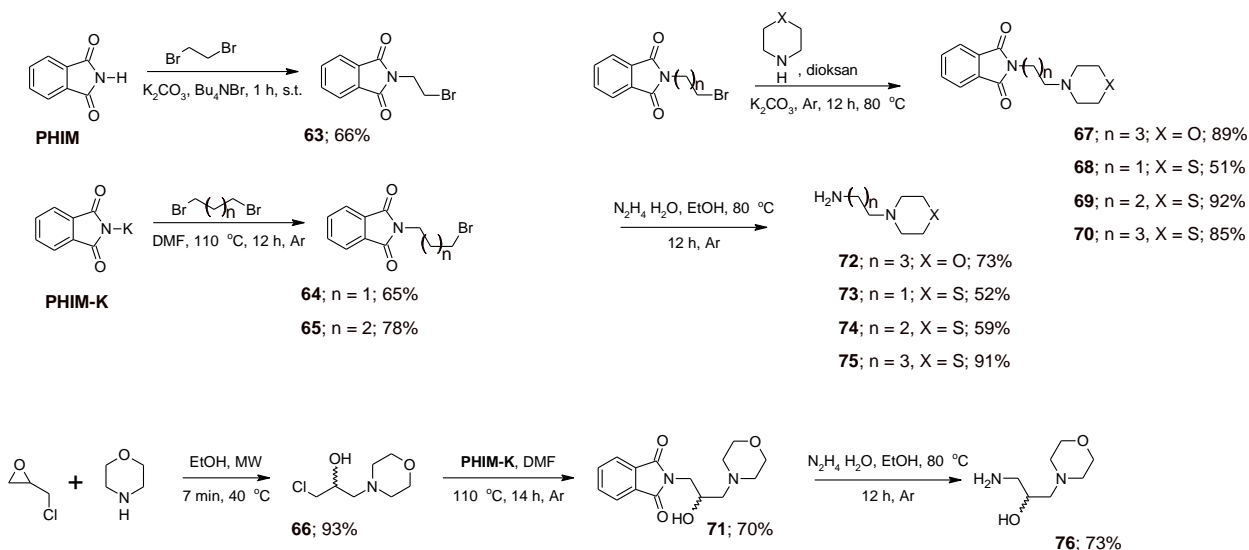
Suspendovanje u EtOH i uklanjanje EtOH se ponovi još dva puta. Na kraju, proizvod se osuši dužim sušenjem na sniženom pritisku.

C: opšti postupak za sintezu alkilaminonaftiridina.

Odgovarajući hlornaftiridin **45** ili **42** i višak odgovarajućeg amina (broj molova naveden je kod svakog jedinjenja) se rastvore u NMP u mikrotalasnoj kivetici, u atmosferi argona. Reakciona smeša se podvrgne mikrotalasnom zračenju u *Biotage Initiator 2.5* uređaju na 180 °C tokom 2 h. Višak amina i NMP se udalje destilacijom pod sniženim pritiskom u Kugelrohr uređaju. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent DCM 100%, DCM/MeOH, gradijent 9:1 → 1:9, MeOH 100%, MeOH/NH₃ gradijent 99:1 → 8:2), ukoliko nije naznačeno drugačije.

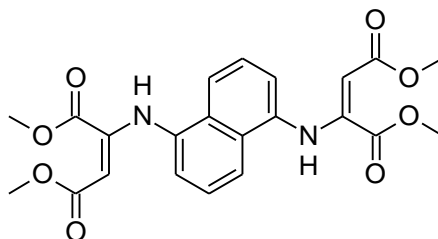
D: opšti postupak za sintezu α,ω -diaminoalkana

Smeša odgovarajućeg *N*-(ω -aminoalkil)ftalimida i višak hidrazin-hidrata u etanolu se meša na 85 °C u toku 12 h, u atmosferi argona. Smeša se ohladi do sobne temperature, pa se doda koncentrovana hlorovodonična kiselina (približno 1,5 - 2 mL na 100 mg of hidrazin-hidrata). Izdvojeni precipitat se procedi i ispere 95% etanolom. Filtrat se svede na minimalnu zapreminu destilacijom pod sniženim pritiskom, pa se viskozni ostatak suspenduje u 50% vodenom rastvoru kalijum-hidroksida. Sirovi proizvod se ekstrahuje metilen-hloridom (dva puta) i dietil-etrom (dva puta). Kombinovani organski slojevi se suše iznad anhidrovanog natrijum-sulfata, a posle uklanjanja sušila rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Preostali sirovi diamin se prečisti destilacijom na kratkom putu u Kugelrohr uređaju. Shema 20 prikazuje sintezu amina.



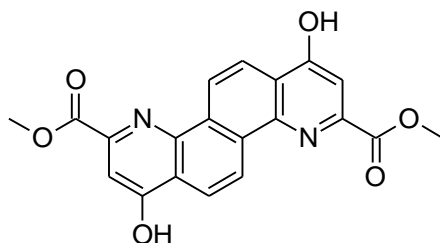
Shema 20. Prikaz sinteze α,ω -diaminoalkana.

Tetrametil-(2E,2'E)-2,2'-(naftalen-1,5-diildiimino)bisbut-2-endioat (5).



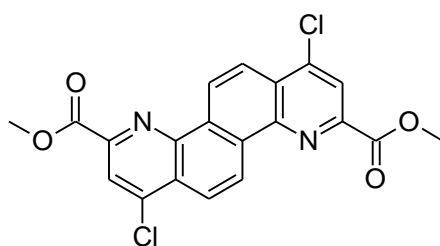
1,5-Diaminonaftalen (2,50 g, 15,8 mmol) se rastvori u suvom metanolu (40 mL). Ukupavanjem se doda dimetil-acetilendikarboksilat (4,50 mL, 5,22 g, 36,7 mmol). Posle 6 sati reakciona smeša se procedi kroz Büchner-ov levak, pa se izdvojeni talog ispere metanolom. Proizvod se suši pod sniženim pritiskom, u mraku. Prinos: 6,60 g, 94%. **5**: žuti prah, t.t. 190 - 192 °C. IR (ATR): 3241 sr, 3123 sl, 3070 sl, 3009 sl, 2957 sl, 1740 j, 1666 j, 1610 j, 1515 sl, 1440 sr, 1409 sl, 1330 sl, 1268 j, 1230 j, 1140 sr, 1026 sr, 994 sl, 822 sl, 790 sr, 648 sl. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 10,06 (s, 2H-N, izmenljiv sa D_2O), 7,95 (d, J = 8,4, 2H), 7,42 (t, J = 7,9, 2H), 6,97 (d, J = 7,4, 2H), 5,55 (s, 2H), 3,78 (s, 6H), 3,60 (s, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 170,24, 164,69, 149,08, 137,07, 128,74, 125,92, 119,24, 118,64, 94,44, 52,73, 51,32. HRMS: m/z 885,28037 odgovara molekulskoj formuli $[2(\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8)+\text{H}]^+$ (greška u ppm +0,63).

Dimetil-1,7-dihidroksihinolino[8,7-*h*]hinolin-3,9-dikarboksilat (6).



U ključali difenil-etar (40 mL) se doda usitnjeni **6**. Reakciona smeša se, posle 5 minuta zagrevanja na otvorenom plamenu, ostavi da se ohladi do sobne temperature. Izdvojeni talog se procedi na Büchner-ovom levku i ispere acetonom. Proizvod se suši pod sniženim pritiskom. Prinos: 4,22 g, 76%. **6**: tamnožuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3402 sr, 2956 sl, 2896 sl, 2375 sl, 2221 sl, 2141 sl, 1721 j, 1619 sr, 1593 sr, 1524 j, 1468 sr, 1447 sr, 1397 sr, 1374 j, 1286 sr, 1260 j, 1235 sr, 1221 sr, 1156 sl, 1113 sl, 1010 sr, 927 sl, 868 sl, 800 sl, 784 sl, 745 sl, 628 sl, 537 sl. ¹H NMR (500 MHz, TFA): 9,42 (d, J = 9,4, 2H), 9,08 (d, J = 9,3, 2H), 8,43 (s, 2H), 4,43 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, TFA): 175,27, 162,34, 144,08, 139,55, 128,72, 125,60, 125,19, 124,71, 111,65, 57,63 ppm. HRMS: *m/z*. 379,09209 odgovara molekulskoj formuli C₂₀H₁₄N₂O₆H⁺ (greška u ppm -0,99).

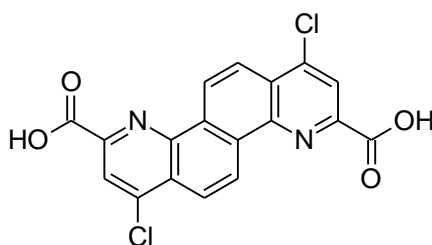
Dimetil-1,7-dihlorhinolino[8,7-*h*]hinolin-3,9-dikarboksilat (7).



Jedinjenje **6** (2,00 g, 5,29 mmol) i POCl₃ (32,0 mL, 53,6 g, 350 mmol) pomešaju se u balonu okruglog dna i smeša se refluktuje 6 sati na temperaturi uljanog kupatila od 90 °C, a potom 14 sati na 120 °C. Posle hlađenja do sobne temperature, reakciona smeša se izlije u suvi metanol (400 mL) temperature ~ 5 °C. Izdvojeni talog se procedi na

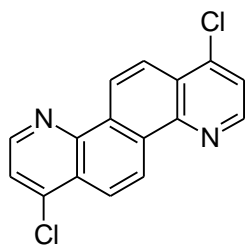
Büchner-ovom levku i ispere metanolom do neutralne pH vrednosti. Proizvod se suši pod sniženim pritiskom. Prinos: 2,18 g, 99%. **7**: svetlosmeđ prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3102 sr, 3058 sl, 3007 sl, 2956 sl, 2854 sl, 1723 j, 1582 sr, 1482 sl, 1448 sr, 1406 sl, 1365 sl, 1330 j, 1282 sr, 1245 sr, 1204 sr, 1138 sr, 1080 sl, 1007 sl, 959 sl, 918 sl, 874 sl, 836 sl, 787 sl, 752 sl, 589 sl. ¹H NMR (500 MHz, TFA): 9,73 (d, J = 9,4, 2H), 8,88 (d, J = 9,3, 2H), 8,77 (s, 2H), 4,23 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, TFA): 165,38, 155,68, 145,03, 142,91, 132,58, 132,11, 129,09, 126,93, 126,75, 57,30.

1,7-Dihlorhinolino[8,7-*h*]hinolin-3,9-dikarboksilna kiselina (8).



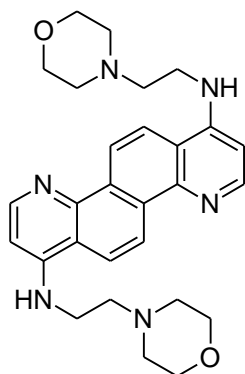
Jedinjenje **7** (500 mg, 1,20 mmol) se suspenduje u rastvoru NaOH (192 mg, 4,81 mmol) u vodi (20 mL). Reakciona smeša se refluktuje 24 sata na temperaturi uljanog kupatila od 110 °C. Posle hlađenja do sobne temperature izdvojeni talog se procedi na Büchner-ovom levku i ispere vodom. Talog se suspenduje u koncentrovanoj HCl (20 mL) uz pomoć ultrazvučnog kupatila, pa se suspenzija meša 24 sata na sobnoj temperaturi. Proizvod se procedi na Büchner-ovom levku, ispere vodom do neutralnog pH filtrata i suši pod sniženim pritiskom. Prinos: 371,8 mg, 80%. **8**: bež prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3437 sl, 3100 sr, 2886 sl, 2602 sl, 2484 sl, 2359 sl, 1723 j, 1624 sr, 1582 j, 1478 sr, 1417 sr, 1377 sr, 1359 sr, 1287 sl, 1251 sr, 1222 sr, 1184 sl, 1156 sl, 1081 sl, 995 sl, 885 sl, 836 sr, 787 sl, 754 sr. ¹H NMR (500 MHz, TFA): 9,78 (d, J = 9,3, 2H), 8,97 (d, J = 9,3, 2H), 8,92 (s, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, TFA): 166,35, 155,47, 144,84, 142,84, 132,62, 132,00, 128,92, 126,81, 126,59. Mikroanaliza za (C₁₈H₈Cl₂N₂O₄): izračunato C 55,84, H 2,08, N 7,24; nađeno C 55,78, H 2,01, N 7,23.

1,7-Dihlorhinolino[8,7-*h*]hinolin (9).



U ključali difenil-etar (10,0 mL) se doda usitnjeni **8** (330 mg, 0,852 mmol). Posle 10 minuta reakciona smeša se ostavi da se ohladi do sobne temperature. Izdvojeni talog se procedi na Hirschovom levku i ispere acetonom. Proizvod se suši pod sniženim pritiskom. Prinos: 238,5 mg, 94%. **9**: bež prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3064 sl, 1578 j, 1496 sl, 1466 sl, 1412 sr, 1361 sl, 1332 sl, 1278 sl, 1235 sl, 1192 sl, 1117 sl, 1068 sl, 925 sl, 836 j, 784 j, 756 sr, 632 sl, 580 sl. ¹H NMR (500 MHz, TFA): 9,46 (d, J = 9,4, 2H), 9,36 (d, J = 6,2, 2H), 9,02 (d, J = 9,4, 2H), 8,50 (d, J = 6,2, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, TFA): 160,12, 146,80, 138,40, 131,46, 128,81, 128,28, 127,87, 126,95. HRMS: *m/z* 299,01260 odgovara molekulskej formuli C₁₆H₈Cl₂N₂H⁺ (greška u ppm -3,78).

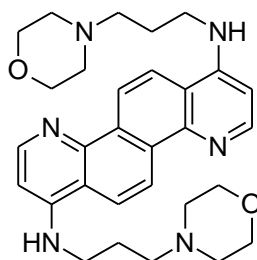
***N,N'*-bis[2-(morfolin-4-il)etil]hinolino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (**10**).**



Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku A, koristeći **9** (35,4 mg, 0,118 mmol), 2-(morfolin-4-il)etanamin (160 mg, 1,23 mmol) i NMP (1 mL). Prinos: 50,1 mg, 87%. **10**: svetlosmeđi prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3436 sr, 3413 sl, 2962 sl, 2855 sr, 2813 sr, 1594 j, 1534 j, 1505 sl, 1456 sr, 1332 sl, 1275 sl, 1239 sl, 1178 sl, 1142 sr, 1118 j, 1070 sl, 1030 sl, 952 sl, 911 sl, 862 sl, 822 sl, 763 sl. ¹H NMR (500 MHz, TFA): 8,97 (d, J = 9,4, 2H), 8,68 (d, J = 7,2, 2H), 8,58 (d, J = 9,4, 2H), 7,30 (d, J = 7,2, 2H), 4,40 – 4,35 (m, 8H), 4,11 (t, J = 12,4, 4H), 3,98 – 3,91 (m, 8H), 3,57 – 3,48 (m, 4H). ¹³C

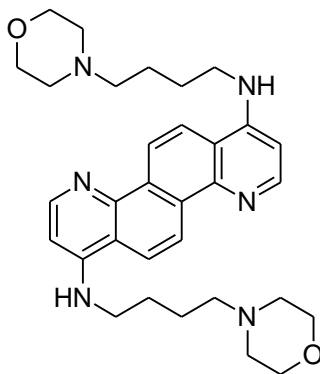
NMR (125 MHz, TFA): 159,11, 144,79, 137,79, 127,84, 123,35, 123,27, 119,30, 103,69, 66,14, 57,79, 55,27, 40,13. HRMS: m/z 487,28029 odgovara molekulknoj formuli $C_{28}H_{34}N_6O_2H^+$ (greška u ppm -2,69).

***N,N'*-bis[3-(morfolin-4-il)propil]hinolino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (23).**



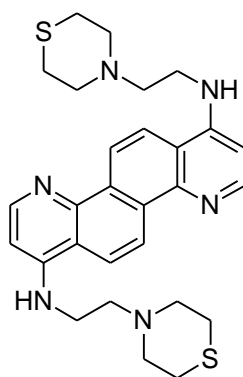
Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku A, koristeći **9** (50,9 mg, 0,170 mmol), 3-(morfolin-4-il)propanamin (283,6 mg, 1,967 mmol) i NMP (2 mL). Prinos: 74,5 mg, 85%. **23**: svetlosmeđi prah, t.t. = 276 - 278 °C. IR (ATR): 3750 sl, 3400 j, 2923 sr, 2852 sl, 1595 j, 1541 sr, 1457 sl, 1431 sl, 1343 sr, 1243 sl, 1113 sr, 1005 sl, 862 sl, 804 sl, 756 sl, 546 sl. 1H NMR (500 MHz, TFA): 8,88 (d, $J = 9,2$, 2H), 8,62 (d, $J = 7,2$, 2H), 8,58 (d, $J = 9,2$, 2H), 7,19 (d, $J = 7,4$, 2H), 4,40 – 4,35 (m, 4H), 4,13 – 4,07 (m, 4H), 3,96 – 3,91 (m, 4H), 3,83 – 3,79 (m, 4H), 3,65 – 3,60 (m, 4H), 3,47 – 3,40 (m, 4H), 2,53 – 2,59 (m, 4H). ^{13}C NMR (125 MHz, TFA): 159,14, 144,33, 137,79, 127,80, 123,31, 122,78, 119,06, 103,29, 66,31, 57,96, 55,08, 43,04, 24,80. HRMS: m/z 515,31223 odgovara molekulknoj formuli $C_{30}H_{38}N_6O_2H^+$ (greška u ppm -1,30).

***N,N'*-bis[4-(morfolin-4-il)butil]hinolino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (24).**



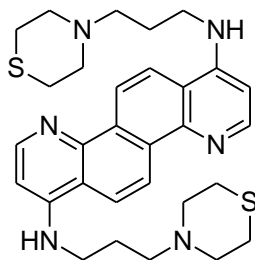
Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku A, koristeći **9** (200,2 mg, 0,6692 mmol), **72** (870 mg, 5,50 mmol) i NMP (4 mL). Prinos: 335,3 mg, 92%. **24**: svetlosmeđi prah, t.t. = 248 - 250 °C. IR (ATR): 3395 sr, 3088 sl, 2950 sr, 2861 sr, 2778 sl, 1596 j, 1540 j, 1473 sl, 1435 sl, 1342 sr, 1308 sl, 1246 sl, 1209 sl, 1147 sl, 1116 sr, 1072 sl, 1022 sl, 972 sl, 923 sl, 847 sr, 826 sl, 763 sl. ¹H NMR (500 MHz, TFA): 8,87 (d, J = 9,4, 2H), 8,60 (d, J = 7,4, 2H), 8,57 (d, J = 9,4, 2H), 7,17 (d, J = 7,4, 2H), 4,41 – 4,37 (m, 4H), 4,15 – 4,09 (m, 4H), 3,90 – 3,85 (m, 4H), 3,82 – 3,78 (m, 4H), 3,49 – 3,38 (m, 8H), 2,21 – 2,06 (m, 8H). ¹³C NMR (125 MHz, TFA): 159,11, 144,08, 137,82, 127,81, 123,25, 122,61, 118,95, 103,26, 66,37, 60,37, 55,06, 45,68, 26,90, 23,63. HRMS: *m/z* 543,34487 odgovara molekulknoj formuli C₃₂H₄₂N₆O₂H⁺ (greška u ppm +1,23).

***N,N'*-bis(2-tiomorfolin-4-ilet)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (**25**).**



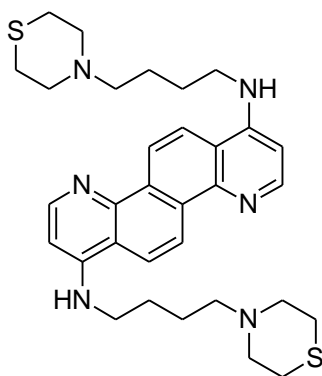
Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku A, koristeći **9** (24,5 mg, 0,0819 mmol), **73** (120,0 mg, 0,8205 mmol) i NMP (1,3 mL). Prinos: 39,2 mg, 92%. **25**: svetlosmeđi prah, t.t. = 270 - 272 °C. IR (ATR): 3403 sr, 2913 sr, 2816 sr, 1594 j, 1533 j, 1459 sr, 1424 sr, 1330 sr, 1285 sl, 1241 sl, 1174 sl, 1123 sl, 1081 sl, 969 sl, 817 sl, 756 sr. ¹H NMR (500 MHz, TFA): 8,94 (d, J = 9,4, 2H), 8,66 (d, J = 7,1, 2H), 8,56 (d, J = 9,4, 2H), 7,27 (d, J = 7,1, 2H), 4,037 – 4,31 (m, 4H), 4,16 – 4,10 (m, 4H), 3,87 – 3,81 (m, 4H), 3,49 – 3,41 (m, 4H), 3,27 – 3,18 (m, 4H), 2,90 – 2,83 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, TFA): 159,10, 144,80, 137,79, 127,84, 123,37, 123,25, 119,30, 103,67, 58,06, 40,25, 26,75. HRMS: *m/z* 519,23577 odgovara molekulknoj formuli C₂₈H₃₄N₆S₂H⁺ (greška u ppm -0,27).

***N,N'*-bis(3-tiomorfolin-4-ilpropil)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (26).**



Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku A, koristeći **9** (51,8 mg, 0,173 mmol), **74** (277,6 mg, 1,732 mmol) i NMP (1,5 mL). Prinos: 79,1 mg, 84%. **26**: svetložuti prah, t.t. = 262 - 264 °C. IR (ATR): 3274 sr, 2917 sr, 2816 sr, 1594 j, 1539 j, 1462 sr, 1428 j, 1340 sr, 1283 sr, 1239 sr, 1172 sl, 1125 sr, 1086 sl, 1037 sl, 951 sl, 871 sl, 816 sr, 755 sr. ¹H NMR (500 MHz, TFA): 8,88 (d, J = 9,4, 2H), 8,61 (d, J = 7,3, 2H), 8,57 (d, J = 9,4, 2H), 7,18 (d, J = 7,3, 2H), 4,06 - 4,00 (m, 4H), 3,94 - 3,87 (m, 4H), 3,59 - 3,52 (m, 4H), 3,41 - 3,33 (m, 4H), 3,27 - 3,18 (m, 4H), 2,91 - 2,83 (m, 4H), 2,58 - 2,49 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, TFA): 159,03, 144,22, 137,67, 127,69, 123,21, 122,67, 118,95, 103,19, 58,21, 57,69, 43,02, 26,82, 24,78. HRMS: *m/z* 547,26705 odgovara molekulskoj formuli C₃₀H₃₈N₆S₂H⁺ (greška u ppm -0,30).

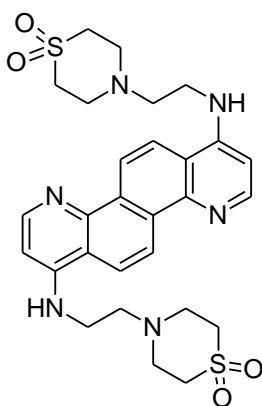
***N,N'*-bis(4-tiomorfolin-4-ilbutil)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (27).**



Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku A, koristeći **9** (83,2 mg, 0,278 mmol), **75** (360 mg, 2,07 mmol) i NMP (2 mL). Prinos: 158,3 mg, 99%. **27**: svetlosmeđi prah, t.t. = 226 - 228 °C. IR (ATR): 3415 sr, 3078 sl, 3018 sl, 2939 sr, 2864 sr, 2806 sr, 1594 j, 1535 j, 1472 sr, 1458 sr, 1425 sr, 1342 j, 1283 sl, 1239 sr, 1206 sl, 1179 sl, 1108 sl,

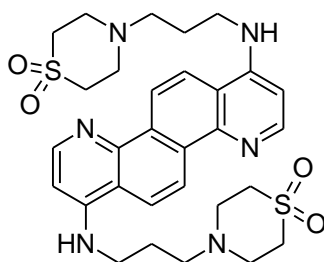
1025 sl, 999 sl, 947 sl, 867 sl, 848 sl, 822 sr, 756 sr, ^1H NMR (500 MHz, TFA): 8,89 (d, $J = 9,4$, 2H), 8,62 (d, $J = 7,1$, 2H), 8,60 (d, $J = 9,4$, 2H), 7,19 (d, $J = 7,3$, 2H), 4,07 – 4,01 (m, 4H), 3,92 – 2,86 (m, 4H), 3,46 – 3,35 (m, 8H), 3,31 – 3,22 (m, 4H), 2,95 – 2,88 (m, 4H), 2,22 – 2,06 (m, 8H). ^{13}C NMR (125 MHz, TFA): 159,08, 144,04, 137,78, 127,77, 123,21, 122,58, 118,91, 103,22, 60,71, 57,71, 45,65, 26,95, 23,67. HRMS: m/z 575,29796 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{S}_2\text{H}^+$ (greška u ppm -0,96).

***N,N'*-bis[2-(1,1-dioksidotiomorfolin-4-il)etil]hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (28).**



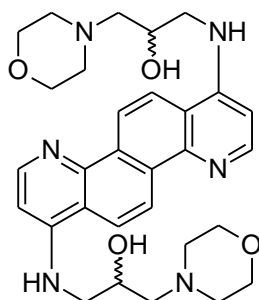
Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku A, koristeći **9** (17,8 mg, 0,0595 mmol), 2-(1,1-dioksidotiomorfolin-4-il)etanamin (106,6 mg, 0,5980 mmol) i NMP (1,2 mL). Prinos: 48,0 mg, 98%. **28**: svetlosmeđi prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3408 sr, 2899 sl, 2828 sl, 1665 sl, 1594 j, 1541 sr, 1465 sl, 1429 sl, 1389 sl, 1336 sr, 1293 sr, 1193 sl, 1127 j, 1046 sl, 989 sl, 954 sl, 861 sl, 821 sl, 759 sl. ^1H NMR (500 MHz, TFA): 9,00 (d, $J = 9,4$, 2H), 8,71 (d, $J = 7$, 2H), 8,63 (d, $J = 9,2$, 2H), 7,34 (d, $J = 7,2$, 2H), 4,48 - 4,39 (m, 4H), 4,39 - 4,20 (m, 8H), 4,17 - 4,08 (m, 4H), 4,05 - 3,67 (m, 8H). ^{13}C NMR (125 MHz, TFA): 159,13, 144,85, 137,83, 127,88, 123,41, 123,35, 119,38, 103,78, 57,63, 54,61, 50,22, 40,81. HRMS: m/z 583,21510 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2\text{H}^+$ (greška u ppm -0,81).

***N,N'*-bis[3-(1,1-dioksidotiomorfolin-4-il)propil]hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (29).**



Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku A, koristeći **9** (20,3 mg, 0,0679 mmol), 3-(1,1-dioksidotiomorfolin-4-il)propan-1-amin (130,3 mg, 0,6777 mmol) i NMP (1,5 mL). Prinos: 40,6 mg, 98%. **29**: svetlosmeđi prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3641 sl, 3590 sl, 3393 sr, 3093 sl, 2942 sl, 2830 sl, 1596 j, 1539 j, 1474 sl, 1432 sl, 1390 sl, 1347 j, 1290 sr, 1241 sl, 1190 sl, 1130 j, 1047 sl, 991 sl, 946 sl, 852 sl, 800 sl, 765 sl, 716 sl, 671 sl, 554 sl. ¹H NMR (500 MHz, TFA): 9,05 (d, J = 9,4, 2H), 8,77 (d, J = 7,1, 2H), 8,75 (d, J = 9,4, 2H), 7,35 (d, J = 7,4, 2H), 4,52 - 4,43 (m, 4H), 4,25 - 4,13 (m, 8H), 4,12 - 4,05 (m, 4H), 3,98 - 3,89 (m, 4H), 3,83 - 3,74 (m, 4H), 2,80 - 2,69 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, TFA): 159,10, 144,30, 137,75, 127,77, 123,27, 122,77, 119,04, 103,23, 57,67, 54,19, 50,34, 42,86, 25,39. HRMS: *m/z* 611,24510 odgovara molekulkovj formuli C₃₀H₃₈N₆O₄S₂H⁺ (greška u ppm -2,90).

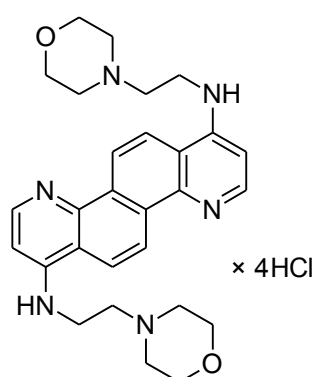
1,1'-[hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diildi(imino)]bis(3-morfolin-4-ilpropan-2-ol) (**30**).



Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku A, koristeći **9** (36,1 mg, 0,121 mmol), **76** (193,1 mg, 1,205 mmol) i NMP (1,5 mL). Prinos: 55,0 mg, 83%. **30**: svetložuti prah, t.t. = 258 - 260 °C. IR (ATR): 3427 j, 2924 sr, 2862 sr, 2821 sr, 1650 sl, 1594 j, 1534 j, 1457 sr, 1430 sl, 1340 sl, 1304 sl, 1239 sl, 1113 j, 1069 sl, 1006 sl, 915 sl, 861w. 803 sl, 754 sl, 634 sl, 542 sl. ¹H NMR (500 MHz, TFA): 8,85 (d, J = 9,4, 2H), 8,57 (d, J = 7,4, 2H), 8,56 (d, J = 9,4, 2H), 7,39 (d, J = 7,4, 2H), 4,93 - 4,87 (m, 2H), 4,38 - 4,31

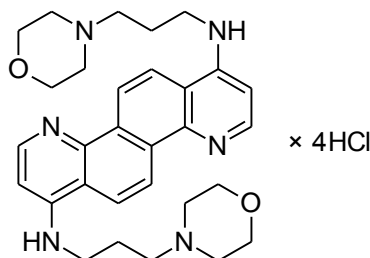
(m, 2H), 4,21 – 4,10 (m, 4H), 4,06 – 4,01 (m, 2H), 3,95 – 3,85 (m, 4H), 3,83 – 3,78 (m, 2H), 3,70 – 3,62 (m, 4H), 3,58 – 3,50 (m, 2H), 3,49 – 3,41 (m, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, TFA): 157,13, 141,77, 135,26, 125,24, 120,81, 120,26, 116,61, 101,34, 63,50, 59,54, 54,18, 51,46, 46,46. HRMS: *m/z* 547,30247 odgovara molekulknoj formuli C₃₀H₃₈N₆O₄H⁺ (greška u ppm -0,48).

***N,N'*-bis[2-(morfolin-4-il)etil]hinolino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidroklorid (11 (ZS48)).**



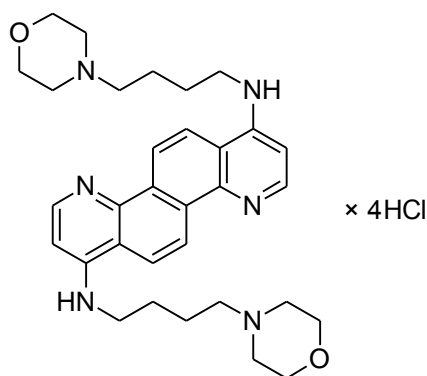
Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku B, koristeći **10** (10,0 mg, 0,021 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 12,7 mg, 98%. **11 (ZS48)**: svetlosmeđi prah, t.t. > 290 °C. IR (ATR): 3383 sr, 3231 sr, 3130 sr, 3047 sr, 2974 sr, 2869 sr, 2671 sr, 2588 sr, 2468 sl, 1627 j, 1578 j, 1498 sr, 1449 sr, 1363 sl, 1334 sl, 1270 sl, 1228 sr, 1198 sl, 1131 sr, 1093 sr, 1032 sl, 1006 sl, 976 sl, 912 sl, 867 sl, 823 sr, 743 sr. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,41 (d, J = 6,4, H-C(3) i H-C(9)), 8,09 (d, J = 9,0, 2H), 8,00 (d, J = 8,7, 2H), 7,14 (d, J = 6,5, 2H), 4,19 (ps, 4H), 4,10 (ps, 8H), 3,76 (ps, 4H), 3,62 (ps, 8H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 155,36, 142,11, 134,09, 123,68, 120,94, 119,36, 115,61, 101,36, 63,70, 54,04, 52,22, 37,57. HRMS: *m/z* 487,28080 odgovara molekulknoj formuli C₂₈H₃₄N₆O₂H⁺ (greška u ppm -1,65). HPLC čistoća: metod G, protokol gradijenta 0 – 2 min 44% A → 42% A, 2 - 6 min 42% → 40% A, 6 - 8 min 40% → 30% A, 8 - 9 min 30% A → 44% A, flow 0,5 mL/min, RT 2,084, površina 96,93%; metod H, protokol gradijenta 0 - 2 min 70% → 68% A, 2 - 6 min 68% → 64% A, 6 - 8 min 64% A, 8 - 10 min 64% → 50% A, 10 - 11 min 50% → 70% A, flow 0,5 mL/min, RT 2,069, površina 96,66%.

***N,N'*-bis[3-(morfolin-4-il)propil]hinolino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidrohlid (12).**



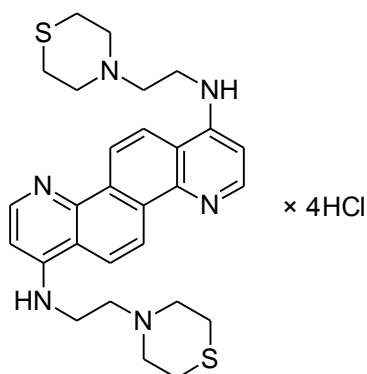
Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku B, koristeći **23** (10,0 mg, 0,021 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 12,6 mg, 98%. **12**: svetložuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3383 j, 3262 j, 3948 sr, 2717 sr, 2483 sl, 1625 j, 1574 sr, 1498 sl, 1442 sr, 1343 sl, 1264 sl, 1226 sl, 1173 sl, 1125 sl, 1099 sl, 1050 sl, 949 sl, 875 sl, 826 sl, 743 sl, 646 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,43 (d, J = 7,1, 2H), 8,19 (ABkv, J_{AB} = 9,3, 4H), 7,12 (d, J = 7,4, 2H), 4,20 – 4,15 (m, 4H), 3,92 – 3,84 (m, 4H), 3,84 – 3,79 (m, 4H), 3,67 – 3,62 (m, 4H), 3,49 – 3,43 (m, 4H), 3,33 – 3,26 (m, 4H), 2,40 – 2,32 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 155,48, 141,55, 134,21, 123,94, 120,68, 119,57, 115,42, 100,81, 63,69, 54,42, 51,78, 40,51, 22,07. HRMS: *m/z* 515,31252 odgovara molekulkovj formuli C₃₀H₃₈N₆O₂H⁺ (greška u ppm -0,73). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 3,518, površina 96,97%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,193, površina 98,82%.

***N,N'*-bis[4-(morfolin-4-il)butil]hinolino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidrohlid (13 (ZS64)).**



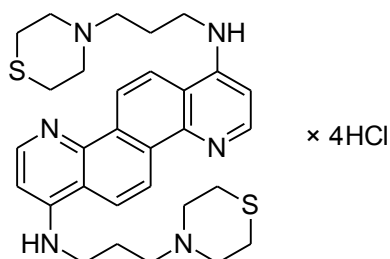
Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku B, koristeći **24** (10,0 mg, 0,018 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 12,6 mg, 99%. **13 (ZS64)**: svetložuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3372 sr, 2945 j, 2610 sr, 2477 sl, 1624 j, 1570 j, 1502 sl, 1441 sr, 1359 sl, 1227 sl, 1105 sl, 969 sl, 905 sl, 870 sl, 824 sl, 747 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,28 (d, J = 7,1, 2H), 7,96 (ABkv, J_{AB} = 9,2, 4H), 7,02 (d, J = 7,4, 2H), 4,22 - 4,18 (m 4H), 3,93 - 3,87 (m, 4H), 3,72 - 3,62 (m, 8H), 3,40 - 3,35 (m, 4H), 3,33 - 3,25 (m, 4H), 2,06 - 1,91 (m, 8H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 156,75, 142,79, 135,33, 125,02, 122,14, 120,80, 116,55, 102,40, 65,35, 58,21, 53,28, 44,73, 26,12, 22,36. HRMS: *m/z* 543,34461 odgovara molekularnoj formuli C₃₂H₄₂N₆O₂H⁺ (greška u ppm +0,76). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,194, površina 95,14%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,165, površina 98,81%.

***N,N'*-bis(2-tiomorfolin-4-iletil)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidrohlorid (14).**



Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku B, koristeći **25** (10,0 mg, 0,019 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 12,6 mg, 98%. **14**: svetložuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3236 sr, 3131 sr, 2961 sr, 2701 sr, 2545 sr, 2364 sr, 1627 j, 1577 j, 1498 sr, 1476 sr, 1446 sr, 1368 sl, 1335 sr, 1296 sl, 1272 sl, 1226 sr, 1156 sl, 1098 sl, 1057 sl, 956 sl, 882 sl, 825 sr, 744 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,09 (ps, 2H), 7,65 (ps, 4H), 6,72 (ps, 2H), 3,87 (ps, 4H), 3,55 (ps, 8H), 3,46 (ps, 4H), 2,99 (ps, 8H). HRMS: *m/z* 519,23514 odgovara molekulskoj formuli C₂₈H₃₄N₆S₂H⁺ (greška u ppm -1,48). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,262, površina 98,07%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,192, površina 97,41%.

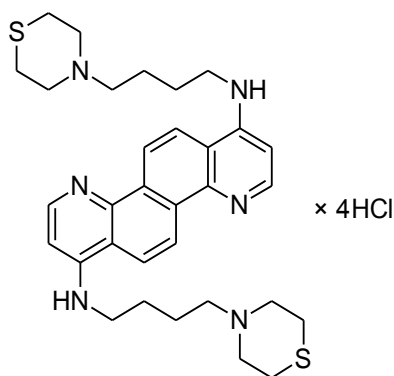
***N,N'*-bis(3-tiomorfolin-4-ilpropil)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidrohlorid (15).**



Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku B, koristeći **26** (10,0 mg, 0,018 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 12,5 mg, 98%. **15**: svetložuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3260 j, 2950 j, 2678 j, 1625 j, 1574 j, 1497 sr, 1441 j, 1341 sr, 1269 sl, 1224 sr, 1157 sl, 1107 sl, 921 sl, 826 sr, 743 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,41 (d, J = 6,8, 2H), 8,14 (ABkv, J_{AB} = 9,2, 4H), 7,10 (d, J = 7,1, 2H), 3,98 – 3,87 (m, 4H), 3,82 – 3,77 (m, 4H), 3,47 – 3,41 (m, 4H), 3,40 – 3,30 (m, 4H), 3,21 – 3,11 (m, 4H), 3,00 – 2,89 (m, 4H), 2,40 – 2,29 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 157,06, 143,16, 135,78, 125,51, 122,27, 121,14, 117,01, 102,43, 56,44, 55,52, 42,22, 26,06, 23,71. HRMS: *m/z* 547,26672 odgovara molekulskoj formuli C₃₀H₃₈N₆S₂H⁺ (greška u ppm -0,90). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A →

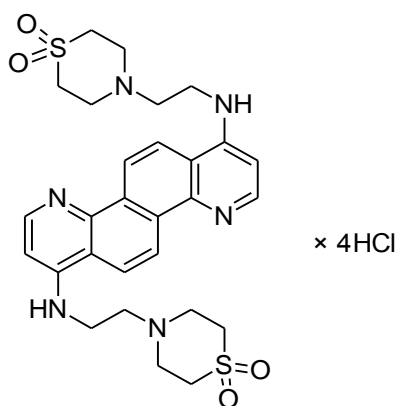
0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 3,345, površina 96,59%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,199, površina 98,24%.

***N,N'*-bis(4-tiomorfolin-4-ilbutil)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidroklorid (16 (ZS67)).**



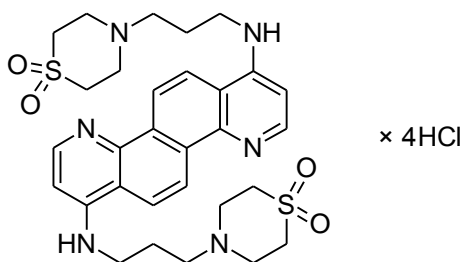
Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku B, koristeći **27** (10,0 mg, 0,017 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 12,4 mg, 99%. **16 (ZS67)**: svetložuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3410 j, 2952 j, 2680 sr, 2577 sr, 1625 j, 1575 sr, 1502 sl, 1442 sl, 1357 sl, 1290 sl, 1270 sl, 1228 sl, 923 sl, 823 sl, 747 sl, 576 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,26 (d, J = 7, 2H), 7,93 (ABkv, J_{AB} = 9,2, 4H), 7,00 (d, J = 7,1, 2H), 3,94 – 3,88 (m, 4H), 3,70 – 3,64 (m, 4H), 3,38 – 3,31 (m, 8H), 3,30 – 3,12 (m, 4H), 2,99 – 2,92 (m, 4H), 2,08 – 1,89 (m, 8H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 156,72, 142,79, 135,32, 125,00, 122,12, 120,78, 116,53, 102,39, 58,56, 55,37, 44,73, 26,20, 26,04, 22,38. HRMS: *m/z* 575,29851 odgovara molekulskoj formuli C₃₂H₄₂N₆S₂H⁺ (greška u ppm -1,61). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 40% A, 3 - 6 min 40% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A, 9 - 10 min 0% A → 40% A, 10 - 11 min 40% A, protok 0,5 mL/min, RT 3,265, površina 96,04%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,195, površina 97,80%.

***N,N'*-bis[2-(1,1-dioksidotiomorfolin-4-il)etil]hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidrochlorid (17).**



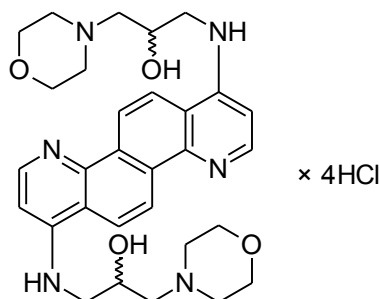
Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku B, koristeći **28** (10,0 mg, 0,017 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 12,2 mg, 98%. **17**: svetložuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3230 sr, 2985 sr, 1620 j, 1570 sr, 1501 sl, 1441 sl, 1347 sl, 1318 sr, 1281 sl, 1227 sl, 1134 sr, 976 sl, 945 sl, 736 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,77 (d, J = 9,3, 2H), 8,65 (d, J = 6,8, 2H), 8,52 (d, J = 9,3, 2H), 7,23 (d, J = 7, 2H), 4,19 – 4,16 (m, 4H), 3,96 – 3,90 (m, 8H), 3,73 – 3,66 (m, 12H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 156,19, 142,05, 135,34, 125,15, 121,04, 120,40, 116,54, 101,03, 53,51, 51,01, 48,01, 38,51. HRMS: *m/z* 583,21541 odgovara molekularnoj formuli C₂₈H₃₄N₆O₄S₂H⁺ (greška u ppm -0,29). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 75% A → 20% A, 3 - 6 min 20% A → 0% A, 6 - 8 min 75% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,525, površina 95,18%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,173, površina 99,05%.

***N,N'*-bis[3-(1,1-dioksidotiomorfolin-4-il)propil]hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidrochlorid (18).**



Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku B, koristeći **29** (10,0 mg, 0,016 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 12,2 mg, 98%. **18**: svetložuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3327 sr, 2965 sr, 1626 j, 1571 sr, 1501 sl, 1471 sl, 1442 sl, 1401 sl, 1347 sl, 1308 sr, 1275 sl, 1228 sl, 1132 sr, 1095 sl, 824 sl, 744 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,47 (d, J = 7, 2H), 8,34 (d, J = 9,3, 2H), 8,24 (d, J = 9,3, 2H), 7,14 (d, J = 7,2, 2H), 4,03 – 3,97 (m, 8H), 3,87 – 3,81 (m, 4H), 3,76 – 3,71 (m, 8H), 3,60 – 3,54 (m, 4H), 2,42 – 2,33 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 155,70, 141,64, 134,50, 124,26, 120,78, 119,77, 115,68, 100,86, 54,06, 50,91, 47,69, 40,45, 22,83. HRMS: *m/z* 611,24668 odgovara molekulknoj formuli C₃₀H₃₈N₆O₄S₂H⁺ (greška u ppm -0,31). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,270, površina 95,95%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,238, površina 95,18%.

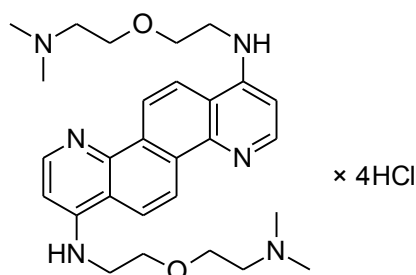
1,1'-[hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diildi(imino)]bis(3-morfolin-4-ilpropan-2-ol) tetrahlorhid (19 (ZS62)).



Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku B, koristeći **30** (10,0 mg, 0,018 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 12,5 mg, 98%. **19 (ZS62)**: svetložuti prah,

t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3233 j, 3128 sr, 3020 sr, 2968 sr, 2836 j, 1623 j, 1580 j, 1500 sr, 1444 sr, 1374 sl, 1346 sl, 1314 sl, 1271 sl, 1228 sl, 1175 sl, 1109 sr, 1048 sl, 972 sl, 870 sl, 821 sl, 800 sl, 747 sl, 650 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,44 (d, J = 7,1, 2H), 8,22 (ABkv, J_{AB} = 9,4, 4H), 7,21 (d, J = 7,4, 2H), 4,66 – 4,61 (m, 2H), 4,25 – 4,10 (m, 4H), 4,00 – 3,80 (m, 8H), 3,75 – 3,65 (m, 4H), 3,62 – 3,57 (m, 2H), 3,54 – 3,30 (m, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 157,77, 143,23, 135,93, 125,64, 122,34, 121,33, 117,12, 102,95, 65,02, 60,77, 54,98, 52,46, 48,45. HRMS: *m/z* 547,30249 odgovara molekulknoj formuli C₃₀H₃₈N₆O₄H⁺ (greška u ppm -0,43). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 3,445, površina 97,64%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,204, površina 98,39%.

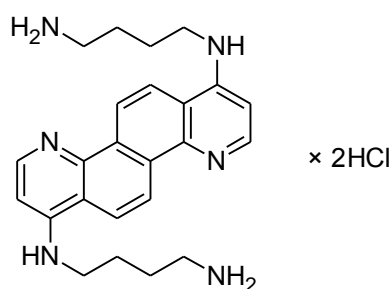
***N,N'*-bis{2-[2-(dimetilamino)etoksi]etil}hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidrochlorid (20).**



Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku B, koristeći **60** (10 mg, 0,020 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 123 mg, 98%. **20**: svetlosivi prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3380 j, 3020 sr, 1621 j, 1573 sr, 1502 sr, 1476 sr, 1440 sr, 1400 sl, 1345 sl, 1314 sl, 1228 sl, 1175 sl, 1122 sr, 990 sl, 929 sl, 826 sl, 748 sl, 568 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,46 (d, J = 7,1, 2H), 8,35 (d, J = 6,2, 2H), 8,25 (d, J = 9,2, 2H), 7,15 (d, J = 7,3, 2H), 4,01 – 3,96 (m, 4H), 3,96 – 3,90 (m, 8H), 3,43 – 3,39 (m, 4H), 2,92 (s, 12H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 155,76, 141,45, 134,42, 124,14, 120,68, 119,72, 115,41, 100,94, 68,07, 64,26, 56,60, 43,17, 42,79. HRMS: *m/z* 491,31200 odgovara molekulknoj formuli C₂₈H₃₈N₆O₂H⁺ (greška u ppm -1,83). HPLC čistoća: metod A,

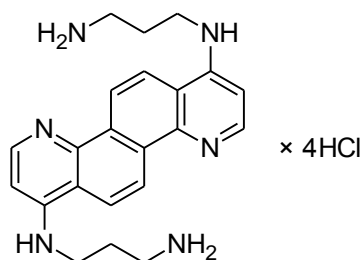
protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 14 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,273, površina 98,88%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 14 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,206, površina 100%.

***N,N'*-bis(4-aminobutil)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin dihidroklorid (21).**



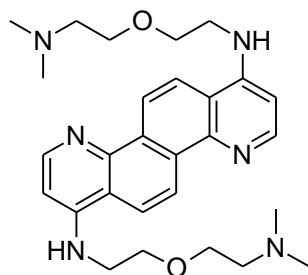
Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku B, koristeći **61** (10 mg, 0,025 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 11 mg, 100%. **21**: žuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3477 j, 3447 j, 3208 j, 3026 j, 1620 j, 1574 j, 1503 sr, 1472 sr, 1446 sr, 1403 sl, 1363 sl, 1320 sl, 1270 sl, 1229 sr, 1159 sl, 1114 sl, 1089 sl, 1036 sl, 1007 sl, 929 sl, 905 sl, 827 sl, 779 sl, 749 sl, 700 sl, 572 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,41 (d, J = 7, 2H), 8,21 (ABkv, J_{AB} = 9,3, 4H), 7,06 (d, J = 7,1, 2H), 3,73 – 3,97 (m, 4H), 3,16 – 3,11 (m, 4H), 1,99 – 1,85 (m, 8H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 155,42, 141,31, 134,30, 124,00, 120,58, 119,49, 115,31, 100,67, 43,06, 39,05, 24,51, 24,27. HRMS: *m/z* 403,25983 odgovara molekularnoj formuli C₂₄H₃₀N₆H⁺ (greška u ppm -1,59). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 14 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,204, površina 99,70%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 14 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,176, površina 99,63%.

***N,N'*-bis(3-aminopropil)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidroklorid (22).**



Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku B, koristeći **62** (10 mg, 0,027 mmol) i 40% HCl u suvom MeOH (1 mL). Prinos: 13,4 mg, 99%. **22**: žuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3394 j, 3209 sr, 2993 j, 1615 j, 1571 j, 1502 sr, 1476 sr, 1441 sr, 1404 sl, 1356 sl, 1317 sl, 1272 sl, 1231 sr, 1161 sl, 1113 sl, 1088 sl, 990 sl, 830 sl, 810 sl, 749 sl, 701 sl, 628 sl, 566 sl, 572 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 8,41 (d, J = 7, 2H), 8,14 (ABkv, J_{AB} = 9,3, 4H), 7,10 (d, J = 7,1, 2H), 3,83 – 3,77 (m, 4H), 3,29 – 3,23 (m, 4H), 2,31 – 2,23 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 155,64, 141,60, 134,45, 124,18, 120,71, 119,72, 115,57, 100,78, 40,68, 37,06, 25,51. HRMS: *m/z* 375,22836 odgovara molekulknoj formuli C₂₂H₂₆N₆H⁺ (greška u ppm -2,18). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A → 0% A, 7 - 9 min 0% A, 9 - 12 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,328, površina 96,26%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 14 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,231, površina 98,47%.

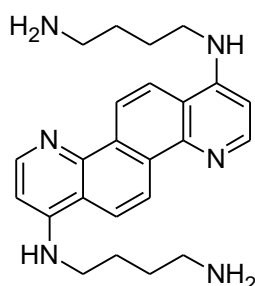
***N,N'*-bis{2-[2-(dimetilamino)etoksi]etil}hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (**60**).**



Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku A, koristeći **9** (50 mg, 0,17 mmol), 2-(2-aminoetoksi)-*N,N*-dimetiletanamin (256 mg, 1,94 mmol) i NMP (1,0 mL). Prinos: 73 mg, 89%. **60**: svetlosmeđ prah, t.t. = 122 °C. IR (ATR): 3381 j, 2954 j, 2864 j, 2824 sr, 2782 sr, 1601 j, 1544 j, 1460 sr, 1361 sl, 1337 sr, 1251 sl, 1180 sl, 1125 sr, 1071 sl,

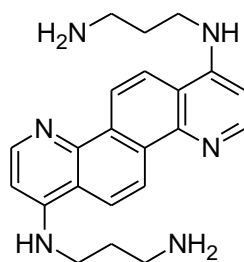
1036 sl, 959 sl, 831 sl, 810 sl, 760 sl. ^1H NMR (500 MHz, TFA): 9,04 (d, $J = 9,4$, 2H), 8,76 (d, $J = 7,3$, 2H), 8,72 (d, $J = 9,4$, 2H), 7,35 (d, $J = 7,4$, 2H), 4,30 – 4,23 (m, 4H), 4,21 – 4,13 (m, 8H), 3,74 – 3,69 (m, 4H), 3,27 (s, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, TFA): 159,33, 144,20, 137,90, 127,90, 123,31, 122,79, 118,99, 103,49, 70,77, 66,41, 60,30, 46,12, 45,80. HRMS: m/z 491,31226 odgovara molekulkovj formuli $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_2\text{H}^+$ (greška u ppm -1,30).

***N,N'*-bis(4-aminobutil)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (61).**



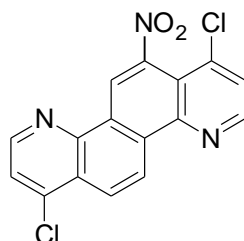
Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku A, koristeći **9** (52 mg, 0,17 mmol), 1,4-diaminobutan (612 mg, 6,94 mmol) i NMP (1,0 mL). Prinos: 50 mg, 72%. **61**: svetlosmeđ prah, t.t. 224 - 226 °C. IR (ATR): 3347 sr, 2925 sr, 2854 sr, 1596 j, 1543 j, 1475 sr, 1433 sr, 1344 sr, 1246 sl, 1180 sl, 1119 sl, 1030 sl, 907 sl, 848 sl, 758 sl, 668 sl. ^1H NMR (500 MHz, TFA): 8,99 (d, $J = 9,4$, 2H), 8,74 – 8,68 (m, 4H), 7,30 (d, $J = 7,3$, 2H), 3,99 (ps, 4H), 3,55 (ps, 4H), 2,25 (ps, 8H). ^{13}C NMR (125 MHz, TFA): 159,11, 144,01, 137,81, 127,80, 123,20, 122,57, 118,92, 103,21, 45,75, 43,15, 26,90, 26,77. HRMS: m/z 403,25996 odgovara molekulkovj formuli $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{H}^+$ (greška u ppm -1,27).

***N,N'*-bis(3-aminopropil)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (62).**



Jedinjenje se sintetise prema opštem postupku A, koristeći **9** (52 mg, 0,17 mmol), 1,3-diaminopropan (513 mg, 6,92 mmol) i NMP (1,0 mL). Prinos: 64 mg, 99%. **62**: svetlosmeđ prah, t.t. 218 - 220 °C. IR (ATR): 3288 j, 2942 j, 2858 sr, 1596 j, 1542 j, 1471 sr, 1433 sr, 1393 sl, 1345 sr, 1245 sl, 1176 sl, 1125 sl, 956 sl, 920 sl, 856 sl, 801 sl, 754 sl, 547 sl. ¹H NMR (500 MHz, TFA + D₂O): 7,24 (d, J = 9,4, 2H), 6,96 – 6,89 (m, 4H), 5,44 (d, J = 7,1, 2H), 2,22 – 2,15 (m, 4H), 1,69 – 1,63 (m, 4H), 0,74 – 0,66 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, TFA + D₂O): 159,83, 145,20, 138,86, 128,82, 124,33, 123,80, 119,88, 103,92, 43,88, 40,73, 28,77. HRMS: *m/z* 375,22917 odgovara molekulskoj formuli C₂₂H₂₆N₆H⁺ (greška u ppm -1,97).

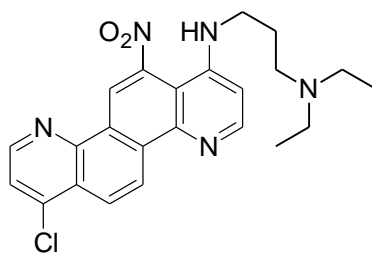
1,7-Dihlor-6-nitrohino[8,7-*h*]hinolin (**31**).



Jedinjenje **9** (305,2 mg, 1,020 mmol) se rastvori u 9 mL koncentrovane sumporne kiseline, prethodno ohlađene na ledenom kupatilu, pa se u kapima doda smeša 9 mL pušljive azotne kiseline i 3 mL koncentrovane sumporne kiseline, prethodno ohlađena na ledenom kupatilu. Rastvor se meša na 0 °C tokom 1 h i još 6 h na sobnoj temperaturi. Reakciona smeša se izlije na led-vodu. Dobijeni proizvod se procedi, ispere vodom i suši pod sniženim pritiskom. Prinos: 318 mg, 91%. **31**: svetlosmeđ prah, t.t. = 249 °C. IR (ATR): 3095 sl, 3063 sl, 2904 sl, 1934 sl, 1696 sl, 1647 sl, 1581 j, 1532 j, 1500 sr, 1471 sl, 1406 sr, 1375 sr, 1349 sl, 1321 sl, 1270 sl, 1195 sl, 1175 sl, 1127 sl, 1072 sl, 981 sl, 932 sl, 909 sl, 842 sr, 826 sr, 795 sl, 777 sl, 757 sl, 736 sl, 690

sl, 664 sl, 618 sl, 577 sl, 525 sl. ^1H NMR (500 MHz, TFA): 9,87 (s, 1H), 9,70 (d, J = 9,4, 1H), 9,61 (d, J = 6,2, 1H), 9,55 (d, J = 6,2, 1H), 9,28 (d, J = 9,4, 1H), 8,70 – 8,66 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, TFA): 160,31, 156,21, 148,18, 148,02, 147,92, 140,77, 138,50, 131,88, 131,40, 131,07, 130,46, 128,92, 127,29, 127,03, 124,10, 123,57.

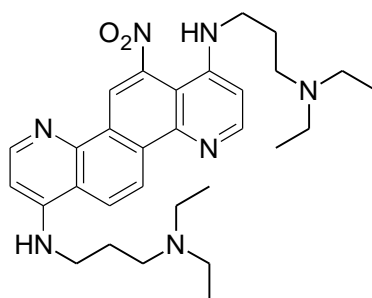
***N'*-(7-hloro-12-nitrohino[8,7-*h*]hinolin-1-il)-*N,N*-dietilpropan-1,3-diamin (32).**



Jedinjenje **31** (27,0 mg, 0,0785 mmol) i *N,N*-dietilpropan-1,3-diamin (0,15 mL, 0,95 mmol) se rastvore u dioksanu (0,60 mL) u mikrotalasnoj kivetu u atmosferi argona. Reakciona smeša se podvrgne mikrotalasnom zračenju u *Biotage Initiator 2.5* uređaju na 120 °C tokom 15 minuta. Nakon što se ohladi na sobnu temperaturu, smeša se izlije na led-vodu. Dobijeni proizvod se procedi, ispere vodom i suši pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent MeOH, MeOH/NH₃ gradijent 95:5 → 8:2; flash NH-kolona, gradijent heksan, heksan/EtOAc gradijent 99:1 → 1:99, EA). Prinos: 21,8 mg, 63%. **32**: narandžast prah, t.t. = 121 °C. IR (ATR): 3902 sl, 3853 sl, 3675 sl, 3481 sl, 3432 sl, 3090 sl, 3063 sl, 2962 j, 2926 j, 2858 sr, 2806 sr, 2547 sl, 2519 sl, 2493 sl, 2414 sl, 1802 sl, 1771 sl, 1729 sr, 1670 sl, 1639 sl, 1614 sl, 1583 j, 1538 sr, 1516 j, 1493 j, 1464 sr, 1409 sl, 1346 sr, 1258 sl, 1211 sl, 1168 sl, 1137 sl, 1116 sl, 1087 sl, 1064 sl, 985 sl, 902 sl, 878 sl, 822 sl, 796 sl, 755 sl, 692 sl, 658 sl. ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃): 9,47 (s, 1H), 9,39 (d, J = 9,4, 1H), 8,89 (d, J = 4,7, 1H), 8,72 (d, J = 5,5, 1H), 8,42 (d, J = 9,4, 1H), 7,65 (d, J = 4,7, 1H), 6,79 (d, J = 5,5, 1H), 6,04 (ps, 1H-N), 3,40 – 3,35 (m, 2H), 2,62 – 2,57 (m, 6H), 1,91 – 1,86 (m, 2H), 1,01 (t, J = 7,1, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃): 150,43, 149,42, 149,33, 147,29, 146,48, 146,35, 142,89, 134,45, 128,92, 125,83, 125,14, 124,35, 122,89, 119,31, 108,71, 103,90, 50,72, 47,24, 44,05, 25,65, 11,22. HRMS: *m/z* 438,16878 odgovara molekulskoj formuli C₂₃H₂₄N₅O₂ClH⁺ (greška u ppm -0,79). HPLC čistoća:

metod E, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,752, površina 97,88%; metod F, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 14 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,402, površina 98,10%.

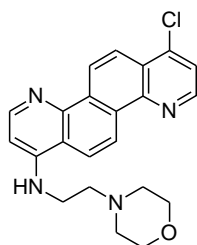
***N,N'*-bis[3-(dietilamino)propil]-6-nitrohino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin (**33**).**



Reakcioni sud koji sadrži magnet za mešanje se evakuše i ispuni argonom. Pd₂(dba)₃ (1,6 mg, 1,7 μmol), racemski BINAP (3,4 mg, 5,5 μmol) i NaO-*t*Bu (3,7 mg, 0,039 mmol) se unesu u kivetu i rastvore u suvom, deaerisanom toluenu (0,60 mL). Nakon mešanja rastvora 10 min, rastvor *N,N*-dietilpropan-1,3-diamin (4,4 mg, 0,034 mmol) i **32** (8,1 mg, 0,018 mmol) u suvom, deaerisanom toluenu (0,60 mL) doda se u smešu. Kiveta sa smešom se uroni u uljano kupatilo prethodno zagrejano na 100 °C. Nakon 24 h, reakciona smeša se ohladi na sobnu temperaturu i rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent CH₂Cl₂/MeOH, gradijent 95:5 → 1:9; MeOH, MeOH/zasićeni metanolni amonijak, gradijent 99:1 → 9:1). Prinos: 5,2 mg, 53%. **33**: narandžasti prah, t.t. = 105 °C. IR (ATR): 3227 sl, 3080 sl, 2967 sr, 2927 sr, 2847 sr, 1591 j, 1536 j, 1469 sr, 1436 sl, 1410 sl, 1334 sr, 1230 sl, 1196 sl, 1166 sl, 1132 sl, 1091 sl, 1070 sl, 1024 sl, 984 sl, 914 sl, 818 sl, 781 sl, 736 sl, 707 sl, 665 sl, 543 sl. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 9,57 (s, 1H), 9,16 (d, J = 9,5, 1H), 8,72 (d, J = 5,5, 1H), 8,67 (d, J = 5, 1H), 8,50 (ps, 1H-N), 8,08 (d, J = 9, 1H), 6,78 (d, J = 5,5, 1H), 6,53 (d, J = 5,5, 1H), 6,01 (ps, 1H-N), 3,47 – 3,42 (m, 2H), 3,39 – 3,34 (m, 2H), 2,74 – 2,69 (m, 2H), 2,68 (q, J = 7,2, 4H), 2,61 – 2,54 (m, 4H), 1,99 – 1,94 (m, 2H), 1,87 (kvint, J = 6,5, 2H), 1,14 (t, J = 7, 6H), 1,00 (t, J = 7,2, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 151,04, 150,65, 149,98, 149,51,

147,47, 145,70, 145,58, 133,90, 129,35, 122,30, 120,78, 120,53, 117,41, 108,23, 103,51, 100,30, 53,90, 50,67, 47,20, 47,17, 44,99, 43,86, 25,72, 24,20, 11,71, 11,25. HRMS: m/z 532,33921 odgovara molekularnoj formuli $C_{30}H_{41}N_7O_2H^+$ (greška u ppm - 0,46). HPLC čistoća: metod E, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 12 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,334, površina 99,60%; metod F, protokol gradijenta 0 - 3 min 50% A → 30% A, 3 - 6 min 30% A → 0% A, 6 - 9 min 0% A → 50% A, 9 - 14 min 50% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,161, površina 99,01%.

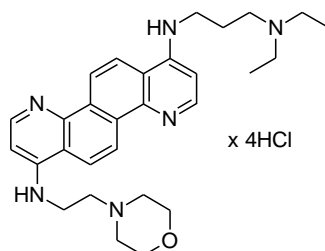
7-Hloro-*N*-(2-morfolin-4-iletil)hino[8,7-*h*]hinolin-1-amin (41).



Jedinjenje **9** (100 mg, 0,335 mmol) i 2-(morfolin-4-il)etanamin (420 mg, 3,22 mmol) se rastvore u NMP (3 mL) u mikrotalasnoj kivetici, u atmosferi argona. Reakciona smeša se podvrgne mikrotalasnom zračenju u *Biotage Initiator 2.5* uređaju na 150 °C tokom 20 minuta. Nakon što se ohladi na sobnu temperaturu, smeša se izlije na led-vodu. Dobijeni proizvod se procedi, ispere vodom i suši pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH gradijent 9:1 → 3:7). Prinos: 83 mg, 63%. **41**: svetlosivi prah, t.t. 194-196 °C. IC (ATR): 3382 sr, 2960 sl, 2927 sl, 2862 sl, 2826 sl, 1588 j, 1538 j, 1490 sl, 1455 sl, 1420 sl, 1376 sl, 1333 sl, 1310 sl, 1263 sl, 1234 sl, 1201 sl, 1143 sl, 1111 sr, 1070 sl, 1037 sl, 1009 sl, 915 sl, 860 sl, 826 sl, 795 sl, 759 sl. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD + CDCl₃): 9,18 (d, J = 9,4, 1H), 9,11 (d, J = 9,4, 1H), 8,83 (d, J = 4,8, 1H), 8,55 (d, J = 5,5, 1H), 8,29 (d, J = 9,4, 1H), 8,12 (d, J = 9,2, 1H), 7,65 (d, J = 4,8, 1H), 6,64 (d, J = 5,5, 1H), 3,82-3,70 (m, 4H), 3,52-3,42 (m, 2H), 2,85-2,75 (m, 2H), 2,58 (ps, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD + CDCl₃): 150,45, 149,03, 148,01, 146,01, 144,35, 142,33, 130,94, 130,67, 124,77, 127,03, 121,74, 120,82, 120,29, 118,98, 116,79, 99,98, 66,20, 55,79, 52,79, 38,70. HRMS: m/z 393,14686 odgovara

molekulskoj formuli $C_{22}H_{21}ClN_4OH^+$ (greška u ppm -2,04), 197,07737 odgovara molekulskoj formuli $C_{22}H_{21}ClN_4OH_2^{2+}$ (greška u ppm -0,50).

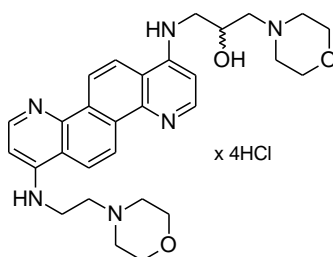
***N*-[3-(dietilamino)propil]-*N'*-(2-morfolin-4-iletil)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidrochlorid (40).**



Jedinjenje **41** (10 mg, 0,026 mmol) i višak *N,N*-dietilpropan-1,3-diamin (34 mg, 0,26 mmol) se rastvore u NMP (0,6 mL) u mikrotalasnoj kiveri, u atmosferi argona. Reakciona smeša se podvrgne mikrotalasnom zračenju u *Biotage Initiator 2.5* uređaju na 180 °C tokom 5 h. Nakon što se ohladi na sobnu temperaturu, smeša se izlije na led-vodu. Dobijeni proizvod se procedi, ispere vodom i suši pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH gradijent 9:1 → 8:2). Dobijeno jedinjenje se rastvori u 40% HCl u suvom MeOH, pa se potom rastvarač ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak se suspenduje u EtOH, nakon čega se EtOH ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Suspendovanje u EtOH i uklanjanje EtOH se ponovi još dva puta. Na kraju, proizvod se osuši dužim sušenjem na sniženom pritisku. Prinos: 7 mg (40%). **40**: žuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3399 j, 1622 j, 1573 j, 1504 sr, 1441 sr, 1354 sl, 1231 sl, 1097 sl, 748 sl. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): 9,03 – 8,99 (m, 4H), 8,92 (d, J = 7, 1H), 8,84 (d, J = 7,3, 1H), 8,79 – 8,73 (m, 2H), 7,48 (d, J = 7, 1H), 7,41 (d, J = 7,3, 1H), 4,40 (t, J = 6,6, 2H), 4,29 (ps, 4H), 4,07 (t, J = 7, 2H), 3,97 (t, J = 6,6, 2H), 3,79 (ps, 4H), 3,62 – 3,57 (m, 2H), 3,52 (q, J = 7,3, 4H), 2,56 – 2,50 (m, 2H), 1,55 (t, J = 7,3, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O): 155,95, 155,86, 142,19, 141,70, 135,00, 134,83, 124,70, 124,66, 120,99, 120,92, 120,24, 119,94, 101,10, 100,83, 63,63, 54,14, 52,13, 49,05, 47,49, 40,55, 37,42, 22,32, 8,20. HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 14 min 0% A → 90% A,

protok 0,5 mL/min, RT 2,254, površina 99,59%; metod B, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 14 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,186, površina 100%.

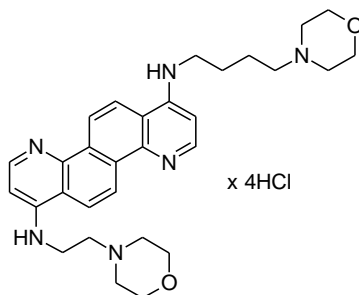
1-Morfolin-4-il-3-({7-[(2-morfolin-4-ilet)amino]hino[8,7-*h*]hinolin-1-il}amino)propan-2-ol tetrahidrochlorid (39).



Jedinjenje **41** (22 mg, 0,060 mmol) i višak **76** (98 mg, 0,56 mmol) se rastvore u NMP (0,7 mL) u mikrotalasnoj kivetici, u atmosferi argona. Reakciona smeša se podvrgne mikrotalasnom zračenju u *Biotage Initiator 2.5* uređaju na 180 °C tokom 5 h. Nakon što se ohladi na sobnu temperaturu, smeša se izlije na led-vodu. Doda se K₂CO₃ do pH = 13. Proizvod se ekstrahuje pomoću CH₂Cl₂, a kombinovani organski slojevi se suše nad anhidrovanim natrijum-sulfatom. Rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom, pa se sirovi proizvod prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH gradijent 9:1 → 1:9, MeOH). Dobijeno jedinjenje se rastvori u 40% HCl u suvom MeOH, pa se potom rastvarač ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Suvu ostatak se suspenduje u EtOH, nakon čega se EtOH ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Suspendovanje u EtOH i uklanjanje EtOH se ponovi još dva puta. Na kraju, proizvod se osuši dužim sušenjem na sniženom pritisku. Prinos: 27 mg, 73%. **39**: svetlosmeđ prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3419 j, 2932 sl, 1623 j, 1570 sr, 1499 sl, 1440 sl, 1348 sl, 1267 sl, 1229 sl, 1130 sl, 1098 sl, 980 sl, 906 sl, 869 sl, 822 sl, 744 sl, 571 sl. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD + CDCl₃, δ): 9,10-9,05 (m, 2H), 8,61-8,55 (m, 2H), 8,19 (d, J = 9,4, 1H), 8,15 (d, J = 9,4, 1H), 6,77 (d, J = 5,8, 1H), 6,71 (d, J = 5,8, 1H), 4,21-4,15 (m, 1H), 3,83-3,76 (m, 8H), 3,73 (ps, H-O), 3,58-3,51 (m, 3H), 3,46 (dd, J₁ = 13,0, J₂ = 6,6, 1H), 2,83 (t, J = 6,4, 2H), 2,67-2,57 (m, 10H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD + CDCl₃, δ): 150,94, 150,59, 148,62, 148,51,

144,38, 130,62, 130,56, 120,52, 120,49, 118,25, 118,15, 116,23, 99,86, 99,81, 66,22, 66,19, 65,22, 62,57, 55,81, 53,57, 52,79, 47,30, 38,74. HRMS: m/z 517,29220 odgovara molekulknoj formuli $C_{29}H_{36}N_6O_3H^+$ (greška u ppm +0,06), 259,15032 odgovara molekulknoj formuli $C_{29}H_{36}N_6O_3H_2^{2+}$ (greška u ppm +2,30), 173,10265 odgovara molekulknoj formuli $C_{29}H_{36}N_6O_3H_3^{3+}$ (greška u ppm +2,37). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 14 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,250, površina 99,17%; metod B, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A → 0% A, 7 - 9 min 0% A, 9 - 12 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,161, površina 100%.

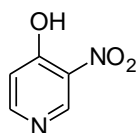
***N*-(4-morfolin-4-ilbutil)-*N'*-(2-morfolin-4-iletil)hino[8,7-*h*]hinolin-1,7-diamin tetrahidrochlorid (34 (ZSML08)).**



Jedinjenje **41** (24 mg, 0,06 mmol) i višak **72** (91 mg, 0,58 mmol) se rastvore u NMP (0,7 mL) u mikrotalasnoj kivetici, u atmosferi argona. Reakciona smeša se podvrgne mikrotalasnom zračenju u *Biotage Initiator 2.5* uređaju na 180 °C tokom 5 h. Nakon što se ohladi na sobnu temperaturu, smeša se izlije na led-vodu. Doda se K_2CO_3 do pH = 13. Proizvod se ekstrahuje pomoću CH_2Cl_2 , a kombinovani organski slojevi se suše nad anhidrovanim natrijum-sulfatom. Rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom, pa se sirovi proizvod prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO_2 , eluent $CH_2Cl_2/MeOH$ gradijent 8:2 → 1:9, MeOH). Dobijeno jedinjenje se rastvori u 40% HCl u suvom MeOH, pa se potom rastvarač ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak se suspenduje u EtOH, nakon čega se EtOH ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Suspendovanje u EtOH i uklanjanje EtOH se ponovi još dva puta. Na kraju, proizvod se osuši dužim sušenjem na sniženom pritisku. Prinos: 22 mg, 56%. **34 (ZSML08)**: žuti prah, t.t. > 280 °C. IR (ATR): 3426 j, 2926 sl, 2726 sl, 2608

sl, 1624 j, 1571 sr, 1497 sl, 1440 sl, 1347 sl, 1266 sl, 1226 sl, 1101 sl, 1048 sl, 744 sl, 608 sl, 559 sl, 532 sl, 501 sl, 456 sl, 424 sl, 404 sl. ^1H NMR (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$, δ): 9,15-9,00 (m, 2H), 8,53-8,65 (m, 2H), 8,20 (d, $J = 9,2$, 1H), 8,12 (d, $J = 9,4$, 1H), 6,75-6,60 (m, 2H), 3,85-3,77 (m, 4H), 3,77-3,70 (m, 4H), 3,55-3,48 (m, 2H), 3,47-3,40 (m, 2H), 2,83 (t, $J = 6,4$, 2H), 2,62 (ps, 4H), 2,51 (ps, 4H), 2,48-2,42 (m, 2H), 1,90-1,78 (m, 2H), 1,76-1,63 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$, δ): 150,74, 150,42, 148,83, 148,75, 144,73, 130,77, 120,65, 120,31, 118,40, 117,92, 116,28, 116,22, 99,77, 99,60, 66,21, 65,98, 57,96, 55,84, 52,94, 52,79, 42,27, 38,70, 25,68, 23,19. HRMS: m/z 515,31264 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_2\text{H}^+$ (greška u ppm -0,50), 258,16023 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_2\text{H}_2^{2+}$ (greška u ppm +0,55), 172,44248 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_2\text{H}_3^{3+}$ (greška u ppm +1,91). HPLC čistoća: metod A, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A \rightarrow 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 14 min 0% A \rightarrow 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,231, površina 97,87%; metod B, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A \rightarrow 0% A, 7 - 9 min 0% A, 9 - 12 min 0% A \rightarrow 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,158, površina 100%.

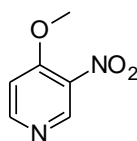
3-Nitropiridin-4-ol (46).



Rastvor 4-hidroksipiridina (10,06 g, 0,106 mol) u koncentrovanoj sumpornoj kiselinu (62 mL) se ohladi na 0 °C, a zatim se, polako, u porcijama, uz konstantno mešanje i održavanje temperature reakcione smeše, doda usitnjen kalijum-nitrat (21,20 g, 0,210 mol). Kada se doda celokupna količina kalijum-nitrata, reakciona smeša se zagreje na 100 °C i refluktuje se u toku 5 h. Ohlađena reakciona smeša se izlije na led/vodu nakon čega se ukapava vodeni rastvor amonijaka do pH = 6,5. Izdvojeni talog se procedi na Büchner-ovom levku, ispere hladnom vodom i osuši pod sniženim pritiskom, uz grejanje na 40 °C. Prinos: 12,11 g, 82%. **46**: prah svetložute boje, t.t. 234-235 °C (lit. t.t. = 278-279 °C (H_2O)). IC (ATR): 3158 sl, 3071 sr, 2801 sr, 2168 sl, 2110 sl, 1967 sl, 1946 sl, 1815 sl, 1643 sr, 1612 sr, 1544 sr, 1519 sl, 1497 sr, 1340 sr, 1242 sl, 1157 sl,

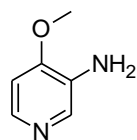
1096 sl, 1021 sl, 972 sl, 902 sl, 836 sr, 770 sl, 664 sl, 589 sl, 563 sl, 516 sl. ^1H NMR (500 MHz, d-DMSO, δ): 12,28 (ps, H-O, izmenljiv sa D_2O), 8,78 (d, $J = 1,5$, 1H), 7,76 (dd, $J_1 = 7,5$, $J_2 = 1,5$, 1H), 6,47 (d, $J = 7,5$, 1H), 3,37 (ps, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, d-DMSO, δ): 168,36, 139,74, 138,38, 137,84, 122,39. HRMS: m/z 281,05184 odgovara molekulknoj formuli $[\text{2C}_5\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3+\text{H}]^+$ (greška u ppm +0,62), 141,02942 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3\text{H}^+$ (greška u ppm - 0,36).

4-Metoksi-3-nitropiridin (48).



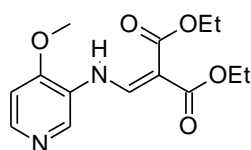
U rastvor jedinjenja **46** (3,50 g, 0,025 mol) u acetonu (130 mL) doda se kalijum-karbonat (4,16 g, 0,030 mol) i metil-jodid (1,72 mL, 0,028 mol), pa se reakciona smeša meša na 40 °C u toku 3 h. Potom se doda metanol (200 mL), pa se smeša procedi na Büchner-ovom levku, talog se ispere metanolom, a rastvarač iz filtrata ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Čvrsti ostatak se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO_2 , eluent MeOH, MeOH/ NH_3 gradijent 9:1 \rightarrow 3:7 \rightarrow 3/7). Prinos: 3,08 g, 80%. **48**: prah žute boje, t.t. = 81-82 °C (lit. t.t. = 73-75 °C (dietil-etar)). IC (ATR): 3456 j, 3088 sl, 3061 sl, 2920 sl, 2851 sl, 1661 sr, 1595 sr, 1504 sl, 1394 sl, 1364 sl, 1316 sr, 1205 sl, 930 sl, 833 sl. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 8,92 (d, $J = 2,3$, 1H), 7,79 (dd, $J_1 = 7,6$, $J_2 = 2,3$, 1H), 6,66 (d, $J = 7,6$, 1H), 3,87 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 171,06, 165,02, 145,35, 143,84, 124,49, 45,04. HRMS: m/z 155,04484 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{H}^+$ (greška u ppm -1,82), 177,02655 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}^+$ (greška u ppm -2,88).

4-Metoksipiridin-3-amin (49).



U rastvor jedinjenja **48** (3,08 g, 0,020 mol) u metanolu (150 mL) doda se 10% Pd/C (100 mg), pa se reakciona smeša izloži atmosferi vodonika pod pritiskom od 5 bar, u toku 3h. Reakciona smeša se procedi na Büchner-ovom levku, pa se rastvarač iz filtrata ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Čvrsti ostatak se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent EA/MeOH, gradijent 7/3 → 5:95, 100% MeOH). Prinos: 2,41 g, 97%. **49**: čvrsta supstanca smeđe boje, t.t. = 88-89 °C (lit. t.t. = 83 °C). IC (ATR): 3365 j, 1638 sr, 1556 j, 1534 sr, 1501 sr, 1435 sl, 1393 sl, 1364 sl, 1316 sl, 1248 sl, 1191 sl, 986 sl, 833 sl, 721 sl. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 7,44 (dd, J₁ = 6,9, J₂ = 2, 1H), 7,31 (d, J = 2,3, 1H), 6,33 (d, J = 6,9, 1H), 3,75 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 171,16, 140,64, 137,79, 123,76, 112,98, 44,89. HRMS: *m/z* 249,13390 odgovara molekulskoj formuli [2C₆H₈N₂O+H]⁺ (greška u ppm -2,80), 125,07043 odgovara molekulskoj formuli C₆H₈N₂OH⁺ (greška u ppm -4,07).

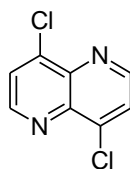
Dietil{[(4-metoksipiridin-3-il)amino]metilen}malonat (**47**).



U rastvor jedinjenja **49** (2,41 g, 0,019 mol) u etanolu (70 mL) doda se dietil-etoksimetilenmalonat, (3,84 mL, 0,019 mol), pa se reakciona smeša zagreva u otvorenom sudu na 110 °C dok sav etanol ne ispari (oko 3 h). Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent EA/MeOH, gradijent 9/1 → 1/1). Prinos: 4,83 g, 85%. **47**: čvrsta supstanca smeđe boje, t.t. = 91-92 °C (lit. t.t. = 98,5-100 °C). IC (ATR): 3578 sl, 3413 sl, 3225 sl, 3053 sl, 3002 sl, 2905 sl, 1698 j, 1666 sr, 1600 j, 1568 j, 1447 sl, 1426 sl, 1385 sl, 1355 sl, 1306 sl, 1264 sr, 1223 sr, 1089 sr, 1020 sl, 1003 sl, 926 sl, 843 sl, 797 sl, 615 sl, 553 sl. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,47 (d, J = 2,8, 1H), 8,08 (d, J = 2, 1H), 7,67 (dd, J₁ = 7,2, J₂ = 1,8, 1H), 6,44 (d, J = 7,1, 1H), 4,35-4,13 (m, 4H), 3,86 (s, 3H), 1,42-1,23 (m, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 171,28, 169,50, 168,75, 167,74, 150,35, 141,70, 131,77, 127,91, 115,64, 95,71, 61,53, 45,16, 14,87. HRMS: *m/z* 589,24793 odgovara molekulskoj formuli [2C₁₄H₁₈N₂O₅+H]⁺ (greška u ppm -4,22), 317,11044 odgovara

molekulskoj formuli $C_{14}H_{18}N_2O_5Na^+$ (greška u ppm -1,11), 295,12967 odgovara molekulskoj formuli $C_{14}H_{18}N_2O_5H^+$ (greška u ppm +2,80).

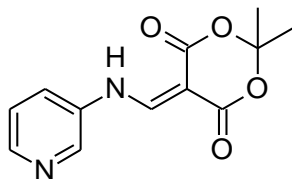
4,8-Dihlor-1,5-naftiridin (45).



Rastvor jedinjenja **47** (2,00 g, 6,81 mol) u difenil-etru (200 mL) zagreva se na otvorenom plamenu u toku 25 min. Reakciona smeša brzo se ohladi pod vodom i uz mešanje izlije u heksan (300 mL), pri čemu dolazi do pojave tamno smeđeg taloga. Talog se procedi, suspenduje u etil-acetatu i ponovo procedi. Sirovi proizvod se suši u vakuum sušnici, uz grejanje na 40 °C, a onda rastvori u fosfor(V)-oksihloridu (70 mL), pa se rastvor zagreva u zatvorenom sudu na 120 °C u toku 4 h. Reakciona smeša se izlije na led-vodu (150 mL), doda se K_2CO_3 do pH = 10, pa se proizvod ekstrahuje metilen-hloridom (3×50 mL). Organski sloj se suši iznad anhidrovanog natrijum-sulfata, sušilo se zatim ukloni ceđenjem na Büchner-ovom levku, a rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO_2 , eluent heksan/EA, gradijent 1/1→ 5/95, EA). Dobijena sirova smeša (446,2 mg) se onda rastvori u 48% bromovodoničnoj kiselini (45 mL). Rastvor se zagreva u zatvorenom sudu na 120 °C u toku 48 h. Višak kiseline se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod (701,4 mg) se suspenduje u $POCl_3$ (28 mL) pa se rastvor meša u zatvorenom sudu na 120 °C u toku 4 h. Reakciona smeša se izlije na led-vodu (50 mL) i doda se K_2CO_3 do pH = 10. Proizvod se ekstrahuje metilen-hloridom (3×30 mL). Organski sloj se suši iznad anhidrovanog natrijum-sulfata, sušilo se zatim ukloni ceđenjem na Büchner-ovom levku, a rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO_2 , eluent heksan/EA, gradijent 1/1→ 5/95, EA). Prinos: 312 mg, 23% nakon četiri faze. **45**: prah bele boje, t.t. > 267-270 °C (lit. t.t. = 278-279 °C). IC (ATR): 3067 sr, 3027 sr, 1724 sl, 1579 sl, 1467 j, 1378 sr, 1263 sr, 1190 sl, 1046 sl, 865 sr, 758 sr, 614 sl. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$ + d-TFA, δ): 9,32 (d, J = 5, 2H), 8,25

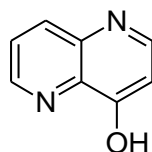
(d, $J = 5$, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{d-TFA}$, δ): 150,43, 148,18, 137,60, 128,42. HRMS: m/z 198,98195 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_8\text{H}_4\text{N}_2\text{Cl}_2\text{H}^+$ (greška u ppm -2,42).

2,2-Dimetil-5-[(piridin-3-ilamino)metiliden]-1,3-dioksan-4,6-dion (43).



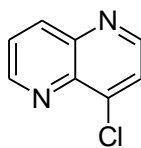
Meldrumova kiselina (1,50 g, 10,4 mmol) se rastvori u EtOH (24 mL), potom se doda 3-aminopiridin (0,89 g, 9,5 mmol) a nakon toga i trietil-ortoformat (1,40 g, 9,45 mmol). Reakciona smeša se zagreva na 100 °C, uz mešanje, dok sav etanol ne ispari. Čvrst ostatak se rastvori u minimalnoj količini vrućeg EtOH, doda se malo aktivnog uglja, pa se smeša brzo procedi kroz topao Celit. Iz filtrata iskristališe čisto jedinjenje koje se odvoji ceđenjem. Prinos: 1,53 g, 65%. **43**: svetlo-sivi prah, t.t. 135 °C. IR (ATR): 3236 sl, 3206 sl, 3074 sl, 2993 sl, 2946 sl, 1726 sr, 1686 j, 1619 j, 1579 sr, 1480 sr, 1454 sl, 1413 j, 1380 sr, 1325 sr, 1284 sr, 1262 sr, 1222 sr, 1144 sl, 1022 sl, 1000 sl, 936 sl, 847 sl, 822 sl, 803 sr, 778 sl, 726 sl, 704 sl, 654 sl, 604 sl, 507 sl. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 11,26 (d, $J = 13,4$, H-N, izmenljiv D_2O), 8,64 (d, $J = 14,2$, 1H), 8,63-8,61 (m, 1H), 8,56-8,54 (m, 1H), 7,66-7,62 (m, 1H), 7,43-7,39 (m, 1H), 1,77 (s, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 165,41, 163,04, 152,74, 147,86, 140,51, 134,55, 124,68, 124,25, 105,44, 88,71, 27,06. HRMS: m/z 249,08686 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{H}^+$ (greška u ppm -0,48).

1,5-Naftiridin-4-ol (44).



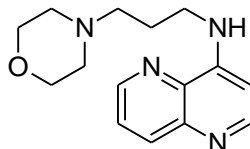
Rastvor **43** (100 mg, 0,403 mmol) u difenil-etru (3,0 mL) zagreva se na otvorenom plamenu u toku 50 min. Reakciona smeša se ohladi, pa se izdvojeni talog procedi, i ispere heksanom. Proizvod se prečisti sublimacijom na 210 °C na 20 mbar. Prinos: 40 mg, 68%. **44**: beli kristali, sublimuje > 200 °C. IR (ATR): 3012 sr, 2925 j, 2855 j, 2077 sl, 1975 sl, 1623 j, 1583 sr, 1559 sr, 1502 j, 1461 sr, 1421 sr, 1328 sl, 1192 sl, 1137 sl, 1073 sl, 977 sl, 885 sl, 818 sl, 779 sl, 724 sl, 682 sl, 590 sl, 546 sl, 481 sl. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃ + d-TFA, δ): 9,15 (dd, J₁ = 8,8, J₂ = 1,2, 1H), 9,12-9,10 (m, 1H), 8,51 (d, J = 7,4), 8,41 (dd, J₁ = 8,9, J₂ = 5,4, 1H), 7,19 (d, J = 7,4, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃ + d-TFA, δ): 173,25, 147,30, 144,98, 142,03, 131,98, 131,43, 121,01, 116,06. HRMS: *m/z* 147,05496 odgovara molekulskoj formuli C₈H₆N₂OH⁺ (greška u ppm -2,22).

4-Hlor-1,5-naftiridin (**42**).



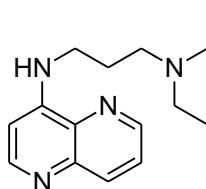
Jedinjenje **44** (162 mg, 1,11 mmol) se suspenduje u POCl₃ (2,5 mL), pa se smeša meša na 115 °C tokom 15 minuta u zatvorenom sudu. Rastvor se potom izlije na led/vodu i doda se K₂CO₃ do pH = 10. Sirovi proizvod se ekstrahuje pomoću CH₂Cl₂. Organski sloj se suši iznad anhidrovanog natrijum-sulfata, sušilo se zatim ukloni ceđenjem na Büchner-ovom levku, a rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent heksan/EA, gradijent 8/2 → 1/9, EA). Prinos: 154 mg, 84%. **42**: bezbojni prah, t.t. 100 °C. IR (ATR): 3068 sl, 3028 j, 2926 sl, 2827 sl, 2658 sl, 1730 sl, 1582 sl, 1552 sl, 1485 j, 1376 sl, 1356 sl, 1283 sr, 1250 sl, 1194 sl, 1133 sl, 1102 sl, 1072 sl, 1029 sl, 983 sr, 863 sr, 824 sr, 790 sr, 658 sr, 637 sl, 568 sl. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 9,64-9,62 (m, 1H), 9,36 (d, J = 5,8, 1H), 9,26-9,23 (m, 1H), 8,51 (d, J = 5,5, 1H), 8,47 (dd, J₁ = 8,7, J₂ = 4,8, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 155,16, 154,04, 150,27, 140,20, 139,70, 139,46, 132,29, 129,98. HRMS: *m/z* 165,02076 odgovara molekulskoj formuli C₈H₅N₂ClH⁺ (greška u ppm -3,88).

***N*-(3-morfolin-4-ilpropil)-1,5-naftiridin-4-amin (50).**



Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku C, koristeći **42** (10 mg, 0,061 mmol), 3-(morfolin-4-il)propanamin (0,30 mL, 2,0 mmol) i NMP (0,5 mL). Prinos: 15 mg, 91%. **50**: svetložuti film. IR (ATR): 3384 sr, 3237 sr, 3070 sr, 3005 sl, 2951 sr, 2856 sr, 2813 sr, 1699 sl, 1650 sl, 1603 j, 1580 j, 1533 j, 1486 sr, 1459 sr, 1390 sr, 1359 j, 1306 sr, 1270 sl, 1220 sr, 1168 sl, 1137 sr, 1116 j, 1071 sl, 1031 sl, 988 sl, 862 sr, 827 sr, 795 sr, 768 sl, 723 sl, 680 sl, 657 sl, 613 sl, 581 sl, 548 sl. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,74 (dd, J₁ = 4,25, J₂ = 1,2, 1H), 8,39 (d, J = 5,5, 1H), 8,14 (dd, J₁ = 8,8, J₂ = 4,2, 1H), 7,66 (dd, J₁ = 8,8, J₂ = 4,2, 1H), 6,66 (d, J = 5,5, 1H), 3,78 (t, J = 4,8, 4H), 3,48 (t, J = 6,5, 2H), 2,56 (t, J = 6,8, 2H), 2,51 (ps, 4H), 1,95 (kvint, J = 6,5, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 153,06, 152,18, 148,48, 143,50, 136,40, 136,34, 126,38, 100,60, 67,89, 58,36, 55,03, 42,68, 25,97. HRMS: *m/z* 273,17014 odgovara molekulkovj formuli C₁₅H₂₀N₄OH⁺ (greška u ppm -3,11). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 15 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,002, površina 95,76% ; metod D, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A → 0% A, 7 - 10 min 0% A, 10 - 12 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,903, površina 98,02%.

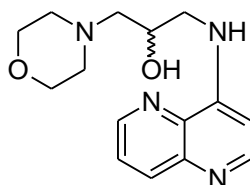
***N,N*-dietil-*N'*-1,5-naftiridin-4-ilpropan-1,3-diamin (51).**



Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku C, koristeći **42** (21 mg, 0,13 mmol), *N,N*-dietilpropan-1,3-diamin (0,30 mL, 1,9 mmol) i NMP (0,5 mL). Prinos: 20 mg,

59%. **51**: svetložuti film. IR (ATR): 3664 sl, 3390 j, 3254 j, 3068 sr, 2968 j, 2934 j, 2872 j, 2809 j, 2570 sl, 2425 sl, 1916 sl, 1604 j, 1579 j, 1532 j, 1468 j, 1383 j, 1360 j, 1293 sr, 1267 sr, 1219 j, 1172 sr, 1126 j, 1071 sr, 1019 sl, 980 sl, 940 sl, 884 sl, 827 j, 794 j, 723 sr, 684 sl, 657 sr, 615 sr, 545 sr. ^1H NMR (200 MHz, CD_3OD , δ): 8,71 (dd, $J_1 = 4$, $J_2 = 1,2$, 1H), 8,38 (d, $J = 5,6$, 1H), 8,12 (dd, $J_1 = 9$, $J_2 = 1,7$, 1H), 7,62 (dd, $J_1 = 8,6$, $J_2 = 4,2$, 1H), 6,63 (d, $J = 5,6$, 1H), 3,42 (t, $J = 6,7$, 2H), 2,66-2,48 (m, 6H), 1,89 (kvint, $J = 6,7$, 2H), 1,04 (t, $J = 7,3$, 6H). ^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD , δ): 152,64, 152,41, 148,36, 143,72, 136,58, 126,14, 100,54, 51,66, 47,78, 42,04, 26,35, 11,40. HRMS: m/z 259,19099 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{H}^+$ (greška u ppm - 2,82). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 1 min 90% A, 1 - 6 min 90% A \rightarrow 0% A, 6 - 8 min 0% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,222, površina 98,30% ; metod D, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A \rightarrow 0% A, 7 - 10 min 0% A, 10 - 12 min 0% A \rightarrow 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,814, površina 99,49%.

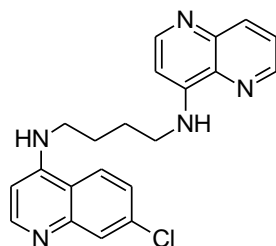
1-Morfolin-4-il-3-(1,5-naftiridin-4-ilamino)propan-2-ol (**52**).



Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku C, koristeći **42** (30 mg, 0,18 mmol), **76** (0,30 mL, 1,9 mmol) i NMP (0,6 mL). Prinos: 28 mg, 54%. **52**: svetložuti film. IR (ATR): 3854 sl, 3749 sl, 3673 sl, 3649 sl, 3384 j, 3220 sr, 2953 sr, 2858 sr, 2815 j, 2693 sr, 2572 sl, 1698 sl, 1652 sl, 1605 j, 1581 j, 1535 j, 1490 sr, 1456 sr, 1361 j, 1298 sr, 1272 sr, 1221 sr, 1116 j, 1072 sr, 1037 sl, 1007 sr, 910 sl, 891 sl, 865 sr, 827 sr, 795 sr, 732 sr, 701 sl, 657 sr, 631 sr, 567 sr. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 8,73-8,71 (m, 1H), 8,40 (d, $J = 5,5$, 1H), 8,15-8,11 (m, 1H), 7,64 (dd, $J_1 = 8,5$, $J_2 = 4$, 1H), 6,70 (d, $J = 5,5$, 1H), 4,10 (kvint, $J = 6$, 1H), 3,74 (t, $J = 4,8$, 4H), 3,47 (ddd, $J_1 = 32,8$, $J_2 = 13,5$, $J_3 = 5$, 2H), 2,56-2,52 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 152,84, 152,51, 148,51, 143,78, 136,72, 136,35, 126,28, 100,90, 67,98, 67,57, 64,44, 55,61, 48,46. HRMS: m/z 289,16586 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2\text{H}^+$ (greška u ppm -0,15). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 1 min 90% A, 1 - 6 min 90% A \rightarrow 0% A, 6 - 8

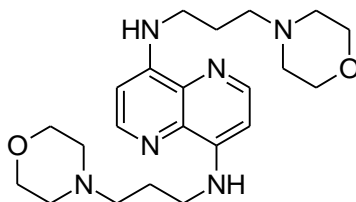
min 0% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,326, površina 97,49% ; metod D, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A → 0% A, 7 - 10 min 0% A, 10 - 12 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,804, površina 100%.

***N*-(7-hlorohinolin-4-il)-*N'*-(1,5-naftiridin-4-il)butan-1,4-diamin (53).**



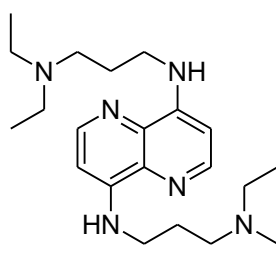
Jedinjenje se sintetise prema opštem postupku C, koristeći **42** (10 mg, 0,06 mmol), *N*-(7-hlorohinolin-4-il)butan-1,4-diamin (36 mg, 0,14 mmol) i NMP (0,7 mL). Nakon što se ohladi na sobnu temperaturu, smeša se izlije na led-vodu. Dobijeni precipitat se filtruje, ispere vodom i prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent MeOH, MeOH/NH₃ gradijent 99:1 → 8:2). Prinos: 9 mg, 38%. **53**: bezbojan film. IR (ATR): 3235 sr, 3065 sl, 2953 sl, 2868 sl, 1664 sl, 1607 sl, 1580 j, 1533 sr, 1490 sl, 1448 sl, 1358 sl, 1335 sl, 1309 sl, 1275 sl, 1204 sl, 1136 sl, 898 sl, 848 sl, 823 sl, 801 sl, 760 sl, 572 sl, 464 sl. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,68 (dd, J₁ = 4,1, J₂ = 1,6, 1H), 8,35 (d, J = 5,5, 1H), 8,29 (d, J = 5,8, 1H), 8,11 (dd, J₁ = 8,5, J₂ = 1,6, 1H), 8,05 (d, J = 9,1, 1H), 7,73 (d, J = 2, 1H), 7,66-7,60 (m, 1H), 7,37 (dd, J₁ = 9, J₂ = 2, 1H), 6,65 (d, J = 5,6, 1H), 6,53 (d, J = 5,8, 1H), 3,52-3,43 (m, 4H), 1,97-1,88 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 151,26, 151,19, 150,35, 150,31, 148,30, 146,88, 142,45, 136,31, 135,11, 134,61, 127,38, 125,19, 124,74, 121,50, 117,03, 99,55, 98,60, 42,55, 41,98, 26,19, 25,92. HRMS: *m/z* 378,14721 odgovara molekulskej formuli C₂₁H₂₀ClN₅H⁺ (greška u ppm -2,09), 189,57781 odgovara molekulskej formuli C₂₁H₂₀ClN₅H₂²⁺ (greška u ppm +0,89). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 16 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 0,995, površina 99,34%; metod D, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 16 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 0,766, površina 96,95%.

***N,N'*-bis(3-morfolin-4-ilpropil)-1,5-naftiridin-4,8-diamin (54).**



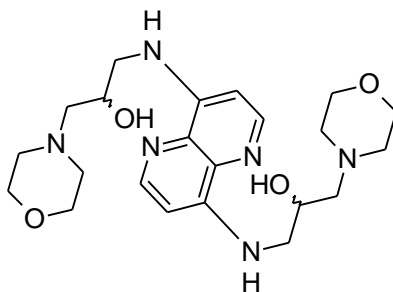
Jedinjenje se sintetizuje prema opštem postupku C, koristeći **45** (5 mg, 0,027 mmol), 3-(morfolin-4-il)propanamin (0,30 mL, 2,0 mmol) i NMP (0,5 mL). Prinos: 4 mg, 33%. **54**: svetložuti film. IR (ATR): 3233 sr, 3072 sl, 3047 sl, 2949 sr, 2922 sr, 2890 sr, 2855 sr, 2819 j, 2772 sr, 2692 sl, 2660 sl, 1700 sl, 1570 j, 1545 j, 1468 j, 1398 sr, 1336 sr, 1304 sr, 1265 sr, 1224 j, 1188 sl, 1146 sr, 1114 j, 1068 sr, 1032 sl, 999 sl, 968 sl, 925 sl, 900 sl, 861 sr, 809 sr, 766 sr, 743 sr, 712 sr, 633 sr, 609 sl, 573 sl, 544 sr. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,25 (d, J = 5, 2H), 6,61 (d, J = 5,5, 2H), 3,74 (t, J = 4,5, 8H), 3,42 (t, J = 6,5, 4H), 2,54 (d, J = 7, 4H), 2,50 (ps, 8H), 1,94 (kvint, J = 7, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 150,55, 147,40, 133,35, 99,80, 66,28, 56,45, 53,41, 40,69, 24,77. HRMS: *m/z* 415,28160 odgovara molekularnoj formuli C₂₂H₃₄N₆O₂H⁺ (greška u ppm -2,35). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 15 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,227, površina 95,55% ; metod D, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A → 0% A, 7 - 10 min 0% A, 10 - 12 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,812, površina 97,48%.

***N,N'*-bis[3-(dietilamino)propil]-1,5-naftiridin-4,8-diamin (55 (ZS102)).**



Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku C, koristeći **45** (6 mg, 0,031 mmol), *N,N*-dietilpropan-1,3-diamin (0,30 mL, 1,9 mmol) i NMP (0,5 mL). Prinos: 5 mg, 41%. **55 (ZS102)**: svetložuti film. IR (ATR): 3383 sr, 2967 sr, 2930 sr, 2871 sl, 2805 sr, 1550 j, 1468 sr, 1348 sr, 1294 sl, 1220 sr, 1170 sl, 1138 sl, 1072 sl, 815 sr, 729 sl, 632 sl, 537 sl. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,25 (d, J = 5, 2H), 6,61 (d, J = 5,5, 2H), 3,38 (t, J = 6,8, 4H), 2,66-2,60 (m, 4H), 2,58 (q, J = 7,5, 8H), 1,93-1,88 (m, 4H), 1,05 (t, J = 7,2, 12H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 152,08, 149,03, 134,91, 101,50, 51,61, 47,93, 42,12, 26,72, 11,51. HRMS: *m/z* 387,32269 odgovara molekulknoj formuli C₂₂H₃₈N₆H⁺ (greška u ppm -0,98). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A → 0% A, 7 - 10 min 0% A, 10 - 12 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,977, površina 99,30% ; metod D, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A → 0% A, 7 - 10 min 0% A, 10 - 12 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,826, površina 99,81%.

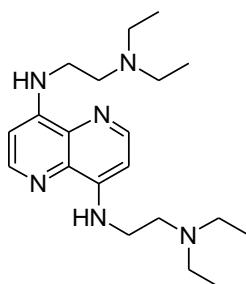
1,1'-[1,5-Naftiridin-4,8-diildi(imino)]bis(3-morfolin-4-ilpropan-2-ol) (**56**).



Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku C, koristeći **45** (11 mg, 0,056 mmol), **76** (257 mg, 1,47 mmol) i NMP (0,8 mL). Prinos: 17 mg, 67%. **56**: svetložuti film. IR (ATR): 3386 j, 2934 j, 2857 j, 2814 j, 2691 sr, 1914 sl, 1697 sl, 1665 sl, 1572 j, 1551 j, 1457 j, 1395 sr, 1352 sr, 1298 sr, 1274 sr, 1222 j, 1142 sr, 1115 j, 1071 sr, 1038 sl, 1008 sr, 940 sl, 914 sl, 865 sr, 818 sr, 734 sr, 700 sl, 633 sr, 576 sl. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,26 (d, J = 5,5, 2H), 6,64 (d, J = 5, 2H), 4,08 (kvint, J = 5,8, 2H), 3,72 (t, J = 4,5, 8H), 3,41 (ddd, J₁ = 50, J₂ = 13, J₃ = 5,5, 4H), 2,54-2,50 (m, 12H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 152,19, 149,08, 135,02, 101,65, 67,99, 67,73, 64,25, 55,57, 48,41. HRMS: *m/z* 447,27104 odgovara molekulknoj formuli C₂₂H₃₄N₆O₄H⁺ (greška u ppm -0,88). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 1 min 90% A, 1

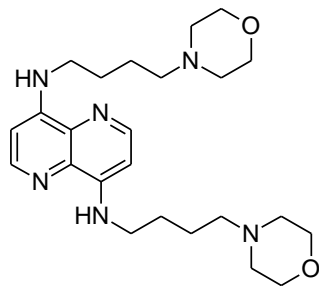
- 6 min 90% A → 0% A, 6 - 7 min 0% A, protok 0,5 mL/min, RT 2,177, površina 98,21% ; metod D, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A → 0% A, 7 - 10 min 0% A, 10 - 12 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,775, površina 99,17%.

***N,N'*-bis[2-(dietilamino)etil]-1,5-naftiridin-4,8-diamin (57).**



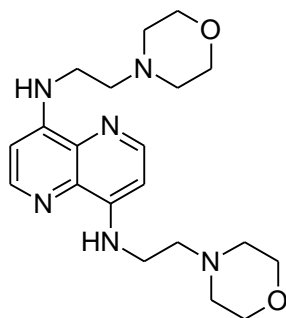
Jedinjenje se sintetizuje prema opštem postupku C, koristeći **45** (10 mg, 0,053 mmol), *N,N*-dietiletan-1,3-diamin (0,25 mL, 1,78 mmol) i NMP (0,7 mL). Prinos: 8 mg, 46%. **57**: svetložuti film. IR (ATR): 3378 sr, 2971 sr, 2932 sl, 2869 sl, 2806 sl, 1582 j, 1552 j, 1462 sr, 1383 sl, 1334 sl, 1292 sl, 1255 sl, 1229 sr, 1176 sl, 1126 sl, 1068 sl, 974 sl, 808 sl, 746 sl, 593 sl. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,31 (d, J = 5,2, 2H), 6,89 (ps, 2H), 6,50 (d, J = 5,2, 2H), 3,46 – 3,33 (m, 4H), 2,83 (t, J = 6,6, 4H), 2,72 – 2,62 (m, 8H), 1,09 (t, J = 7,1, 12H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 150,21, 147,68, 133,41, 100,18, 51,22, 47,01, 40,39, 11,48. HRMS: *m/z* 359,29188 odgovara molekularnoj formuli C₂₀H₃₄N₆H⁺ (greška u ppm +0,31), 180,15066 odgovara molekularnoj formuli C₂₀H₃₄N₆H₂²⁺ (greška u ppm +6,30). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 16 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 1,024, površina 97,81%; metod D, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 16 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 0,803, površina 96,95%.

***N,N'*-bis[4-(morfolin-4-il)butil]-1,5-naftiridin-4,8-diamin (37).**



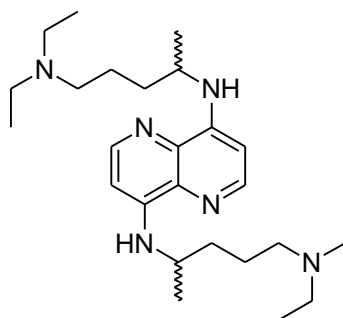
Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku C, koristeći **45** (10 mg, 0,053 mmol), **72** (284 mg, 1,80 mmol) i NMP (0,7 mL). Prinos: 9 mg, 46%. **37**: svetložuti film. IR (ATR): 3357 j, 2940 sr, 2864 sr, 2806 sr, 2686 sl, 1660 sl, 1632 sl, 1544 j, 1469 sr, 1396 sl, 1351 sr, 1306w, 1269 sl, 1249 sl, 1225 sl, 1142 sl, 1112 sr, 1066 sl, 1025 sl, 973 sl, 940 sl, 911 sl, 869 sl, 845 sl, 821 sl, 781 sl, 741 sl, 633 sl, 611 sl, 554 sl. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 8,28 (d, $J = 5,2$, 2H), 6,65-6,56 (m, 2H), 6,46 (d, $J = 5,2$, 2H), 3,72 (t, $J = 4,6$, 8H), 3,37-3,28 (m, 4H), 2,53-2,34 (m, 12H), 1,85-1,74 (m, 4H), 1,70-1,60 (m, 4H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ): 150,27, 147,69, 133,53, 99,96, 66,98, 58,41, 53,73, 42,51, 26,73, 24,17. HRMS: m/z 443,31186 odgovara molekulskoj formuli $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_2\text{H}^+$ (greška u ppm -2,34), 222,16077 odgovara molekulskoj formuli $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_2\text{H}_2^{2+}$ (greška u ppm +3,06), 148,44312 odgovara molekulskoj formuli $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_2\text{H}_3^{3+}$ (greška u ppm +4,28). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A \rightarrow 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 16 min 0% A \rightarrow 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 1,033, površina 99,92% ; metod D, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A \rightarrow 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 16 min 0% A \rightarrow 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 1,027, površina 96,27%.

***N,N'*-bis[2-(morfolin-4-il)etil]-1,5-naftiridin-4,8-diamin (36).**



Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku C, koristeći **45** (10 mg, 0,053 mmol), 2-(morfolin-4-il)etanamin (0,27 mL, 2,05 mmol) i NMP (0,7 mL). Sirovi proizvod se prečisti kristalizacijom iz metanola. Prinos: 14 mg, 71%. **36**: bezbojni prah, t.t. 174-177 °C. IR (ATR): 3379 sr, 2965 sr, 2921 sr, 2871 sl, 2844 sl, 2812 sr, 1582 j, 1553 j, 1476 sl, 1457 sr, 1397 sl, 1374 sl, 1337 sr, 1295 sl, 1273 sr, 1232 sr, 1144 sr, 1115 j, 1083 sl, 1067 sl, 1031 sl, 978 sl, 947 sl, 918 sl, 859 sl, 815 sl, 767 sl, 665 sl, 629 sl, 559 sl, 499 sl. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8,34 (d, J = 5,2, 2H), 6,86 (ps, 2H), 6,48 (d, J = 5,2, 2H), 3,76 (t, J = 4,6, 8H), 3,45-3,35 (m, 4H), 2,74 (t, J = 6,4, 4H), 2,54 (ps, 8H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 150,21, 147,91, 133,69, 100,18, 66,95, 56,81, 53,50, 39,17. HRMS: *m/z* 387,24979 odgovara molekulknoj formuli C₂₀H₃₀N₆O₂H⁺ (greška u ppm -1,32), 194,12945 odgovara molekulknoj formuli C₂₀H₃₀N₆O₂H₂²⁺ (greška u ppm +3,40). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 14 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 0,755, površina 95,45%; metod D, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A → 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 16 min 0% A → 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 0,722, površina 100%.

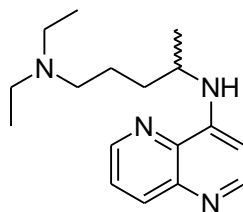
***N,N'*-bis[4-(dietilamino)-1-metilbutil]-1,5-naftiridin-4,8-diamin (35 (ZS103)).**



Jedinjenje se sintetise prema opstem postupku C, koristeći **45** (10 mg, 0,053 mmol), *N,N*-dietilpentan-1,4-diamin (0,30 mL, 1,5 mmol) i NMP (0,6 mL). Prinos: 12 mg, 51%. **35 (ZS103)**: svetložuti film. IR (ATR): 3367 sr, 3055 sl, 2967 j, 2931 j, 2870 sr, 2800 sr, 1674 sl, 1636 sl, 1574 j, 1545 j, 1458 sr, 1379 sr, 1353 sr, 1293 sr, 1241 sr, 1216 sr, 1172 sr, 1154 sr, 1089 sr, 991 sl, 918 sl, 815 sr, 722 sl, 675 sl, 632 sl, 548 sr. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, δ): 8,23 (d, J = 5,5, 2H), 6,63 (d, J = 5,5, 2H), 3,80-3,75

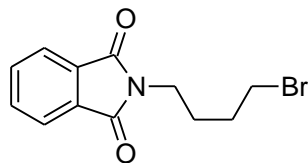
(m, 2H), 2,57-2,48 (m, 12H), 1,69-1,59 (m, 8H), 1,32 (d, $J = 6,5$, 6H), 1,01 (t, $J = 7,2$, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 149,80, 147,30, 133,32, 100,08, 52,11, 46,19, 34,13, 22,29, 19,24, 9,71. HRMS: m/z 443,38495 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{H}^+$ (greška u ppm -1,63). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A \rightarrow 0% A, 7 - 10 min 0% A, 10 - 12 min 0% A \rightarrow 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 3,047, površina 97,30% ; metod D, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A \rightarrow 0% A, 7 - 10 min 0% A, 10 - 12 min 0% A \rightarrow 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,926, površina 98,30%.

***N*¹,*N*¹-dietil-*N*⁴-1,5-naftiridin-4-ilpentan-1,4-diamin (38).**



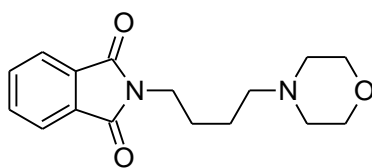
Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku C, koristeći **42** (10 mg, 0,06 mmol), 3-(morfolin-4-il)propanamin (0,30 mL, 1,5 mmol) i NMP (0,5 mL). Prinos: 13 mg, 78%. **38**: svetložuti film. IR (ATR): 3378 sr, 3069 sl, 2968 j, 2933 sr, 2871 sr, 2803 sr, 1603 j, 1578 j, 1486 sr, 1454 sr, 1379 sr, 1369 j, 1293 sl, 1261 sl, 1226 sr, 1176 sr, 1134 sr, 1092 sr, 896 sl, 826 sr, 795 sr, 752 sl, 719 sl, 658 sr, 624 sl, 544 sr. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD , δ): 8,73 (dd, $J_1 = 4$, $J_2 = 1,5$, 1H), 8,40 (d, $J = 5,5$, 1H), 8,14 (dd, $J_1 = 8,8$, $J_2 = 1,8$, 1H), 7,65 (dd, $J_1 = 8,5$, $J_2 = 4,5$, 1H), 6,69 (d, $J = 5,5$, 1H), 3,85-3,82 (m, 1H), 2,55-2,47 (m, 6H), 1,73-1,59 (m, 4H), 1,34 (d, $J = 6,5$, 3H), 1,00 (t, $J = 7,2$, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD , δ): 152,58, 151,97, 148,42, 143,97, 136,86, 136,23, 126,29, 100,94, 53,70, 49,23, 47,79, 35,65, 24,07, 20,78, 11,33. HRMS: m/z 287,22190 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{H}^+$ (greška u ppm -3,91). HPLC čistoća: metod C, protokol gradijenta 0 - 3 min 90% A, 3 - 9 min 90% A \rightarrow 0% A, 9 - 12 min 0% A, 12 - 15 min 0% A \rightarrow 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,168, površina 96,00% ; metod D, protokol gradijenta 0 - 2 min 90% A, 2 - 7 min 90% A \rightarrow 0% A, 7 - 10 min 0% A, 10 - 12 min 0% A \rightarrow 90% A, protok 0,5 mL/min, RT 6,799, površina 95,52%.

2-(4-Brombutil)-1*H*-izoindol-1,3(2*H*)-dion (65).



Smeša kalijum-ftalimida (370,7 mg, 2,001 mmol) i 1,4-dibrombutana (2,20 g, 10,2 mmol) se suspenduje u suvom DMF (5,0 mL) i meša na 110 °C tokom 12 h. Višak 1,4-dibrombutana i DMF se uklone destilacijom pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent heksan/EA gradijent 95:5 → 85:15). Prinos: 441,1 mg (78%). **65**: bezbojni prah, t.t. = 78 °C. IR (ATR): 3456 sl, 3036 sl, 2972 sl, 2944 sr, 2862 sl, 1767 j, 1713 j, 1614 sl, 1557 sl, 1520 sl, 1462 sr, 1433 sr, 1398 j, 1371 sr, 1336 sl, 1305 sl, 1287 sl, 1258 sr, 1217 sl, 1185 sl, 1154 sl, 1116 sl, 1089 sl, 1022 sl, 990 sl, 951 sl, 916 sl, 893 sl, 796 sl, 743 sl, 715 sr. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 7,87 – 7,83 (m, 2H), 7,74 – 7,70 (m, 2H), 3,73 (t, J = 6,8, 2H), 3,45 (t, J = 6,2, 2H), 1,95 – 1,82 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 168,34, 133,97, 132,02, 123,24, 36,93, 32,75, 29,81, 27,22. HRMS: *m/z* 282,01185 odgovara molekulskoj formuli C₁₂H₁₂BrNO₂H⁺ (greška u ppm -2,01).

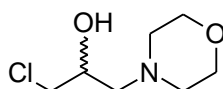
2-(4-Morfolin-4-ilbutil)-1*H*-izoindol-1,3(2*H*)-dion (67).



Smeša **65** (1,53 g, 5,43 mmol), morfolina (947 mg, 10,9 mmol) i kalijum-karbonata (1,13 g, 8,16 mmol) se meša u suvom dioksanu (65 mL) na 85 °C tokom 12 h. Višak morfolina i dioksan se uklone destilacijom pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent EA/MeOH gradijent 98:2 → 8:2). Prinos: 1,40 g (89%). **67**: bezbojno viskozno ulje. IR (ATR): 3608 sl, 3466 sl, 2945 sr, 2857 sl, 2809 sl, 2689 sl, 1771 sl, 1711 j, 1614 sl, 1464 sl, 1440 sl, 1397 sr, 1366 sl, 1334 sl, 1306 sl, 1272 sl, 1187 sl, 1117 sr, 1070 sl, 1044 sl, 866 sl, 720 sr. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 7,86-7,82 (m, 2H), 7,74-7,69 (m, 2H), 3,73 – 3,68 (m, 6H),

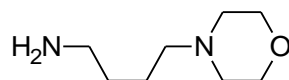
2,44 (ps, 4H), 2,39 – 2,35 (m, 2H), 1,75 – 1,68 (m, 2H), 1,58 – 1,52 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 168,35, 133,84, 132,06, 123,12, 66,81, 58,27, 53,56, 37,73, 26,44, 23,68. HRMS: m/z 289,15430 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{H}^+$ (greška u ppm -1,28).

1-Hlor-3-morfolin-4-ilpropan-2-ol (66).



Racemski epihlorhidrin (1,546 g, 16,71 mmol) i morfolin (1,316 g, 15,10 mmol) se rastvore u etanolu (45 mL) u mikrotalasnoj kivetu, u atmosferi argona. Reakciona smeša se podvrgne mikrotalasnom zračenju u *Biotage Initiator 2.5* uređaju na 40 °C tokom 7 minuta. Višak epihlorhidrina i etanol se uklone destilacijom pod sniženim pritiskom. U toku destilacije prati se masa ostatka u balonu, da bi se izbegao gubitak proizvoda. Prinos: 2,52 g (93%). **66**: bezbojna viskozna tečnost. IR (ATR): 3645 sl, 3345 sr, 2957 sr, 2895 sl, 2858 sr, 2814 sr, 2692 sl, 1647 sl, 1455 sl, 1379 sl, 1297 sl, 1207 sl, 1143 sl, 1118 j, 1067 sl, 1038 sl, 1010 sl, 968 sl, 943 sl, 914 sl, 866 sl, 802 sl, 739 sl, 702 sl, 636 sl, 579 sl. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 4,03 – 3,90 (m, 1H), 3,81 – 3,67 (m, 4H), 3,63 – 3,54 (m, 2H), 3,34 (ps, H-O), 2,74 – 2,59 (m, 2H), 2,56 – 2,41 (m, 4H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 66,84, 66,40, 61,47, 53,71, 46,98. HRMS: m/z 180,07774 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{ClNO}_2\text{H}^+$ (greška u ppm -4,68).

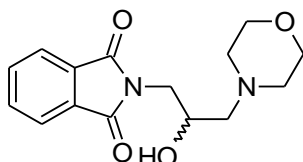
(4-Morfolin-4-ilbutil)amin (72).



Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku, koristeći **67** (2,26 g, 7,84 mmol), hidrazin hidrat (0,70 mL, 14 mmol) i etanol (100 mL). Prinos: 0,90 g (73%). **72**: bezbojna viskozna tečnost. IR (ATR): 3352 sl, 2933 sr, 2857 sr, 2812 sr, 1569 sl, 1462 sr, 1389 sl, 1307 sr, 1114 j, 1069 sl, 1031 sl, 1006 sl, 913 sl, 863 sl, 794 sl, 739 sl, 630 sl. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): 3.70 – 3.67 (m, 4H), 2,69 – 2,65 (m, 2H), 2,47 (ps,

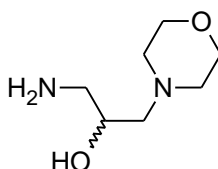
4H), 2,39 – 2,34 (m, 2H), 1,58 – 1,49 (m, 4H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): 66,19, 58,46, 53,30, 40,80, 29,86, 23,26. HRMS: m/z 159,14881 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OH}^+$ (greška u ppm -2,41).

2-(2-Hidroksi-3-morfolin-4-ilpropil)-1*H*-izoindol-1,3(2*H*)-dion (71).



Smeša kalijum-ftalimida (1,49 g, 8,07 mmol) i **66** (1,45 g, 8,07 mmol) se meša u suvom DM (67 mL) na 110 °C tokom 14 h. Rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO_2 , eluent EA/MeOH gradijent 98:2 → 8:2). Prinos: 1,64 g (70%). **71**: bezbojni prah, t.t. = 125 °C. IR (ATR): 3099 sl, 3061 sl, 3042 sl, 2992 sl, 2943 sr, 2917 sl, 2892 sl, 2853 sr, 2816 sr, 2739 sl, 2690 sl, 1766 sr, 1703 j, 1615 sl, 1460 sl, 1427 sr, 1397 j, 1323 sl, 1299 sl, 1240 sl, 1139 sl, 1112 sr, 1077 sr, 1014 sl, 931 sl, 897 sl, 858 sl, 718 sl. ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): 7,89 – 7,84 (m, 2H), 7,78 – 7,73 (m, 2H), 4,13 – 4,05 (m, 1H), 3,82 – 3,73 (m, 2H), 3,70 – 3,62 (m, 4H), 2,61 – 2,54 (m, 2H), 2,51 – 2,42 (m, 4H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 168,62, 134,00, 131,74, 123,16, 66,61, 64,79, 62,28, 53,59, 42,00. HRMS: m/z 291,13369 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{H}^+$ (greška u ppm -0,83).

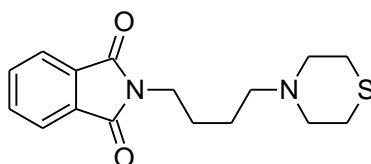
1-Amino-3-morfolin-4-ilpropan-2-ol (76).



Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku D, koristeći **71** (2,50 g, 8,61 mmol), hidrazin hidrat (1,15 g, 23,0 mmol) i etanol (80 mL). Prinos: 1,10 g (73%). **76**: bezbojna viskozna tečnost. IR (ATR): 3364 j, 3298 sr, 2929 sr, 2858 j, 2814 sr, 1597 sl,

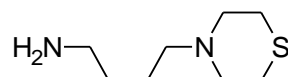
1456 sl, 1297 sl, 1274 sl, 1117 j, 1070 sl, 1037 sl, 1007 sl, 944 sl, 916 sl, 866 sl. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): 3,77 – 3,71 (m, 1H), 3,70 – 3,67 (m, 4H), 2,72 (dd, $J_1 = 13$, $J_2 = 4$, 1H), 2,58 – 2,47 (m, 5H), 2,41 – 2,33 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): 70,21, 68,00, 64,12, 55,49, 47,22. HRMS: m/z 161,12845 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{H}^+$ (greška u ppm -1,52).

2-(4-Tiomorfolin-4-ilbutil)-1*H*-izoindol-1,3(2*H*)-dion (70).



Smeša **65** (1,00 g, 3,54 mmol), tiomorfolina (0,70 g, 6,8 mmol) i kalijum-karbonata (0,80 g, 5,8 mmol) se suspenduje u suvom dioksanu (20 mL) i meša na 85 °C tokom 12 h. Višak tiomorfolina i dioksan se uklone destilacijom pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO_2 , eluent EA). Prinos: 0,92 g (85%). **70**: bezbojno viskozno ulje. IR (ATR): 3464 sl, 2939 sr, 2866 sl, 2808 sr, 2773 sl, 1771 sr, 1711 j, 1614 sl, 1465 sl, 1439 sr, 1397 j, 1368 sr, 1335 sl, 1282 sl, 1188 sl, 1110 sl, 1086 sl, 1050 sl, 958 sl, 930 sl, 864 sl, 795 sl, 720 sr, 530 sl. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 7,86 – 7,81 (m, 2H), 7,73 – 7,68 (m, 2H), 3,70 (t, $J = 7,2$, 2H), 2,70 – 2,62 (m, 8H), 2,40 – 2,35 (m, 2H), 1,72 – 1,65 (m, 2H), 1,55 – 1,48 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 168,42, 133,89, 132,11, 123,16, 58,64, 54,98, 37,80, 27,97, 26,51, 23,80. HRMS: m/z 305,13226 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{SH}^+$ (greška u ppm +1,42).

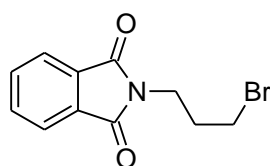
4-Tiomorfolin-4-ilbutil)amin (75).



Jedinjenje se sintetieše prema opštem postupku D, koristeći **70** (0,89 g, 2,9 mmol), hidrazin hidrat (500 mg, 10 mmol) i etanol (45 mL). Prinos: 0,465 g (91%). **75**:

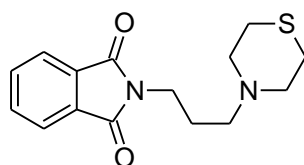
bezbojna viskozna tečnost. IR (ATR): 3356 j, 2934 j, 2865 j, 2811 j, 1574 sr, 1467 sr, 1423 sl, 1378 sl, 1322 sr, 1283 sl, 1208 sl, 1115 sr, 1005 sl, 955 sl, 777 sl, 735 sl, 705 sl, 669 sl, 635 sl, 612 sl. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD): 2,75 – 2,71 (m, 4H), 2,69 – 2,62 (m, 6H), 2,41 – 2,37 (m, 2H), 1,57 – 1,50 (m, 2H), 1,49 – 1,42 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): 60,39, 56,30, 42,55, 31,99, 28,38, 24,66. HRMS: m/z 175,12690 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{SH}^+$ (greška u ppm +3,17).

2-(3-Brompropil)-1*H*-izoindol-1,3(2*H*)-dion (64).



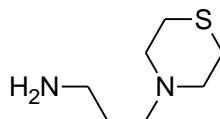
Smeša kalijum-ftalimida (1,50 g, 8,10 mmol) i 1,3-dibrompropan (8,25 g, 40,9 mmol) se suspenduje u suvom DMF (50 mL) i meša na 110 °C tokom 12 h. Višak 1,3-dibrompropana i DMF se uklone destilacijom pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO_2 , eluent heksan/EA gradijent 95:5 → 8:2). Prinos: 1,40 g (65%). **64**: bezbojni prah, t.t. = 73 °C. IR (ATR): 3460 sl, 3093 sl, 3062 sl, 3042 sl, 2966 sl, 2943 sl, 2853 sl, 1767 sr, 1714 j, 1615 sl, 1466 sl, 1434 sr, 1397 j, 1356 j, 1311 sr, 1287 sl, 1225 sr, 1188 sl, 1171 sl, 1111 sl, 1085 sl, 1044 sl, 1016 sr, 966 sl, 916 sl, 889 sl, 833 sl, 803 sl, 754 sl, 721 sr, 648 sl, 605 sl, 530 sl. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 7,88 – 7,83 (m, 2H), 7,75 – 7,70 (m, 2H), 3,84 (t, $J = 6,9$, 2H), 3,42 (t, $J = 6,8$, 2H), 2,27 (kvint, $J = 6,8$, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 168,22, 134,03, 131,98, 123,30, 36,70, 31,61, 29,75. HRMS: m/z 285,02368 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{BrNO}_2\text{H}^+$ (greška u ppm +1,29).

2-(3-Tiomorfolin-4-ilpropil)-1*H*-izoindol-1,3(2*H*)-dion (69).



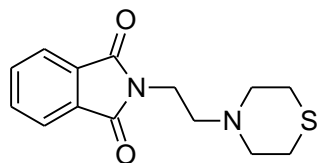
Smeša **64** (1,00 g, 3,73 mmol), tiomorfolin (0,77 g, 7,5 mmol) i kalijum-karbonat (2,06 g, 14,9 mmol) se rastvori u suvom dioksanu (50 mL) i meša na na 85 °C tokom 12 h. Višak tiomorfolina i DMF se uklone destilacijom pod sniženim pritiskom, a sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent EA). Prinos: 0,99 g (92%). **69**: bezbojno viskozno ulje. IR (ATR): 3456 sl, 3224 sl, 3103 sl, 3049 sl, 3026 sl, 2942 sr, 2911 sr, 2881 sl, 2804 j, 2771 sr, 2664 sl, 2416 sl, 2317 sl, 2244 sl, 1999 sl, 1960 sl, 1771 sl, 1699 j, 1614 sl, 1462 sr, 1442 sl, 1398 j, 1353 sl, 1333 sr, 1285 sr, 1249 sl, 1220 sl, 1173 sl, 1122 sl, 1074 sl, 1042 sl, 1022 sr, 965 sl, 930 sl, 888 sl, 860 sl, 841 sl, 800 sl, 775 sl, 718 sr, 669 sl, 634 sl. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 7,87 – 7,82 (m, 2H), 7,74 – 7,69 (m, 2H), 3,75 (t, J = 6,9, 2H), 2,67 – 2,61 (m, 4H), 2,55 – 2,50 (m, 4H), 2,42 (t, J = 6,8, 2H), 1,85 (kvint, J = 6,9, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 168,45, 133,87, 132,25, 123,09, 56,72, 54,98, 36,58, 27,85, 24,89. HRMS: *m/z* 291,11649 odgovara molekulknoj formuli C₁₅H₁₈N₂O₂SH⁺ (greška u ppm +1,07).

(3-Tiomorfolin-4-ilpropil)amin (74).



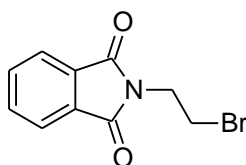
Jedinjenje se sintetiše prema opštem postupku D, koristeći **69** (337,9 mg, 1,164 mmol), hidrazin hidrat (174,5 mg, 3,486 mmol) i etanol (22 mL). Prinos: 110,0 mg (59%). **74**: bezbojna viskozna tečnost. IR (ATR): 3361 j, 2944 j, 2868 j, 2816 j, 1589 sr, 1467 sr, 1422 sr, 1378 sr, 1325 sr, 1286 sr, 1211 sl, 1124 sr, 1010 sl, 956 sr, 782 sl, 673 sl. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 2,76 – 2,65 (m, 10H), 2,42 (t, J = 7,2, 2H), 1,62 (kvint, J = 7, 2H), 1,54 (ps, 2H-N, izmenljiv sa D₂O). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 57,09, 55,09, 40,69, 30,17, 27,98. HRMS: *m/z* 161,11093 odgovara molekulknoj formuli C₇H₁₆N₂SH⁺ (greška u ppm +1,44).

2-(2-Tiomorfolin-4-iletel)-1H-izoindol-1,3(2H)-dion (68).



Smeša **63** (297,9 mg, 1,172 mmol), tiomorfolina (250,0 mg, 2,423 mmol) i kalijum-karbonata (325,2 mg, 2,353 mmol) se suspenduje u suvom dioksanu (10 mL) i meša na 85 °C tokom 12 h. Višak tiomorfolina i dioksan se uklone destilacijom pod sniženim pritiskom, pa se sirovi proizvod prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent heksan/EA gradijent 95:5 → 1:1). Prinos: 166,1 mg (51%). **68**: bezbojni prah, t.t. = 115 °C. IR (ATR): 3456 sl, 3031 sl, 3004 sl, 2954 sl, 2929 sr, 2808 sr, 1767 sr, 1710 j, 1610 sl, 1469 sr, 1439 sr, 1400 j, 1328 sr, 1292 sr, 1216 sl, 1190 sl, 1162 sl, 1136 sl, 1108 sl, 1046 sl, 1024 sr, 956 sl, 874 sl, 808 sl, 722 sr, 631 sl, 529 sl. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 7,87 – 7,82 (m, 2H), 7,74 – 7,70 (m, 2H), 3,80 (t, J = 6,5, 2H), 2,80 – 2,75 (m, 4H), 2,65 (t, J = 6,5, 2H), 2,61 – 2,56 (m, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 168,33, 133,85, 132,14, 123,16, 56,20, 54,88, 35,08, 27,98. HRMS: *m/z* 277,09985 odgovara molekulknoj formuli C₁₄H₁₆N₂O₂SH⁺ (greška u ppm -2,42).

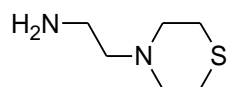
2-(2-Brometil)-1H-izoindol-1,3(2H)-dion (**63**).



Ftalimid (1,00 g, 6,80 mmol), kalijum-karbonat (2,82 g, 20,4 mmol) i tetrabutilamonijum-bromid (0,22g, 0,68 mmol) se pomešaju i usitne u avanu. Smeša se prenese u balon okruglog dna, pa se doda 1,2-dibrometan (3,83 g, 20,4 mmol). Smeša se sporadično meša špatulom, a nakon 1 h smeša se rastvori u dihlormetanu. Rastvor se ispere vodom, posle čega se suši iznad anhidrovanog natrijum-sulfata. Sušilo se ukloni ceđenjem, pa se rastvarač i višak 1,2-dibrometana uklone destilacijom pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (dry flash, SiO₂, eluent heksan/EA gradijent 95:5 → 1:1). Prinos: 1,15 g (66%). **63**: bezbojni prah, t.t. = 78 °C. IR (ATR): 3465 sl, 3094 sl, 3046 sl, 2947 sl, 2915 sl, 2852 sl, 1767 sr, 1712 j,

1609 sl, 1511 sl, 1469 sl, 1431 sr, 1396 j, 1360 sr, 1329 sr, 1255 sl, 1230 sl, 1189 sl, 1170 sl, 1088 sl, 1070 sr, 1030 sl, 1008 sl, 977 sl, 926 sl, 866 sl, 804 sl, 726 sr, 716 sr, 602 sl, 531 sl, 510 sl. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 7,90 – 7,86 (m, 2H), 7,77 – 7,73 (m, 2H), 4,12 (t, $J = 6,8$, 2H), 3,62 (t, $J = 6,8$, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 167,79, 134,20, 131,82, 123,50, 39,27, 28,11. HRMS: m/z 253,98135 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{BrNO}_2\text{H}^+$ (greška u ppm +0,91).

(2-Tiomorfolin-4-ilet)amin (73).



Jedinjenje se sintetise prema opštem postupku D, koristeći **68** (0,50 g, 1,8 mmol), hidrazin hidrat (0,27 g, 5,4 mmol) i etanol (27 mL). Prinos: 135,3 mg (52%). **73**: bezbojna viskozna tečnost. IR (ATR): 3364 j, 2933 j, 2874 sr, 2818 j, 1689 sr, 1570 sr, 1483 j, 1424 sr, 1366 sr, 1342 sr, 1322 sr, 1302 sr, 1226 sl, 1208 sl, 1169 sl, 1120 sr, 1054 sl, 1011 sl, 960 j, 870 sl, 813 sl, 771 sl, 750 sl, 670 sl. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): 2,77 (t, $J = 6,2$, 2H), 2,75 – 2,70 (m, 4H), 2,70 – 2,65 (m, 4H), 2,43 (t, $J = 6$, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 61,72, 55,16, 38,58, 28,01. HRMS: m/z 147,09486 odgovara molekulknoj formuli $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{SH}^+$ (greška u ppm -1,28).

4.2. Vezivanje jedinjenja za proteine plazme

Humani serum albumin (HSA), alfa-1-kiseli glikoprotein (AGP), kalijum-dihidrogenfosfat, dinatrijum-hidrogenfosfat, natrijum-hlorid, kalijum-hlorid i DMSO su kupljeni od kompanije Sigma-Aldrich. Spektri fluorescencije se snimaju na Horiba Jobin Yvon Fluoromax-4 spektrometru, opremljenom Peltierovim elementom i sistemom za magnetno mešanje sadržaja kiveta. Koriste se kvarcne ćelije, dužina puta svetlosti je 1 cm, a zapremina 4 mL. UV/vis spektri se snimaju na Thermo Scientific Evolution 60S spektrometru. Koriste su kvarcne ćelije, dužina puta svetlosti je 1 cm, a zapremina 4 mL. Svi UV/Vis spektri se snimaju sa slepom probom, u oblasti 200-500

nm, brzinom 500 nm/min. pH vrednosti se određuju potenciometrijski koristeći Crison pH-biretu 24 2S opremljenu mikrokombinovanom pH elektrodom (Crison pH electrode 50 29). pH elektrode se kalibrišu standardnim Crisonbuffer rastvorima (pH 4,01, 7,00 i 9,21). Standardni rastvori AGP ($c = 6,05 \times 10^{-5}$ M) i HSA ($c = 1,91 \times 10^{-4}$ M) se prave u fosfatnom puferu (1×, pH 7,34) i čuvaju se u frižideru. Koncentrovani rastvori jedinjenja se prave u DMSO. Rastvori koji se koriste za procenu interakcija između jedinjenja i proteina prave se razblaživanjem koncentrovanih rastvora puferom, pri čemu je koncentracija uvek konstantna – $c = 5 \times 10^{-7}$ M. Rastvori se titruju standardnim rastvorima jedinjenja (molski odnos jedinjenje/protein od 1 do 20). Tokom titracije rastvori se mešaju i termostatiraju ($t = 25,0 \pm 0,1$ °C, regulisano Peltierovim elementom). Vreme uravnotežavanja između inkremenata titranta je 10 min. Talasna dužina ekscitacije je 250 nm, a emisioni spektri se snimaju u oblasti 300–450 nm, sa slitovima od 5 nm i vremenom integracije 0,1 s. Pozadinski signal fosfatnog pufera se oduzima od svakog spektra. Intenzitet fluorescencije se koriguje zbog efekta unutrašnjeg „filtera“ merenjem apsorbance na talasnim dužinama ekscitacije i emisije.

4.3. Čelijske linije i čelijske kulture

HeLa ćelije (ATCC) i ćelije ljudskih fibroblasta prepucijuma (HFF; ATCC) se održavaju na 37 °C i u 5% CO₂ u minimalnom esencijalnom medijumu (MEM; Corning Cellgro) suplementovanom sa 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, Hyclone).

4.4. Virus

EBOV/ H. sapiens-wt/1995/Kikwit-9510621 (referentni genom GenBank # KT582109; EBOV) iz zaliha United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID) se koristi za inficiranje u laboratorijama sa nivoom 4 biosigurnosti (BSL-4) u USAMRIID.

4.5. Kvantifikacija EBOV infekcije i drugih fenotipova postupkom *High Content Imaging*

Ćelije inficirane EBOV se fiksiraju u 10% formalinu (Val Tech Diagnostics) u toku 24 h na sobnoj temperaturi. Ćelije se izazivaju imunofluorescencijom da bi bio kvantifikovan eksprimovani EBOV-GP korišćenjem monoklonskih antitela za EBOV (6D8), nakon čega se upotrebljava Dylight488-konjugovani kozji anti-mišji IgG (ThermoFisher Scientific) u bloking fosfatnom puferu sa 3% goveđeg serum albumina (Sigma). DRAQ5 (Biostat) se koristi za izazivanje jedara (za analizu aktivnosti u funkciji koncentracije (*dose response curve analysis* [DRA])). U nekim slučajevima ćelije se takođe boje Hoechst 33342 i HCS CellMask Red reagensima (ThermoFisher Scientific) radi vizualizacije jedara, odnosno citoplazme. Slike se dobijaju na Opera imaging instrumentu (modeli 3842 i 5025; PerkinElmer) uz upotrebu $\times 10$ vazdušna- (za DRA), $\times 20$ vodena- ili $\times 40$ vodena sočiva objektiva. Iz svakog bunarčića dobija se od 4 do 20 slika. Korišćenjem Acapella (Perkin Elmer) određuje se ukupan broj ćelija (na osnovu izazivanja jedara) odnosno ukupan broj inficiranih ćelija (ćelije pozitivne na GP). Za veću rezoluciju slika koristi se Leica TCS-SP5 konfokalni/multifotonski mikroskop.

4.5. *Dose response* analiza (DRA)

Aktivnost jedinjenja protiv virusa ebole, uključiv EC_{50} i EC_{90} , što su efektivne koncentracije jedinjenja koje postižu 50%, odnosno 90% inhibiranja infekcije, kao i CC_{50} (50% citotoksičnosti) određuju su *dose response* analizom. Jedinjenja se testiraju na 10 različitih koncentracija, dvostrukim razblaživanjem koncentrovanijih rastvora jedinjenja, počevši od 10 μM , u četiri replikata ($n = 4$), na istoj mikrotitar ploči. Podaci u tabelama sa aktivnošću predstavljaju podatke iz jednog od dva istovetna eksperimenta izvedena u dva različita dana. Ukratko, HeLa ćelije se zaseju u količini od oko 2000 ćelija po bunarčiću u 35 μL medijuma na mikrotitar pločama sa 384 bunarčića (IQ-EB, Aurora) uz upotrebu automatskog MultidropTM Combi dispensera (cat # 5840300, ThermoFisher Scientific). Posle inkubacije preko noći na 37 °C ćelije se prethodno

tretiraju u toku 2 h jedinjenjima koristeći automatski HP-D300, pri čemu se svaka doza preuzima direktno iz standardnih koncentrovanih rastvora (10 mM). Čelije se tada inficiraju virusom (MOI = 0,5) u toku 48 h, posle čega sledi imunofluorescentna analiza za detekciju ćelija koje ekspresuju EBOV-GP. Prave se četiri slike po bunarčiću i sve se podvrgavaju analizi na već opisan način. Podaci se evaluiraju naknadno u GeneData Explorer softveru, na sledeći način: procenat (%) ćelija pozitivnih na prisustvo virusa u svakom bunarčiću prevodi se u procenat inhibicije koristeći medijana podatke iz kontrolnih bunarčića, prema formulama:

NC = neutralna kontrola (16 bunarčića po ploči); infekcija + DMSO (simulirani tretman; *mock treatment*)

BC = blanko kontrola (16 bunarčića po ploči); bez infekcije (prividni pozitivni ishodi usled pozadinskog zagađenja prilikom izazivanja antitelima)

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{\text{medijana\% pozitivnih na virus (NC)} - \% \text{ pozitivnih na virus (S)}}{\text{medijana\% pozitivnih na virus (NC)} - \% \text{ pozitivnih na virus (BC)}} * 100$$

Na sličan način procenat vijabilnosti ćelija računa se koristeći sledeću jednačinu, pri čemu se dobija broj ćelija u bunarčiću u odnosu na broj ćelija u inficiranim bunarčićima kod kojih je inficiranje simulirano (*mock treatment*), odnosno ćelije su tretirane samo rastvaračem (DMSO):

$$\% \text{ ćelijske vijabilnosti} = \frac{\text{broj jedara}}{\text{medijana broja jedara (NC)}} * 100$$

Procenat inhibicije i ćelijske vijabilnosti potom se upotrebljava za određivanje EC_{50} , EC_{90} i CC_{50} vrednosti, uz upotrebu GeneData Condoseo softvera sa LevenbergMarquardt algoritmom (LMA) za fitovanje krivih. Prilikom fitovanja krivih primenjuju se kriterijumi validnosti kao što su $aschi^2$, SE $\log EC_{50}$ i minimalan broj validnih tačaka što indikuje uspešnu konvergenciju fitovanja. Vrednost R2 ukazuje na kvalitet fitovanja, pri čemu se vrednost veća od 0,8 smatra prihvatljivom. Relativna efikasnost jedinjenja odslkava se i kroz indeks selektivnosti (SI), koji predstavlja količnik efektivne i toksične koncentracije, po formuli $SI = CC_{50}/EC_{50}$. Poželjna je što veća vrednost SI.

4.6. Studije *in vivo* efikasnosti

Grupe miševa (BALB/c miševi; n = 10 po grupi), starih 6-7 nedelja, tretira se samim rastvaračem, ili u rastvaraču rastvorenim **11 (ZS48)**, **19 (ZS62)**, **13 (ZS64)**, **16 (ZS67)**, **34 (ZSML08)**, **55 (ZS102)** ili **35 (ZS103)** u navedenim dozama, primenjenim intraperitonealnim putem (IP). Nakon 2 h od primene jedinjenja miševi se inficiraju (IP) virusom ebole (varijanta Mayinga; 1000 PFU) adaptiranim za upotrebu na miševima. Tretman se nastavlja narednih šest dana, pri čemu miševi primali jednu dozu terapeutika dnevno. Preživljavanje miševa se prati ukupno 14 dana. Sva jedinjenja imaju rastvorljivost ≥ 25 mg/mL u dejonizovanoj vodi. Kaplan–Meier-ovi grafikoni preživljavanja se generišu u GraphPad Prism softveru. *P*-vrednosti se evaluiraju poređenjem “krivih” preživljavanja individualnih doza sa kontrolnom grupom koristeći log-rank test. Svi ogledi na miševima se sprovede u skladu sa protokolima odobrenim od IACUC-a i u saglasnosti sa Aktom o dobrobiti životinja, PHS smernicama i drugim saveznim regulativama o eksperimentima na životinjama u Sjedinjenim Državama. Ustanove u kojima su ogledi izvedeni akreditovane su od strane Međunarodne asocijacije za procenu i akreditaciju brige o životinjama u laboratorijama i rade u skladu sa principima navedenim u Smernicama za staranje i upotrebu laboratorijskih životinja, *National Research Council* Sjedinjenih Država, 2011.

4.7. Evaluacija ulaska virusa u ćeliju u funkciji vremena dodatka jedinjenja – TCA esej

HeLa ćelije se zaseju u koncentraciji od približno 2×10^4 ćelija po bunarčiću na mikrotitar ploče sa 96 bunarčića. Narednog dana ćelije se tretiraju, ili se tretman jedinjenjima simulira (*mock treatment*), 2 h pre infekcije, ili istovremeno sa infekcijom (0 h), ili u nekom trenutku posle infekcije, kako je naznačeno. Ćelije se inficiraju virusom ebole, MOI = 10. Nakon 24 h ćelije se podvrgavaju IFA, potom HCA radi utvrđivanja procenta ćelija koje ekspimiraju EBOV-GP. Eksperimenti se izvode u triplikatu, a prikazuje se prosek dva nezavisna eksperimenta (\pm standardna devijacija).

4.8. Esej ulaska pseudotipovanog virusa u ćeliju

Infektivni rekombinantni virus vezikularnog stomatitisa (rVSV) koji eksprimuje zeleni fluorescentni protein (GFP, [rVSV-GFP]) je poklon dr Džona Konora (John Connor, Boston University), dok je rVSV-GFP u kom je GP VSV-a zamenjen glikoproteinom ebole (EBOV-GP, GP cDNK izvedena iz Mayinga izolata) poklon dobijen od dr Kartika Čandrana (Kartik Chandran).¹⁷⁶ Virus se propagira u Vero E6 ćelijama i infekcije se vrše u BSL-2 uslovima. Ukratko, ćelije se inficiraju virusom (MOI = 0,1), pa se nakon 3-4 dana, onda kada je preko 50% ćelija citopatično, skupljaju supernatanti. Supernatanti koji sadrže virus se izbistre i skladište na -80 °C. Različite zapremine supernatanta koriste se za infekciju HeLa ćelija, u mikrotitar pločama sa 96 bunarčića, počevši od 100 µL i razblažujući u svakom koraku 2/3 puta, praveći ukupno 20 rastvora. Na ovaj način određuje se koja doza je optimalna za stepen infekcije HeLa ćelija 60-70%. Takođe, određuje se vreme neophodno za opažanje inicijalne ekspresije GFP čak i pre nego što virus zaokruži jedan pun životni ciklus (*imaging*-om živih ćelija uz snimanje svakih 15 minuta u Operi). Vreme od 8 h sa rVSV-EBOV-GP, odnosno 6 h sa rVSV-GFP, bilo je optimalno za merenje količine eksprimovanog GFP kod obe vrste infekcije u toku prvog životnog ciklusa virusa. Infekcije se ocenjuju određivanjem procenta eksprimovanog GFP koristeći HCA. Ćelije i jedra se izazivaju pomoću Cell MaskDeep Red. Za procenu dejstva jedinjenja na ulazak virusa, HeLa ćelije (u mikrotitar pločama sa 96 bunarčića) se prethodno tretiraju 2 h sa DMSO (kontrola) ili jedinjenjima u naznačenim koncentracijama, nakon čega se inkubiraju sa rVSV-GFP (10 µL) ili rVSV-EBOV-GP-GFP (50 µL) u triplikatu. Infekcije se zaustavljaju formalinom nakon 6 h, odnosno nakon 8 h. Trajanje infekcije je taman toliko da omogući rane faze virusnog ciklusa uključujući ulazak virusa u ćeliju i replikaciju (što se vidi po ekspresiji GFP), ali ne i pupljenje novih viriona.¹⁹⁷ Količina eksprimovanog GFP se određuje koristeći HCA.

4.9. Vizualizacija jedinjenja i kiselih odeljaka

Kiseli odeljci ili vezikule vizualizuju se *imaging*-om živih ćelija, uz upotrebu LysoSensor DND 189 reagensa (ThermoFisher Scientific) ili akridin-oranža ([AO], ImmunoChemistry). Ćelije se simulirano tretiraju (*mock treatment*) ili prethodno tretiraju jedinjenjima u naznačenim vremenskim periodima. Ćelije se potom inkubiraju LysoSensor DND 189 probom ili akridin-oranžom koncentracije 0,5 μ M na 37 °C u toku 30 min. Ćelije se tada ispiraju, dodaje se svež medijum i vrši se snimanje konfokalnom mikroskopijom. LysoSensor DND 189 se vizualizuje uz ekscitaciju na 443 nm i emisiju na 505 nm. Monomerni AO (onakav kakav se vezuje za nukleinske kiseline) se vidi u zelenoj oblasti uz ekscitaciju na 460-490 nm i emisiju na 520-560 nm, dok dimeri i oligomeri AO fluoresciraju u crvenoj oblasti na 590-640 nm, uz ekscitaciju na 520-560 nm. Jedinjenja **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** su fluorescentna, i nakon snimanja odgovarajućih spektara, utvrđeno je da se ovi derivati najbolje detektuju na 450 nm, uz ekscitaciju na 405 nm.

4.10. Aktivnost katepsina B

Esej sa Magic Red reagensom za određivanje aktivnosti katepsina B (ImmunoChemistry) koristi se za kvantifikaciju aktivnosti, primenom *imaging*-a živih ćelija. Magic Red, kao supstrat, slobodno difunduje u ćelije i emituje crvenu fluorescenciju nakon lize katepsinom B. Eksperimenti se vrše prema proceduri proizvođača. Ukratko, ćelije se prethodno tretiraju kontrolom (simulirano tretiraju; *mock treatment*) ili rastvorima jedinjenja **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** naznačenog vremenskog perioda. Supstrat katepsina B se dodaje u konačnom razblaženju 1:260. Ćelije se inkubiraju 1 h na 37 °C, nakon čega sledi ispiranje i vizualizacija fluorescencijom, uz ekscitaciju na 590 nm i emisiju na 630 nm.

4.11. Statistička analiza

Kao što je kod odgovarajućih eksperimenata naznačeno, p -vrednosti se evaluiraju koristeći One Way Anova analizu, kroz višestruke t testove. ***, $p < 0,001$. **, $p < 0,01$.

4.12. Detekcija autofagije

HeLa-GFP-LC3-stabilna ćelijska linija se generiše retroviralnom transdukcijom upotrebom pBABE-GFP-LC3 (poklon Jayanta Debnatha [Addgene plasmid # 22405]).¹⁹⁸ Ćelije se selektuju na Puromycin-u ([2 $\mu\text{g/mL}$], Sigma) tokom sedam dana. Potom se izvrši selekcija samo onih ćelija koje eksprimuju LC3-GFP u maloj ili srednjoj meri, a onda se analizira aktivnost reportera. Ove ćelije koriste se za sve opisane eksperimente. Radi vizualizacije GFP-LC3 klastera, ćelije se zasejavaju na mikrotitar pločama sa 96 bunarčića, a narednog dana tretiraju jedinjenjima u osam replikata pri koncentracijama koje su naznačene kod eksperimenata na 6 h. Ćelije se nakon toga ispiraju i vizualizuju pomoću Operetta 20 X vodenog objektiva na više Z-ravni da bi se videli GFP klasteri. Slike se prikupljaju iz 20 polja po bunarčiću i oko 300 ćelija po bunarčiću. Potom se slike spajaju i tada se analizira prisustvo GFP klastera pomoću Columbus softvera.¹⁹⁹

Za *Western blot* analizu HeLa-GFP-LC3 ćelije se izbroje i zaseju u jednakom broju u sudovima sa 12 bunarčića. Narednog dana, ćelije se tretiraju naznačenim jedinjenjima tokom 6 h, nakon čega se ćelije liziraju u 100 mL pufera 1,25X Laemmli (ThermoScientific) i kuvaju na 95 °C tokom 5 minuta. Proteini se razdvajaju SDS-PAGE (elektroforezom) i prebacuju na polivinilidenske (PVDF) membrane. Blotovi se inkubiraju na sobnoj temperaturi tokom 1 h ili preko noći na 4 °C sa naznačenim primarnim antitelima. Nakon tri pranja, blotovi se inkubiraju sa odgovarajućim (AP)-konjugovanim sekundarnim antitelima baznih fosfataza (GE Healthcare), prema preporuci proizvođača. Blotovi se operu i razvijaju vestern blotting detekcionim sistemom (GE Healthcare). Sledeća antitela koriste se za vestern blot: LC3 (Abcam),

GFP (BD Transduction), GAPDH (Cell Signaling), i sekundarna (AP)-conjugovana antitela (ThermoScientific).

4.13. Elektronska mikroskopija

HeLa ćelije se uzgajaju u sudu sa 6 bunarčića i tretiraju se jedinjenjima tokom 2 h, nakon čega se inficiraju pomoću rVSV-EBOV-GP-GFP (MOI = 100) tokom naznačenog vremenskog perioda. Ćelije se fiksiraju 1 h primarnim fiksativom (2,5% formaldehid, 2,5% glutaraldehid, 0,1 M natrijum-kakodilat, pH 7,4), nakon čega se sastružu radi prikupljanja ćelijskog peleta. Ćelije se ispraju tri puta 0,1 M natrijum-kakodilatnim puferom, prethodno ohlađenim na ledenom kupatilu, a potom se inkubiraju 1% osmijum-tetroksidom u 0,1 M natrijum-kakodilatu. Posle toga se ćelije ispiraju tri puta destilovanom vodom, a onda stabilizuju na ledu 2% uranil-acetatom tokom 1 h i napokon dehidrišu sukcesivnim tretiranjem 22%, 50%, 75% i 95% etanolom. Potom se ćelije dehidrišu tri puta na sobnoj temperaturi apsolutnim etanolom, a onda infiltriraju 1 h u dobro izmešanu smešu 1:1 etanol:Durcupan ACM perle (Fluka, Sigma-Aldrich). Ćelije se onda infiltriraju dva puta 100% pomoću Durcupan ACM 3 h uz agitaciju, a potom unose u rernu i polimerizuju na 60 °C tokom 48 h. Tanki uzorci (približno 80 nm) skupljaju se i izazivaju 1% uranil-acetatom i Sato olovom, da bi naposletku bili analizirani pomoću JEOL 1011 transmisionog elektronskog mikroskopa na 80 kV. Digitalne slike se snimaju ATM kamera uređajem.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije sintetisano je 17 novih 4,10-diazahrizenskih i 12 1,5-naftiridinskih derivata. Sintetisane diazahrizenske strukture predstavljaju desmetil-analoge ranijih jedinjenja razvijanih u saradnji USAMRIID i grupe profesora Bogdana Šolaje.

Ispitana je sposobnost ovih 29 jedinjenja da inhibiraju virus ebole u *in vitro* uslovima, kao i njihove citotoksičnosti. Najaktivniji derivati podvrgnuti su različitim testovima za utvrđivanje toksičnosti u HepG2 ćelijama, miševima i zebricama, kao i ispitivanjima ADME svojstava, određivanju jačine vezivanja za proteine plazme i kiselo-baznih svojstava. Pet najaktivnijih diazahrizenskih derivata, kao i dva naftiridina, podvrgnuto je *in vivo* eseu za određivanje antivirusne aktivnosti na miševima. Na posletku, urađen je veći broj eksperimenata sa dva najpotentnija jedinjenja, **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)**, kao i kontrolnim jedinjenjima **CQ** i **AQ**, sa ciljem rasvetljavanja mehanizma dejstva ovih molekula.

Razvijen je i postupak za sintezu diazahrizena supstituisanih dvema različitim alkilamino-grupama. U *in vitro* eseu pokazalo se da desmetil-jedinjenja imaju unapređenu aktivnost u odnosu na metil-analoge. Najaktivnija jedinjenja iskazala su $EC_{50} < 1 \mu\text{M}$, pri čemu su najveću efikasnost pokazali derivati **13 (ZS64)** ($EC_{50} = 0,34 \mu\text{M}$, HeLa ćelije) i **34 (ZSML08)** ($EC_{50} = 0,26 \mu\text{M}$, HeLa ćelije). Naftiridinski derivati, zamišljeni kao manji, polarniji analozi diazahrizena, iskazali su, u proseku, lošiju aktivnost od diazahrizena. Jedini naftiridin sa submikromolarnom EC_{50} bio je **35 (ZS103)** ($EC_{50} = 0,78 \mu\text{M}$, HeLa ćelije). U *in vivo* studiji najbolju aktivnost pokazala su jedinjenja **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)**, koja su štitila 10/10, odnosno 9/10, miševa pri dozi 10 mg/kg primenjivanoj jednom dnevno u toku sedam dana (standardni test). Ovakvim rezultatom diazahrizenski derivati **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** svrstali su se u red najpotentnijih poznatih antifulovirusnih agenasa.

Utvrđeno je da su **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** prisutni u niskoj, ali konstantnoj koncentraciji u krvi miševa koji su izlagani dozama jedinjenja dvostruko višim od

najviših koje se primenjuju u *in vivo* testu. Zebrice i zdravi miševi dobro su tolerisali ova dva jedinjenja, što ukazuje da je reč o bezbednim molekulima. Naelektrisanje diazahrizenskih derivata **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** na pH krvi iznosi manje od +1, što bi moglo da omogući brži ulazak u zaražene ćelije diazahrizena u odnosu na naftiridine (kod naftiridinskih derivata **55 (ZS102)** i **35 (ZS103)** pri istim uslovima naelektrisanje je gotovo +2).

Prilikom ispitivanja mehanizma dejstva diazahrizena utvrđeno je da je reč o lizomotropnim jedinjenjima, što je jedna od karakteristika molekula sa CAD strukturnim karakteristikama. Derivati **34 (ZSML08)** i **11 (ZS48)** dospevaju u kasne endosome/lizosome, gde sprečavaju njihovo normalno funkcionisanje, čime istovremeno onemogućavaju transfer virusa u citosol. Virus ebole ostaje zarobljen u kiselim odeljcima ćelije i ne dolazi do infekcije. Ipak, za razliku od kontrolnih jedinjenja i tipičnih predstavnika jedinjenja tipa CAD – hlorokina i amodiakina – o kojima postoji veći broj publikacija, diazahrizeni brže dospevaju u lizosome, akumuliraju se u njima, uvećavaju ih, sprečavaju njihovu fuziju sa drugim vezikulama i inhibiraju aktivnost katepsina B i L, ne dovodeći pritom do alkalizacije lumena kasnih endozoma/lizozoma.

Iz svega navedenog, pokazano je da su jedinjenja razvijena u ovoj disertaciji značajna i jedinstvena i da zavređuju dalja ispitivanja.

6. CONCLUSION

In the course of our research 17 4,10-diazachrysene and 12 1,5-naphthyridine derivatives were synthesized. The diazachrysene structures represent desmethyl analogues of compounds developed earlier within the cooperation between USAMRIID and professor Šolaja's research group.

The ability of these compounds to inhibit the Ebola virus under *in vitro* conditions (cell-based assays) was tested, as well as their cytotoxicity. The most active derivatives were subjected to toxicity profiling in HepG2 cells, mice and zebrafish, as well as to ADME tests, plasma protein binding assessments and acidity/basicity evaluation. Five of the most active diazachrysene derivatives, and two naphthyridine derivatives were subjected to a *in vivo* anti-EBOV assay in mice. Finally, in order to determine the mechanism of action, a number of experiments have been performed with the two most potent compounds, **34 (ZSML08)** and **11 (ZS48)**, and also with the control compounds **CQ** and **AQ**.

A procedure was developed for the synthesis of diazachrysenes substituted with two different alkylamino groups as well. The *in vitro* assay results showed that the desmethyl compounds have an improved activity compared to their methyl predecessors. The most potent derivatives have $EC_{50} < 1 \mu\text{M}$, with **13 (ZS64)** ($EC_{50} = 0.34 \mu\text{M}$, HeLa cells) and **34 (ZSML08)** ($EC_{50} = 0.26 \mu\text{M}$, HeLa cells; $0.21 \mu\text{M}$, HFF cells) being the most active. Naphthyridine derivatives, envisioned as smaller, more polar analogues of diazachrysenes, exhibited a poorer potency, on average. The only naphthyridine derivative with submicromolar EC_{50} was **35 (ZS103)** ($EC_{50} = 0.78 \mu\text{M}$, HeLa cells). The *in vivo* assay results showed that **34 (ZSML08)** and **11 (ZS48)**, protected 10/10, and 9/10 mice, respectively, with a 10 mg/kg dose administered once daily for seven days (standard test).

It has been determined that **34 (ZSML08)** and **11 (ZS48)** are present at a low, but constant level in the blood of mice treated with the compounds in doses twice as high as those in the *in vivo* test. These two compounds were well tolerated in zebra fish and

healthy mice. The charge of **34 (ZSML08)** and **11 (ZS48)** was determined to be less than +1 at blood pH, which could result in these compounds being able to penetrate host cells faster than the naphthyridines (**55 (ZS102)** and **35 (ZS103)** were shown to have a charge of almost +2 under the same conditions).

The mechanism of action demonstrated that our compounds are lysosomotropic, which is one of the characteristics of CAD compounds. Derivatives **34 (ZSML08)** and **11 (ZS48)** enter late endosomes/lysosomes and prevent their normal functioning, simultaneously preventing the transfer of the virus to the cytosol. The virus remains trapped within acidic compartments, thereby infection does not occur. However, unlike the control compounds and typical CADs – chloroquine and amodiaquine – which have been analyzed in a number of publications, diazachrysenes enter the lysosomes faster, accumulate in them, expand them, prevent their fusion with other vesicles and inhibit the activity of cathepsins B and L, while at the same time they do not alkalize the lumen of late endosomes/lysosomes.

The aforementioned observations demonstrate that the compounds which were developed in this thesis are noteworthy, unique, and that they warrant further exploration.

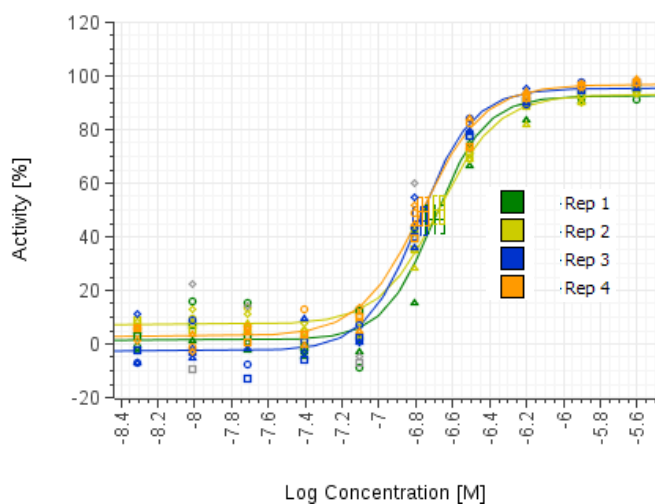
7. PRILOG

1. Statistika kontrolnog jedinjenja u *in vitro* esaju određivanja biološke aktivnosti

Tabela P1.

Index	Cell line	Pathogen	MOI	Plate ID	Date	Well Masking	Nuclei - Number, NC	% Infection	Z' Factor	# of Analyzed Fields	EC50 (uM)	SD
1	HeLa	EBOV	0.5	AA00000913	2/3/2016	0.26%	5228	69.24	0.75	5	0.2	0.02
2	HeLa	EBOV	0.5	AA00000914	2/3/2016	0.00%	5281	70.19	0.78	5	0.2	0.01
3	HeLa	EBOV	0.5	AA00000915	2/4/2016	0.00%	4648	74.95	0.83	5	0.2	0.01
4	HeLa	EBOV	0.5	AA00000916	2/4/2016	0.00%	4454	72.66	0.78	5	0.2	0.01

Slika P1.



2. ADME studija¹⁵⁹

Tabela P2.

ADME svojstva	Jedinica	Dobro	Srednje	Loše
Čistoća	%	> 90		
Rastvorljivost	pH 7,4 (µg/mL)	> 50	10 – 50	< 10
Stabilnost u mikrozomima	T _{1/2} (min)	> 30	15 - 30	< 15
	CL _{int} (µL/min/mg)	< 46	46 - 92	> 92
Stabilnost u plazmi	% nakon 1 hr	> 85	20 - 85	< 20
Inhibicija CYP450	% inhibicije na 3 µM	< 15	15 - 50	> 50
	IC ₅₀ (µM)	> 10	1 - 10	< 1
MDR1-MDCKII	P _{app} (a-b, 10 ⁻⁶ cm/s)	> 20	2 - 20	< 2
	Pgp efluks odnos	< 1,5	1,5 – 2,5	> 2,5

Permeabilnost:

Tabela P3: Prividna permeabilnost **34 (ZSML08)** u dva tehnička replikata za svaki od tri biološka replikata

datum eseja	REP 1	REP 2	REP 1	REP 2
27. jul 2017.	PAPP A→B ± SD	PAPP A→B ± SD	PAPP B→A ± SD	PAPP B→A ± SD
atenolol	0,39 ± 0,07	0,15 ± 0,05	0,43 ± 0,02	0,30 ± 0,01
prazosin	27,87 ± 0,5	27,62 ± 0,48	54,02 ± 1,32	48,58 ± 1,18
propranolol	39,03 ± 0,73	38,26 ± 0,63	42,86 ± 1,31	41,56 ± 1,24
34 (ZSML08)	45,82 ± 33,22	67,21 ± 40,14	55,57 ± 13,70	67,29 ± 10,20

Tabela P4: Prividna permeabilnost **34 (ZSML08)** u tri biološka replikata

datum eseja 9. avgust 2017.	PAPP A→B ± SD	PAPP B→A ± SD
atenolol	0,79 ± 0,15	0,59 ± 0,12
prazosin	30,02 ± 0,56	58,87 ± 1,32
propranolol	37,74 ± 1,81	41,90 ± 0,81
34 (ZSML08)	39,29 ± 25,40	43,16 ± 9,13

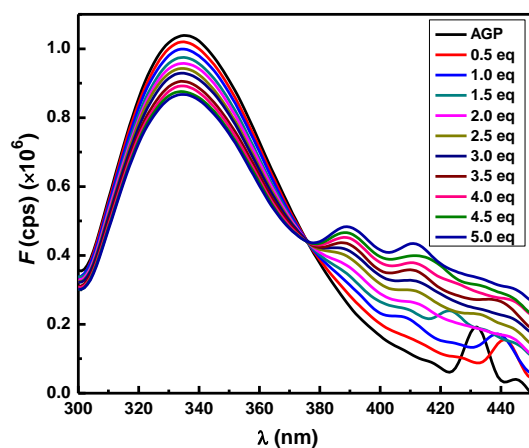
Eseji su vršeni na MDCK modelu intestinalne apsorpcije. Standardna devijacija za konstante prividne permeabilnosti za jedinjenje **34 (ZSML08)** je velika. Prikazana standardna jedinjenja (atenolol, prazosin i propranolol) testirana su na istoj ploči i u isto vreme kao jedinjenje **34 (ZSML08)**, i nemaju veliku standardnu devijaciju. Tehnička ponavljanja u tabeli P3 su odvojeni analitički ranovi ista tri biološka replikat, urađena u istom danu. Tabela P4 prikazuje rezultate bioloških replikata i jednog analitičkog rana koji su urađeni posebnog dana, sa uzorcima korišćenim za generisanje rezultata u tabeli P3.

Čak i sa velikim vrednostima standardne devijacije, prividna permeabilnost jedinjenja **34 (ZSML08)** nagoveštava umerenu ili visoku permeabilnost.

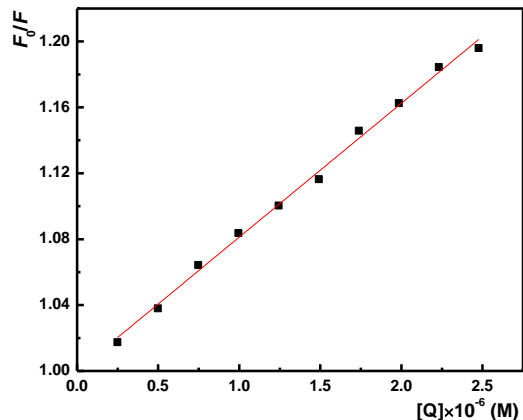
3. Fluorescencija i UV-Vis spektri dobijeni u eksperimentima vezivanja za HSA i AGP

Jedinjenje 11 (ZS48)

AGP:



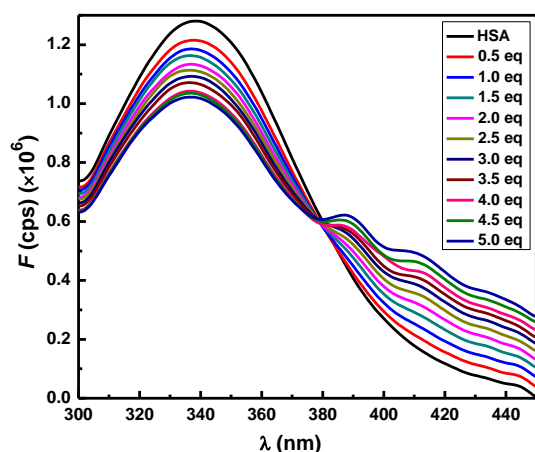
Slika P2. Promene u fluorescentnim emisionim spektrima AGP po dodatku jedinjenja **11 (ZS48)** (1-5 moljskih ekvivalenata); $T = 298,0 \text{ K} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 mM PBS, $\text{pH} = 7,35$.



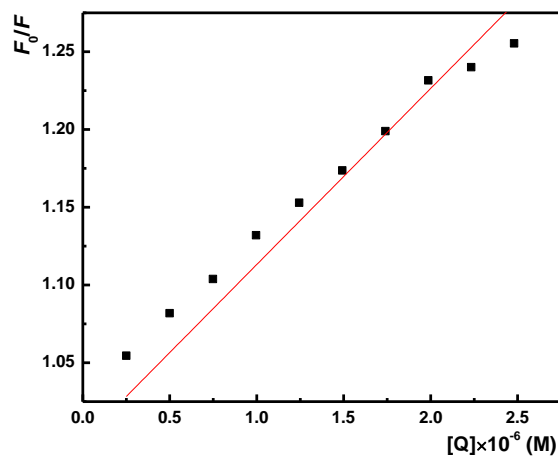
Slika P3. The Stern-Volmer plot za vezivanje jedinjenja **11 (ZS48)** za AGP. $y = 1 + 81248,0 x$.

$$K_{sv} = (8,12 \pm 0,07) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

HSA:



Slika P4. Promene u fluorescentnim emissionim spektrima HSA po dodatku jedinjenja **11 (ZS48)** (1-5 moljskih ekvivalenata); $T = 298,0 \text{ K} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 mM PBS, $\text{pH} = 7,35$.

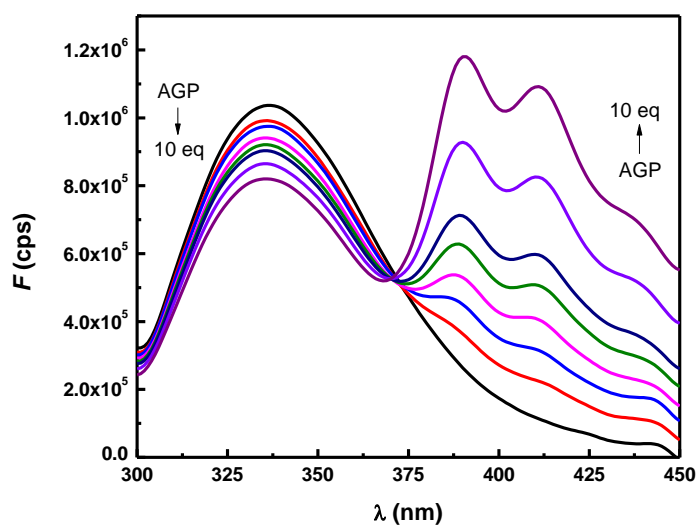


Slika P5. The Stern-Volmer plot za vezivanje jedinjenja **11 (ZS48)** za HSA. $y = 1 + 113185,8 x$.

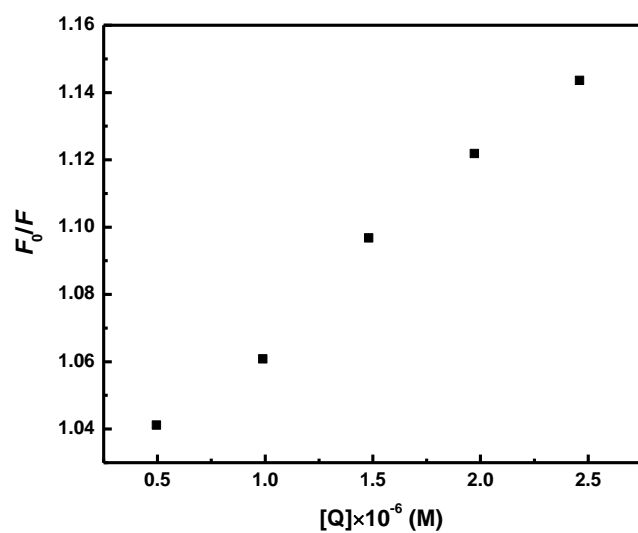
$$K_{sv} = (1,13 \pm 0,04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$$

Jedinjenje 34 (ZSML08)

AGP:



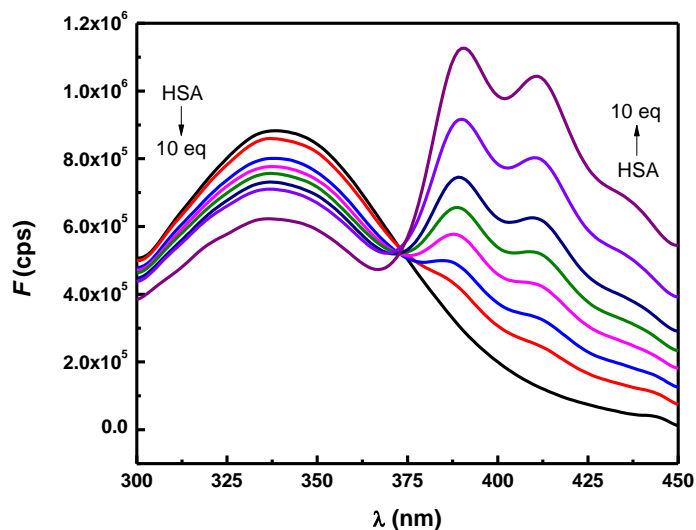
Slika P6. Promene u fluorescentnim emisionim spektrima AGP po dodatku jedinjenja **34 (ZSML08)** (1-10 moljskih ekvivalenata); $T = 298,0 \text{ K} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 mM PBS, pH = 7,42.



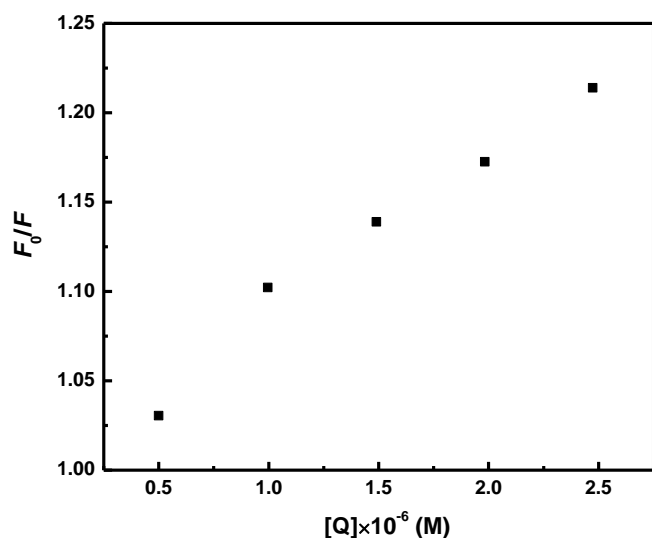
Slika P7. The Stern-Volmer plot za vezivanje jedinjenja **34 (ZSML08)** za AGP. $y = 1 + 61187,3 x$.

$$K_{sv} = (6,12 \pm 0,20) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

HSA:



Slika P8. Promene u fluorescentnim emisionim spektrima HSA po dodatku jedinjenja **34 (ZSML08)** (1-10 molskih ekvivalenata); $T = 298,0 \text{ K} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 mM PBS, $\text{pH} = 7,42$.



Slika P9. Stern-Volmer plot za vezivanje jedinjenja **34 (ZSML08)** za HSA. $y = 1 + 88495,3 x$.

$$K_{sv} = (8,85 \pm 0,30) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

4. *In vivo* farmakokinetika u miševima

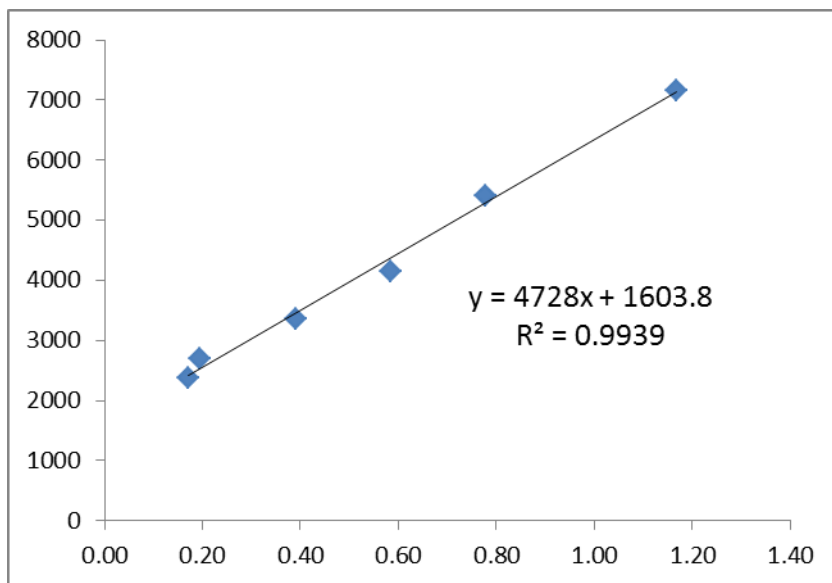
Jedinjenje **34 (ZSML08)** rastvoreno je u vodi i intraperitonealno primenjeno u dozi 20 mg/kg/day tokom sedam uzastopnih dana. Punkturom srca skupljana je krv iz tri miša, koji su prethodno anestezirani hloroformom, 24 sata posle poslednje primenjene doze. Uzorci su odmah centrifugirani i serum je čuvan na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do početka analize. Ljudski serum uzet je od zdravog dobrovoljca i skladišten u frižideru na $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Ukupne

koncentracije jedinjenja u mišjim uzorcima određivane su taloženjem proteina dodatkom dva zapreminska ekvivalenta acetonitrila (50 μ L uzorka i 100 μ L acetonitrila), nakon čega je smeša držana na vorteksu 15 sekundi, a onda 30 minuta u ultrazvučnom kupatilu. Posle centrifugiranja denaturisanih proteina (10 minuta, 13400 rpm, Beckman Coulter ultracentrifuga), supernatanti su injektovani u UPLC MS-MS uređaj. Kalibracione prave konstruisane su pomoću ljudskog seruma. Standardni rastvori jedinjenja pripremljeni su u vodi. Ljudski serum spajkovan je standardnim rastvorima, a rastvori finalnih koncentracija inkubirani su na 37 °C tokom 1 h, a potom tretirani acetonitriplom na već opisan način. Koncentracije jedinjenja u mišjem serumu kvantifikovane su pomoću Waters Acquity UPLC H-Class uređaja (WAT-176015007; Milford, MA, SAD) sa Poroshell 120 EC-C18 kolonom (4,6 \times 50mm, 2,7 μ , S.N. USCFU07797) kuplovanog sa masenim detektorom (Waters TQ (Tandem Quadrupole, WAT-176001263)). *Single ion recording* eksperiment (SIR) je korišćen, uz praćenje jona: $[M+H]^{1+}$ (515), za jedinjenje, i $[M+2]^+$, $[M+16]^+$, $[M+32]^+$, $[M-2]^+$, $[M+14]^+$, $[M+30]^+$, $[M+18]^+$, $[M+34]^+$ za moguće metabolite.¹⁶² Temperatura kolone održavana je na 40 °C, a protok mobilne faze na 0,3 mL/min. Mobilna faza sastojala se od ultračiste vode (TKA Germany MicroPure sistem za prečišćavanje vode, 0,055 μ S/cm) koja sadrži 0,2 vol.% mravlje kiseline (rastvarač A) i acetonitrila (rastvarač B). Za detekciju ukupne koncentracije, limit detekcije (LOD) bio je 0,08 ppm (S/N = 3:1), limit kvantifikacije (LOQ) bio je 0,17 ppm (S/N = 6:1) i $R^2=0,9939$ (kalibraciona prava konstruisana je u triplikatu).

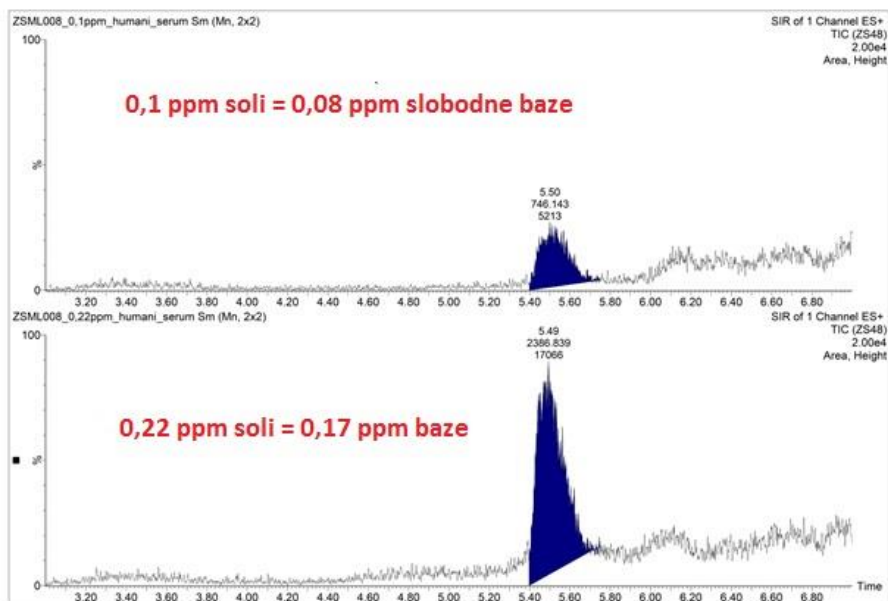
Tabela P5. Podaci za kalibracionu krivu za jedinjenje **34 (ZSML08)**.

Koncentracija soli, ppm	Koncentracija baze, ppm	Površina
0,1	0,08	746
0,22	0,17	2387
0,25	0,19	2707
0,5	0,39	3354
0,75	0,58	4157

1,0	0,78	5400
1,5	1,17	7164
5,0	3,90	29409



Slika P10. Kalibraciona prava za jedinjenje 34 (ZSML08).

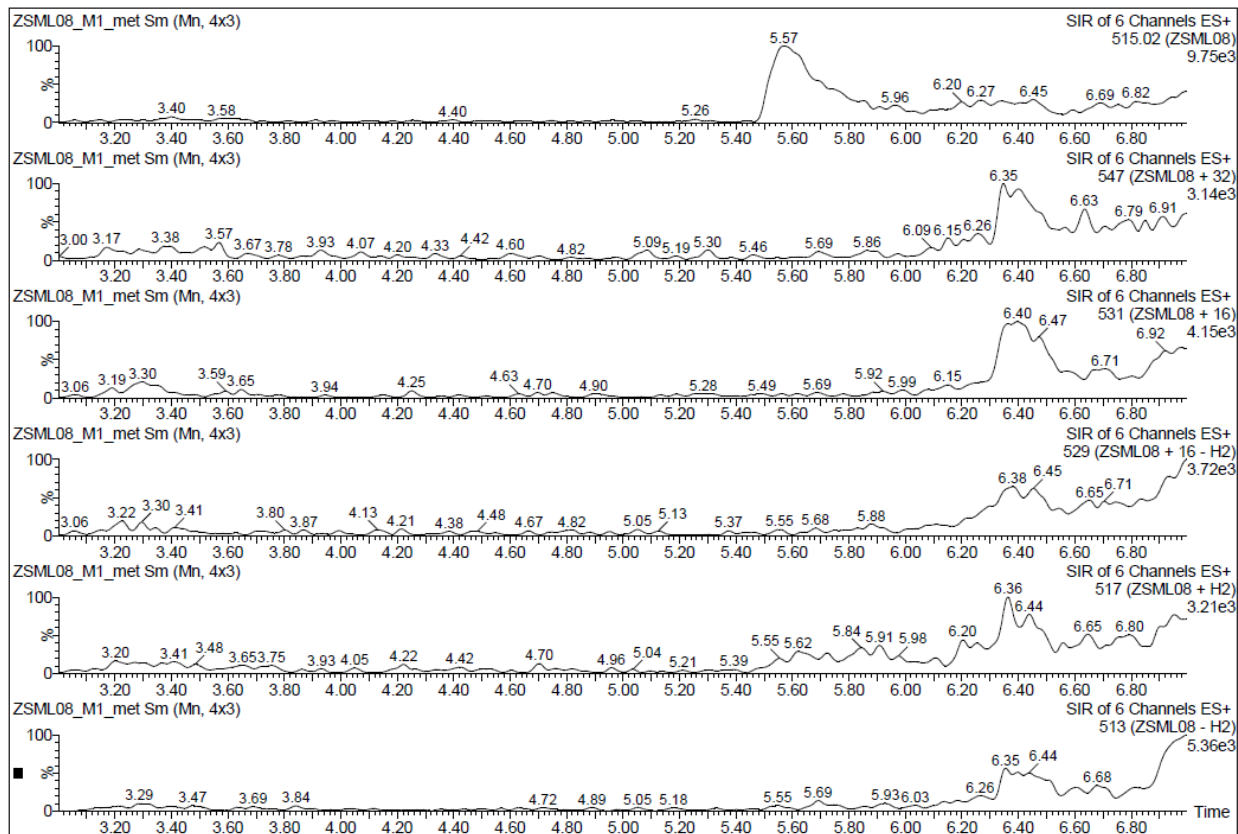


LOD (limit detekcije) = 0,08 ppm
S/N (signal/šum) = 6/1

LOQ (limit kvantifikacije) = 0,17 ppm
S/N (signal/šum) = 10/1

Slika P11. Limit detekcije i limit kvantifikacije za jedinjenje 34 (ZSML08).

Potruga za eventualnim metabolitima jedinjenja **34 (ZSML08)** – hromatogrami (oznake u gornjim desnim uglovima hromatograma):



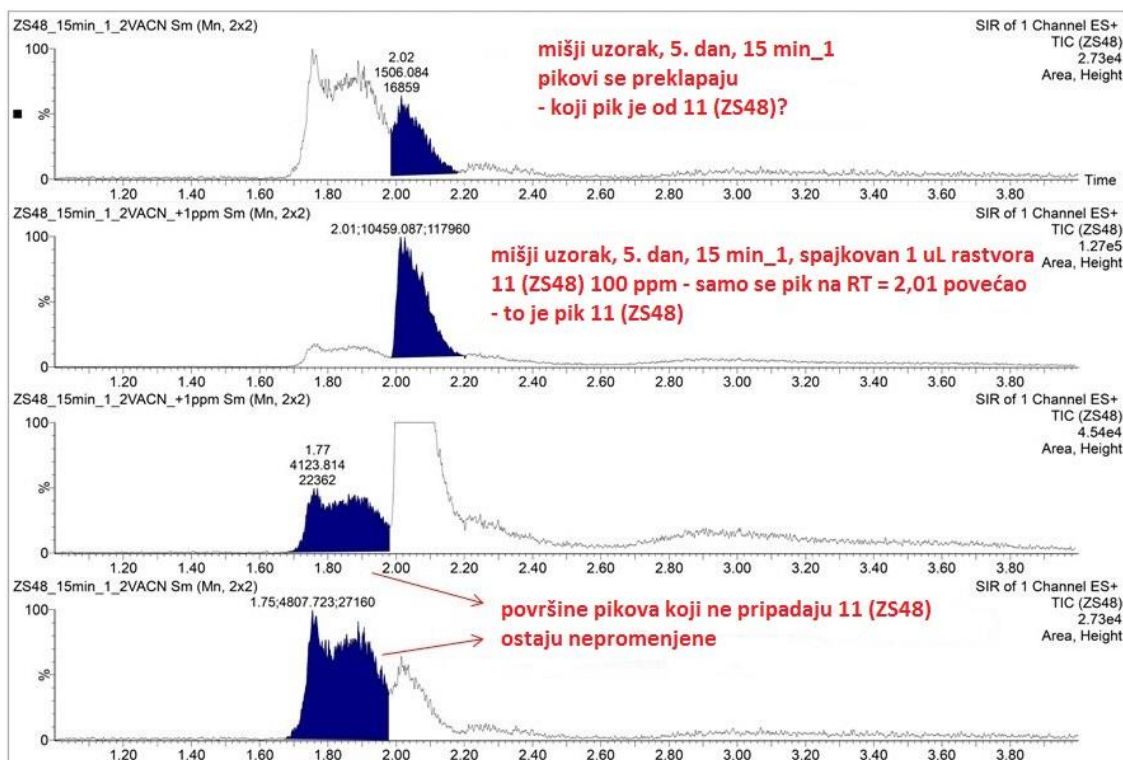
Slika P12. Hromatogrami mogućih metabolita jedinjenja **34 (ZSML08)**.

Slična mala studija izvedena je sa jedinjenjem **1**. Korišćena je doza 10 mg/kg. Prikupljen je veći broj uzoraka, petog i sedmog dana ogleada, u vremenskim razmacima nakon primenjene doze naznačenim u tabeli P6. Zbog velikog broja uzoraka nisu prikazani svi hromatogrami – dat je jedan, reprezentativan. Jedinjenje **11 (ZS48)** bilo je prisutno u krvi miševa u koncentraciji od 0,46 do 1,03 μM

Tabela P6. Koncentracija jedinjenja **11 (ZS48)** u različitim miševima.

Dan	Uzorak	Površina	Koncentracija, μM
5.	15 min, miš 1	684	1,03
5.	15 min, miš 2	<LOD	<LOD
5.	30 min, miš 1	<LOD	<LOD
5.	30 min, miš 2	480	0,70

5.	45 min, miš 1	<LOD	<LOD
5.	45 min, miš 2	<LOD	<LOD
5.	90 min, miš 1	386	0,55
5.	90 min, miš 2	340	0,48
5.	180 min, miš 1	425	0,61
5.	180 min, miš 2	329	0,46
7.	5 min, miš 1	<LOD	<LOD
7.	5 min, miš 2	<LOD	<LOD
7.	20 min, miš 1	<LOD	<LOD
7.	20 min, miš 2	<LOD	<LOD
7.	60 min, miš 1	415	0,60
7.	60 min, miš 2	<LOD	<LOD
7.	120 min, miš 1	449	0,65
7.	120 min, miš 2	<LOD	<LOD
7.	240 min, miš 1	<LOD	<LOD
7.	240 min, miš 2	327	0,46

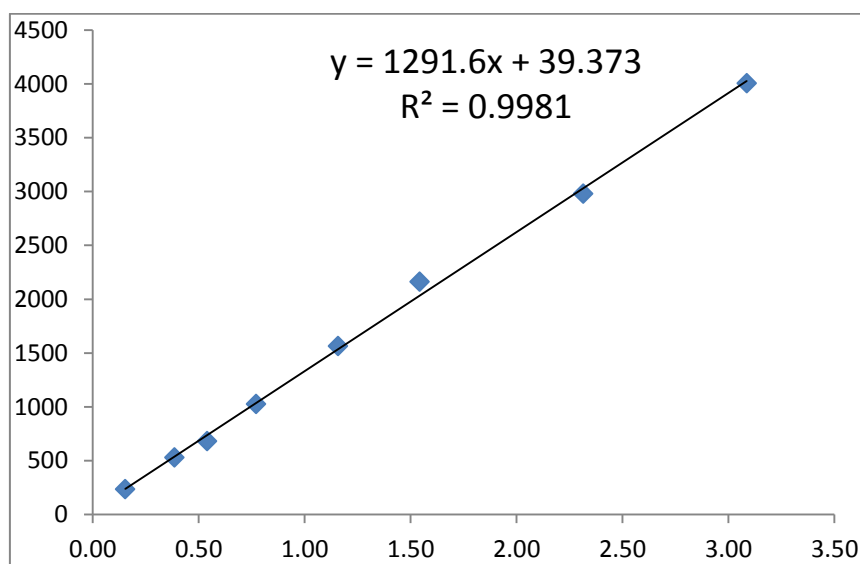


Slika P13. Hromatogrami uzorka uzetog 5. dana, 15 minuta nakon primene doze, iz jednog miša: Odozgo nadole: originalni hromatogram; spajkovanje uzorka jedinjenjem 11 (ZS48) radi identifikacije pravog signala – pika.

Koncentracije su određene pomoću kalibracione prave:

Tabela P7. Podaci za kalibracionu pravu za jedinjenje **11 (ZS48)**.

Koncentracija soli, ppm	Koncentracija soli, ppm	Površina
0,1	0,08	-
0,2	0,15	234
0,5	0,39	530
0,7	0,54	679
1,0	0,77	1025
1,5	1,16	1562
2,0	1,54	2160
3,0	2,31	2980
4,0	3,09	4004
5,0	3,86	-



Slika P14. Kalibraciona prava za jedinjenje **11 (ZS48)**.

Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) bili su ispod 0,08 ppm (1/15 signal/šum na toj koncentraciji).

Napomena: Natpis “ZSML008” koji se pojavljuje na nekim hromatogramima predstavlja grešku operatera koji je slučajno uneo takvu oznaku umesto “ZSML08”.

Natpis “TIC (ZS48)” koji se pojavljuje na nekim hromatogramima predstavlja ukupnu “jonsku struju” i druge parametre koji su podešeni u ukupnoj metodi za **11 (ZS48)**, a ista metoda korišćena je i za **34 (ZSML08)**.

5. Određivanje pKa vrednosti

Jedinjenja su rastvorena u 25,00 mL 0,1 M NaCl u MeOH:H₂O = 1:1 (v:v). Svaki rastvor titrovan je sa 0,0764 M NaOH (MeOH:H₂O = 1:1, v:v), zapremina inkrementa 2,0 µL. Titracije su izvedene u atmosferi Ar na T = 25 ± 1°C.

Softver HYPERQUAD2008 je korišćen za interpretaciju podataka.²⁰⁰

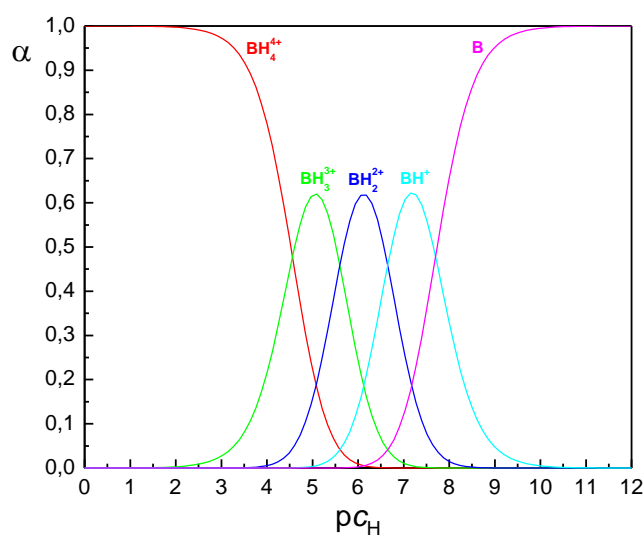
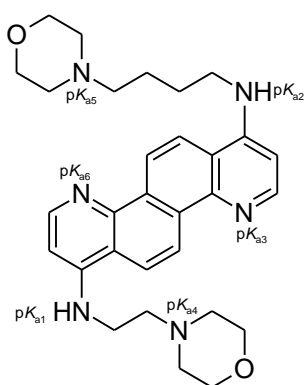
Aparatura: Potenciometrijske titracije vršene pomoću CRISON pH-birete 24 2S opremljene CRISON 50 29 mikro-kombinovanom pH elektrodom (CRISON INSTRUMENTS, S.A. Spain). Elektroda je kalibrisana titracijom jakim bazom – jakim kiselinom u 0,1 M NaCl u MeOH:H₂O (1:1, v:v), uz upotrebu GLEE – GLass Electrode Evaluation softvera;²⁰¹ standardni potencijal $E^0 = 386,1 \pm 0,6$ mV, nagib 58,4 ± 0,3 mV, pK_w 13,78 ± 0,01, vrednosti dobijene kao prosek vrednosti pet (**34 (ZSML08)**) ili četiri (**11 (ZS48)**, **CQ**) ili tri (**35 (ZS103)**, **55 (ZS102)**) titracije.

34 (ZSML08):

$C_{34 (ZSML08)} = 5,7514 \times 10^{-4}$ M (0,1 M NaCl u MeOH:H₂O = 1:1)

Tabela P8. Rezultati titracije jedinjenja **34** (ZSML08).

eksperiment	pK_{a1}	pK_{a2}	$pK_{a3} \pm SD$	$pK_{a4} \pm SD$	$pK_{a5} \pm SD$	$pK_{a6} \pm SD$
1	pK_a van opsega titracije	pK_a van opsega titracije	$4,56 \pm 0,01$	$5,49 \pm 0,01$	$6,56 \pm 0,01$	$7,64 \pm 0,01$
2			$4,66 \pm 0,01$	$5,64 \pm 0,01$	$6,65 \pm 0,01$	$7,78 \pm 0,01$
3			$4,46 \pm 0,01$	$5,62 \pm 0,02$	$6,60 \pm 0,01$	$7,71 \pm 0,01$
4			$4,97 \pm 0,08$	$5,59 \pm 0,08$	$6,68 \pm 0,06$	$7,60 \pm 0,08$
5			$4,83 \pm 0,05$	$5,64 \pm 0,04$	$6,77 \pm 0,05$	$7,79 \pm 0,06$
$\langle pK_a \rangle$			$4,56 \pm 0,08$	$5,60 \pm 0,06$	$6,65 \pm 0,07$	$7,70 \pm 0,07$



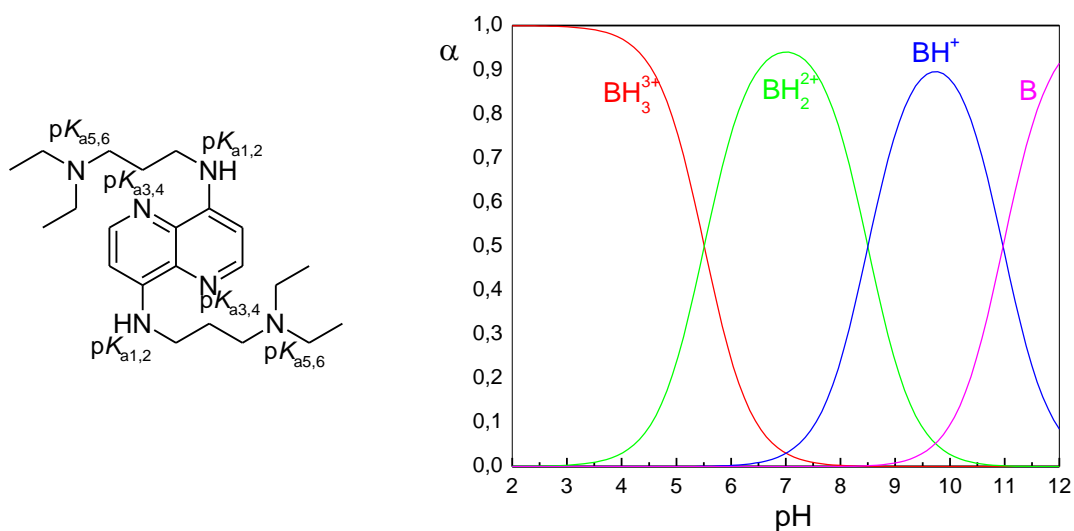
Slika P15. Rezultati titracije jedinjenja **34** (ZSML08).

55 (ZS102):

Tabela P9. Rezultati titracije jedinjenja **55 (ZS102)**.

$$C_{55 \text{ (ZS102)}} = 6,829 \times 10^{-4} \text{ M}$$

eksperiment	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	$pK_{a4} \pm SD$	$pK_{a5} \pm SD$	$pK_{a6} \pm SD$
1	van opsega titracije	van opsega titracije	van opsega titracije	$5,49 \pm 0,05$	$8,51 \pm 0,06$	$10,96 \pm 0,06$
2				$5,48 \pm 0,05$	$8,50 \pm 0,06$	$11,08 \pm 0,06$
3				$5,57 \pm 0,06$	$8,50 \pm 0,03$	$10,87 \pm 0,03$
$\langle pK_a \rangle$				$5,51 \pm 0,06$	$8,50 \pm 0,01$	$10,97 \pm 0,11$



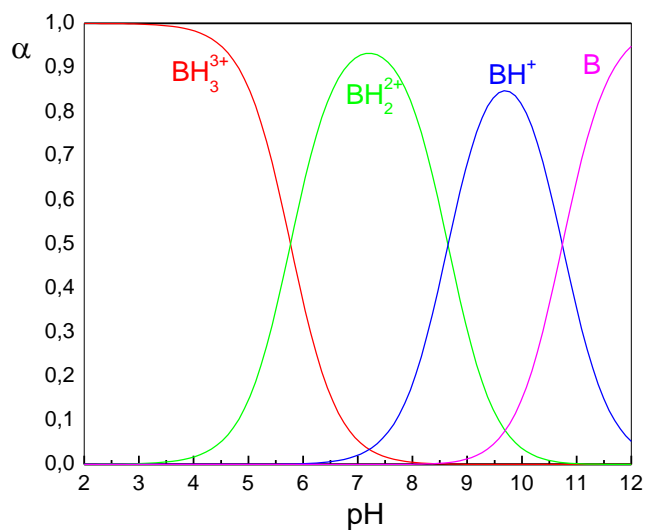
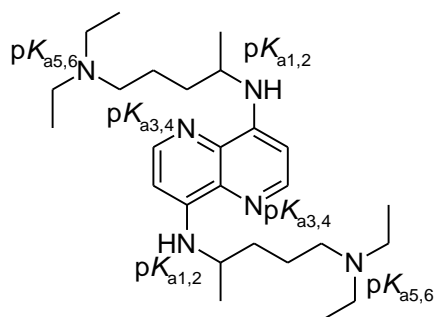
Slika P16. Rezultati titracije jedinjenja **55 (ZS102)**.

35 (ZS103):

Tabela P10. Rezultati titracije jedinjenja **35 (ZS103)**.

$$C_{35} (\text{ZS103}) = 4,608 \times 10^{-4} \text{ M}$$

eksperiment	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	$pK_{a4} \pm \text{SD}$	$pK_{a5} \pm \text{SD}$	$pK_{a6} \pm \text{SD}$
1	pK_a van opsega titracije	pK_a van opsega titracije	pK_a van opsega titracije	$5,85 \pm 0,08$	$8,69 \pm 0,07$	$10,69 \pm 0,04$
2				$5,74 \pm 0,08$	$8,65 \pm 0,08$	$10,80 \pm 0,04$
3				$5,73 \pm 0,09$	$8,61 \pm 0,07$	$10,74 \pm 0,06$
$\langle pK_a \rangle$				$5,77 \pm 0,07$	$8,65 \pm 0,04$	$10,74 \pm 0,06$



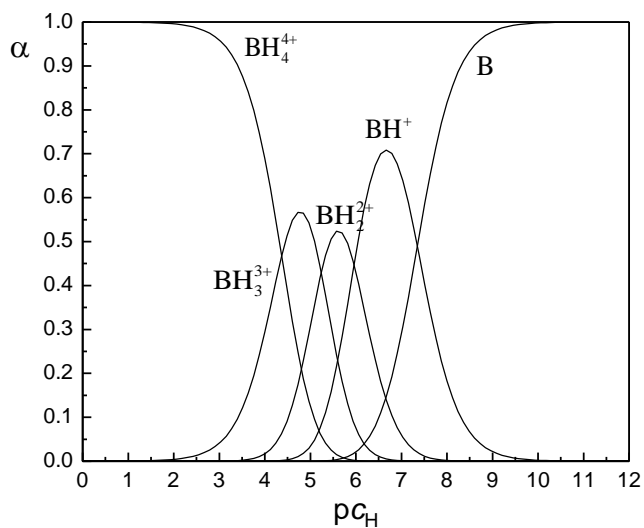
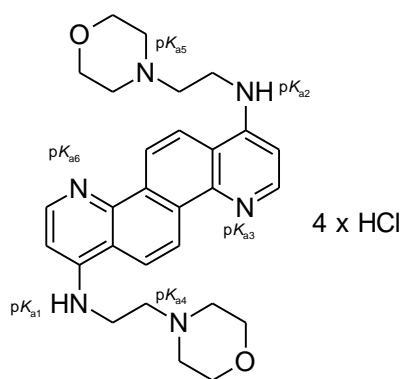
Slika P17. Rezultati titracije jedinjenja **35 (ZS103)**.

11 (ZS48):

Tabela P11. Rezultati titracije jedinjenja **11 (ZS48)**.

$C_{11} (ZS48) = 3,099 \times 10^{-4} \text{ M}$ (0,1 M NaCl u MeOH:H₂O = 1:1)

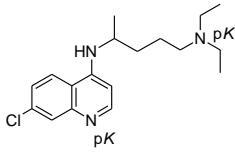
eksperiment	pK_{a1}	pK_{a2}	$pK_{a3} \pm SD$	$pK_{a4} \pm SD$	$pK_{a5} \pm SD$	$pK_{a6} \pm SD$
1	p <i>K</i> _a van pH opsega titracija	p <i>K</i> _a van pH opsega titracija	4,37 ± 0,01	5,26 ± 0,01	5,97 ± 0,01	7,41 ± 0,01
2			4,60 ± 0,01	5,17 ± 0,01	6,02 ± 0,01	7,36 ± 0,01
3			4,39 ± 0,01	5,25 ± 0,01	5,94 ± 0,01	7,33 ± 0,01
4			4,34 ± 0,01	5,26 ± 0,01	5,91 ± 0,01	7,31 ± 0,01
<p<i>K</i>_a>			4,37 ± 0,03	5,24 ± 0,04	5,96 ± 0,05	7,35 ± 0,04



Slika P18. Rezultati titracije jedinjenja **11 (ZS48)**.

Hlorokin:

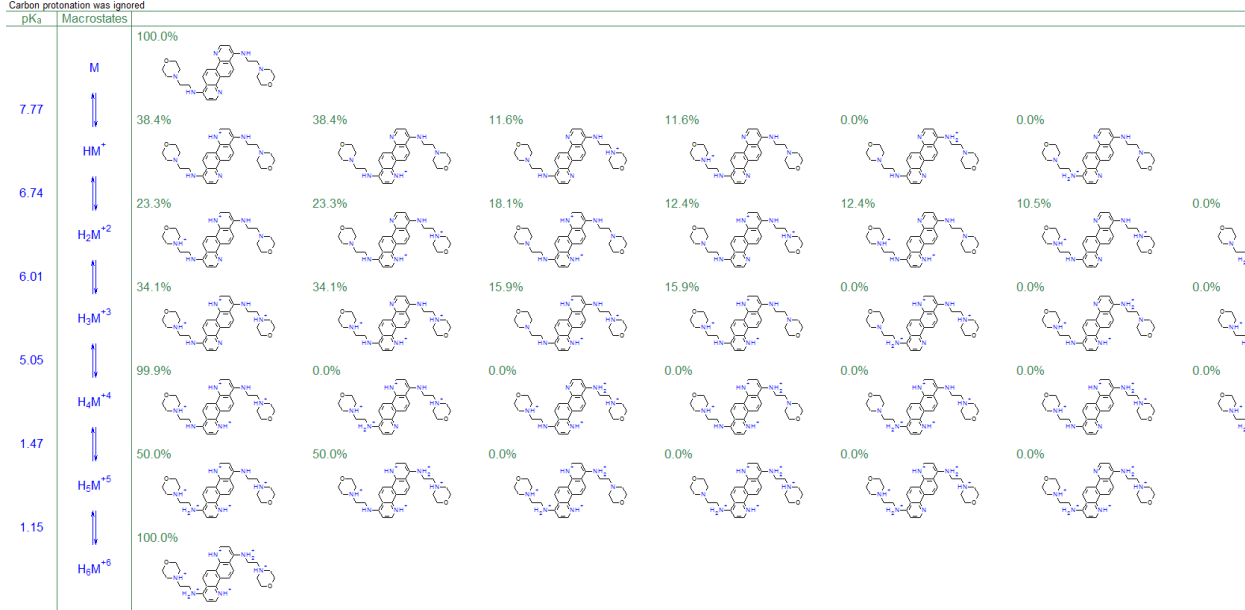
Tabela P12. Rezultati titracije CQ.

		eksperiment $pK_{a1} \pm SD$		$pK_{a2} \pm SD$	
	1.	7,42±0,01	9,08±0,01		
	2.	7,49±0,01	9,24±0,01		
	3.	7,46±0,01	9,18±0,01		
	4.	7,44±0,01	9,20±0,01		
$c = 1,024 \cdot 10^{-3} \text{ M}$		$\langle pK_a \rangle$	7,45±0,01	9,18±0,01	

pKa vrednosti dodeljene su konkretnim atomima azot pomoću proračuna:^{164,165}

11 (ZS48):

pKa Table for ZS48
 0 acidic atoms
 6 basic atoms: 1(-NH-)2(0(-NH)4(-N-)23(-N-)13(a)Na)31(a)Na
 Carbon protonation was ignored



34 (ZSML08):

pKa	Macrostates	Microstates				
	M	100.0%				
7.87	M ↔ HM ⁺	33.1%	33.0%	25.0%	8.9%	
7.02	HM ⁺ ↔ H ₂ M ⁺²	39.2%	24.7%	11.9%	10.1%	8.7%
6.22	H ₂ M ⁺² ↔ H ₃ M ⁺³	41.8%	30.2%	23.3%	4.6%	5.4%
5.21	H ₃ M ⁺³ ↔ H ₄ M ⁺⁴	99.6%				
2.37	H ₄ M ⁺⁴ ↔ H ₅ M ⁺⁵	90.6%	9.2%			
1.53	H ₅ M ⁺⁵ ↔ H ₆ M ⁺⁶	100.0%				

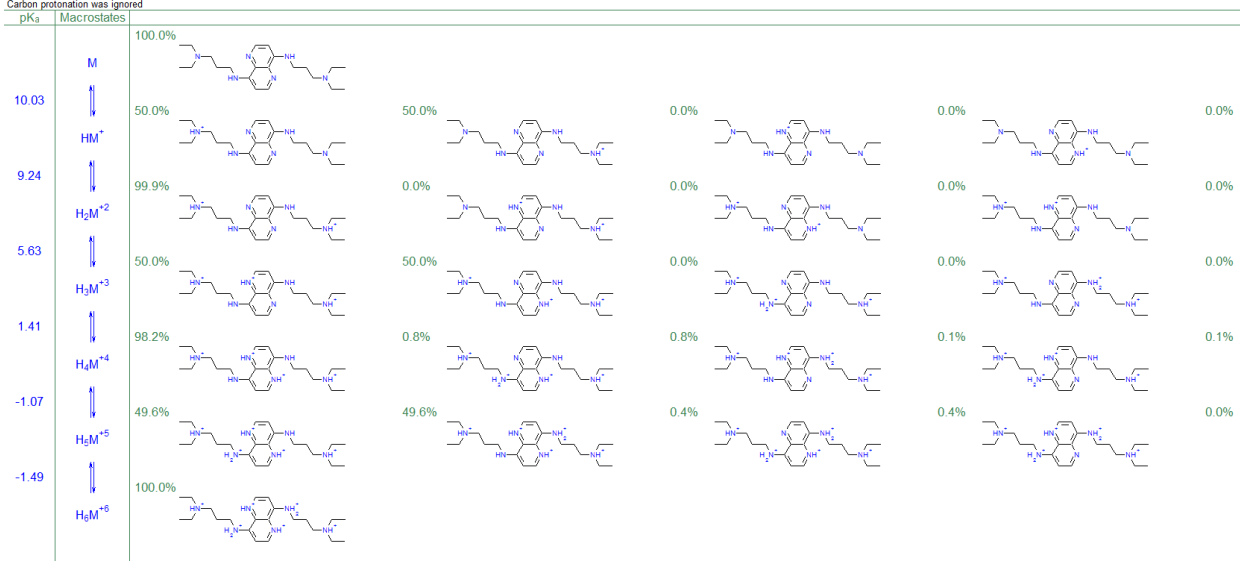
35 (ZS103):

pKa Table for ZS103
 0 acidic atoms:
 6 basic atoms: 11(NH)-22(-NH)-3(>N)-28(>N)-15(aNa)-20(aNa)
 Carbon protonation was ignored

pKa	Macrostates	Microstates				
	M	100.0%				
10.17	M ↔ HM ⁺	50.0%	50.0%	0.0%	0.0%	0.0%
9.42	HM ⁺ ↔ H ₂ M ⁺²	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
5.40	H ₂ M ⁺² ↔ H ₃ M ⁺³	50.0%	50.0%	0.0%	0.0%	0.0%
1.68	H ₃ M ⁺³ ↔ H ₄ M ⁺⁴	86.8%	5.7%	5.7%	0.8%	0.8%
0.06	H ₄ M ⁺⁴ ↔ H ₅ M ⁺⁵	47.2%	47.2%	2.8%	2.8%	0.0%
-0.42	H ₅ M ⁺⁵ ↔ H ₆ M ⁺⁶	100.0%				

55 (ZS102):

pKa Table for ZS102
 0 acidic atoms:
 6 basic atoms: 9(-NH)-20(-NH)-19(-N)-24(-N)-13(aNa)18(aNa)
 Carbon protonation was ignored



Redosled protonovanja:

Uzevši u obzir baznost atoma azota iz bočnih nizova (morfolinski *N* u **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** vs. $-NEt_2$ u **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)**) i veličinu aromatičnih delova molekula, očekivano je da se aromatični *N* prvi protonuju kod **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** (morfolinski *N* u drugom koraku), ali ne u **35 (ZS103)** i **55 (ZS102)**, gde mnogo veća baznost $-NEt_2$ uslovljava da se ovaj fragment prvi protonuje. Negativni induktivni efekat kiseonikovih atoma iz morfolinskog snižava baznost morfolinskog *N* u poređenju sa $-NEt_2$, ali je i delokalizacija pozitivne šarže veća u diazahrizenskom nego u naftiridinskom motivu, jer je potonje dva puta manje.

ADMET Predictor softver potvrđuje predloženi redosled protonovanja.^{164,165}

6. Toksičnost u esejima na zebrecama

Evaluacija toksičnosti jedinjenja **34 (ZSML08)**, **11 (ZS48)** i **CQ** u embrionima zebrica sprovedena je u skladu sa OECD smernicama za testiranje hemikalija.²⁰² Svi eksperimenti bili su u saglasnosti sa evropskom direktivom 2010/63/EU i etičkim smernicama Vodiča za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

Divlji soj zebrica (*Danio rerio*) koji je obezbedila dr Ana Cvejić (Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK), skladišten je u uslovima kontrolisane temperature

(28 °C) i svetlosti (standardno 14:10 sati svetlost-mrak) i hranjen komercijalno dostupnom suvom pahuljičastom hranom dva puta dnevno (TetraMin™ flakes; Tetra Melle, Germany) i *Artemia nauplii* jednom dnevno. Embrioni su proizvedeni *pair-wise* “parenjem”, skupljani i raspoređivani u ploče sa 24 bunara, u koncentraciji 10 embriona po bunarčiću, u 1 mL embrionske vode (0,2 g/L Instant Ocean® soli u destilovanoj vodi) i uzgajani na 28 °C. Za procenu letalne i razvojne toksičnosti, embrioni su u trenutku 6 hpf tretirani rastvorima jedinjenja **34 (ZSML08)**, **11 (ZS48)** i **CQ** na sedam koncentracija (2,5, 5, 10, 20, 30, 40 i 50 µM). Negativna kontrola bio je DMSO (0.1%). Eksperiment je izveden tri puta, na 40 embriona po svakoj koncentraciji.

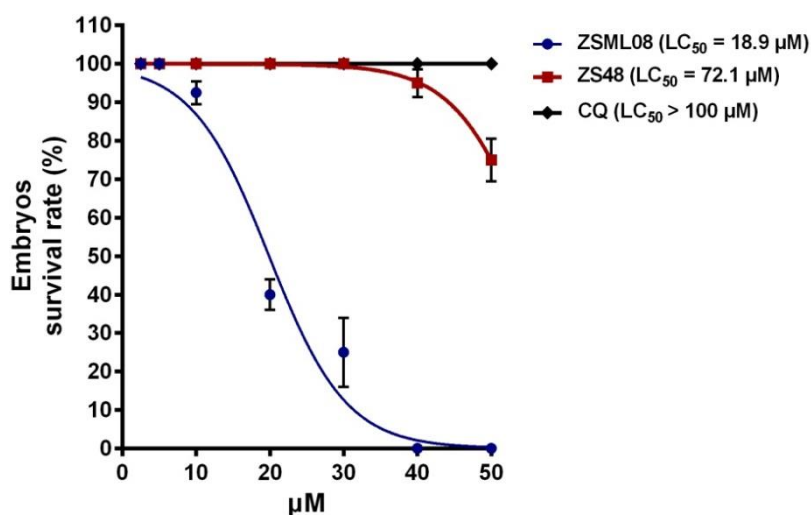
Apikalne završne tačke prilikom evaluacije toksičnosti (tabela P13) zabeležene su u tačkama 24, 48, 72, 96 i 120 hpf uz upotrebu invertnog mikroskopa (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan). Mrtvi embrioni bili su izbrojani i odbačeni svakih 24 h. U trenutku 120 hpf embrionima je utvrđen puls, anestetizirani su dodatkom 0,1% (w/v) rastvora trikaina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), fotografisani i usmrćeni zamrzavanjem na -20°C tokom ≥ 24 h. Nijedan letalni ili teratogeni efekat (nabrojan u tabeli P13) nije zabeležen.

Toksičnost je procenjivana određivanjem letalne koncentracije (LC₅₀), definisane kao koncentracija kojom su embrioni tretirani i koja je izazvala 50% mortalitet posle 120 hpf. Vrednosti LC₅₀ računane su pomoću ToxRatPro programa (ToxRat®, softver za statističku analizu biotestova, ToxRat Solution GmbH, Alsdorf, Nemačka, verzija 2.10.05) uz probit analizu sa linearnom maksimalnom regresijom verovatnoće.

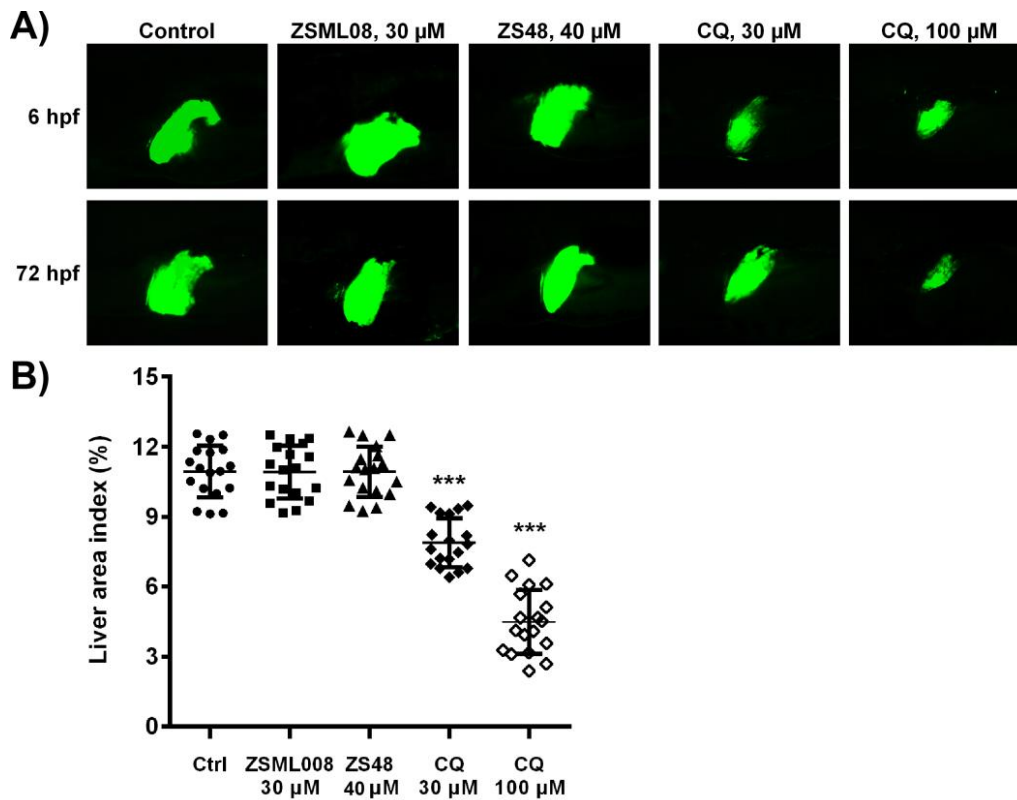
Za analizu hepatotoksičnosti jedinjenja **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** embrioni transgenih *Tg(l-fabp:EGFP)* zebrića sa fluorescentno obeleženom jetrom tretirani su rastvorima jedinjenja u trenutku 6 hpf, dok jetra još vek nije formirana (test štetnih efekata po razvoj jetre) i trenutku 72 hpf (test štetnih efekata po funkciju jetre). Embrioni su tretirani rastvorima jedinjenja **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** u opsegu koncentracija 10-40 µM, odnosno rastvorom **CQ** u opsegu 10-100 µM. Eksperiment je izveden tri puta, na šest embriona po svakoj koncentraciji. Hepatotoksičnost je utvrđivana na osnovu promene u indeksu površine jetre u poređenju sa kontrolnom grupom, uz izračunavanje odnosa površine jetre i lateralne površine embriona x 100%, prema proceduri koju je publikovao Zhang (2017).¹⁶⁹

Za procenu mijelotoksičnosti jedinjenja **11 (ZS48)** i **34 (ZSML08)** posmatran je njihov uticaj na broj neutrofila u transgenim embrionima *Tg(mpx:EGFP)* zebrića sa fluorescentno obeleženim neutrofilima, čime je omogućena neposredna vizualizacija uticaja jedinjenja na neutrofile. Embrioni su u trenutku 6 hpf tretirani rastvorima jedinjenja u ospegu 10-40 μM , a posle 72 hpf neutrofilima su vizualizovani fluorescentnom mikroskopijom (Olympus BX51, Applied Imaging Corp., San Jose, CA, SAD). Eksperiment je izveden dva puta, na 20 embriona po svakoj koncentraciji.

Sva navedena merenja vršena su pomoću Image J programa (National Institutes of Health, SAD).



Slika P19. DRA: procenat preživljavanje embriona zebrića u trenutku 120 hpf u zavisnosti od koncentracije **34 (ZSML08)**, **11 (ZS48)** i **CQ**.



Slika P20. Hepatotoksičnost jedinjenja **34** (ZSML08), **11** (ZS48) i CQ u embrionima *Tg(l-fabp:EGFP)* zebrića sa fluorescentno obeleženom jetrom. A. *In vivo imaging* morfologije jetre *Tg(l-fabp:EGFP)* embriona zebrića starih 120 h u trenutku 6 hpf i 72 hpf posle tretiranja sa **34** (ZSML08) i **11** (ZS48) uz CQ kao kontrolu; B. Grafički prikaz (kvantifikacija).

Tabela P13. Letalni i teratogeni efekti koji su posmatrani u embrionima zebrica (*Danio rerio*) posle tretiranja sa **34 (ZSML08)**, **11 (ZS48)** i **CQ** tokom različitih vremenskih perioda (hpf).

Kategorija	Završne tačke razvoja	Period izloženosti jedinjeniu (hpf)			
		24	48	72	96/120
Letalni efekti	koagulacija jajeta ^a	●	●	●	●
	bez formacije somita	●	●	●	●
	bez odvajanja repa	●	●	●	●
	bez otkucaja srca		●	●	●
Teratogeni efekti	malformacija glave	●	●	●	●
	malformacija očiju ^b	●	●	●	●
	malformacija sakulusa/statokonija ^c	●	●	●	●
	malformacija notohorde	●	●	●	●
	malformacija repa ^d	●	●	●	●
	skolioza	●	●	●	●
	frekvencija otkucaja srca		●	●	●
	cirkulacija krvi		●	●	●
	perikardijalni edem	●	●	●	●
	edem žumanceta	●	●	●	●
	boja i morfologija jetre			●	●
	apsorpcija žumanceta	●	●	●	●
	retardacija rasta ^e	●	●	●	●

^aNe prepoznaje se struktura providnih organa.

^bMalformacija očiju registruje se kao retardacija u razvoju očiju i abnormalnost u obliku veličini očiju.

^cOdsustvo ili prisustvo jedne ili više od dve statokonije po sakulusu, kao i smanjenje ili uvećanje sakulusa i/ili statokonija.

^dMalformacija repa registruje se kao rep koji je savijen, uvrnut ili kraći od kontrolnih embriona.

^e Retardacija rasta registruje se kroz poređenje rasta i veličine sa kontrolnim embrionima (pre izleganja, 24 hpf i 48 hpf) ili dužne tela (posle izleganja, na i od 72 hpf) optičkom inspekcijom invertnim mikroskopom (CKX41; Olympus, Tokio, Japan).

7. Tolerabilnost u miševima

Grupe od šest ženskih C57Bl/6 miševa tretirane su jedinjenjem rastvorenim u 0,9% NaCl, 7 dana (i.p.). Izgled i ponašanje svakog miša ponaosob praćeni su dva puta dnevno tokom 28 dana posle poslednje primenjene doze. Miševi su svih 28 dana oglada zadržali normalan izgled i uobičajeno ponašanje. Studija se pridržavala međunarodnih smarnica i principa za biomedicinska istraživanja na životinjama i bila je pod kontrolom Etičkog komiteta i odobrena od strane Veterinarskog direktorara u

Ministarstvu poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije (odluka broj 323-07-02444/2014-05/1).

8. LITERATURA

¹ Kuhn, J. H.; Bào, Y.; Bavari, S.; Becker, S.; Bradfute, S.; Brauburger, K.; Rodney Brister, J.; Bukreyev, A. A.; Cai, Y.; Chandran, K.; Davey, R. A.; Dolnik, O.; Dye, J. M.; Enterlein, S.; Gonzalez, J. P.; Formenty, P.; Freiberg, A. N.; Hensley, L. E.; Hoenen, T.; Honko, A. N.; Ignatyev, G. M.; Jahrling, P. B.; Johnson, K. M.; Klenk, H. D.; Kobinger, G.; Lackemeyer, M. G.; Leroy, E. M.; Lever, M. S.; Mühlberger, E.; Netesov, S. V.; Olinger, G. G.; Palacios, G.; Patterson, J. L.; Paweska, J. T.; Pitt, L.; Radoshitzky, S. R.; Ryabchikova, E. I.; Sapphire, E. O.; Shestopalov, A. M.; Smither, S. J.; Sullivan, N. J.; Swanepoel, R.; Takada, A.; Towner, J. S.; van der Groen, G.; Volchkov, V. E.; Volchkova, V. A.; Wahl-Jensen, V.; Warren, T. K.; Warfield, K. L.; Weidmann, M.; Nichol, S. T. Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for filovirus strains and variants rescued from cDNA. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 1229-1237.

² Kuhn, J. H. *et al.* Two (2) new genera each including one (1) novel species in the family Filoviridae (Mononegavirales). *Report number: ICTV Proposal (Taxoprop) No. 2018.015M*, februar **2018**

³ Siegert, R.; Shu, H. L.; Slenczka, W.; Peters, D.; Müller, G. Zur Ätiologie einer unbekanntenen, von Affen ausgegangenen menschlichen Infektionskrankheit. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1967**, *92*, 2341–2343.

⁴ Johnson, K. M.; Webb, P. A.; Lange, J. V.; Murphy, F. A. Isolation and partial characterisation of a new virus causing haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* **1977**, *309*, 569-571.

⁵ Bowen, E. T. W.; Lloyd, G.; Harris, W. J.; Platt, G. S.; Baskerville, A.; Vella, E. E. Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent. *Lancet* **1977**, *309*, 571-573.

⁶ Negrodo, A.; Palacios, G.; Vázquez-Morón, S.; González, F. L.; Dopazo, H. N.; Molero, F.; Juste, J.; Quetglas, J.; Savji, N.; de la Cruz Martínez M.; Herrera, J. E.; Pizarro, M.; Hutchison, S. K.; Echevarría, J. E.; Lipkin, W. I.; Tenorio, A. Discovery of an Ebolavirus-Like Filovirus in Europe. *PLoS Pathogens* **2011**, *7*, e1002304.

⁷ Shi, M.; Lin, X. D.; Chen, X.; Tian, J. H.; Chen, L. J.; Li, K.; Wang, W.; Eden, J. S.; Shen, J. J.; Liu, L.; Holmes, E. C.; Zhang, Y. Z. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature* **2018**, *556*, 197-202.

⁸ Bwaka, M. A.; Bonnet, M.-J.; Calain, P.; Colebunders, R.; De Roo, A.; Guimard, Y.; Katwika, K. R.; Kibadi, K.; Kipasa, M. A.; Kuvula, K. J.; Mapanda, B. B.; Massamba, M.; Mupapa, K. D.; Muyembe-Tamfum, J.-J.; Ndaberey, E.; Peters, C. J.; Rollin, P. E.; Van den Ende, E. Ebola Hemorrhagic Fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: Clinical Observations in 103 Patients. *Journal of Infectious Diseases* **1999**, *179*, S1-S7.

⁹ Kuhn, J. H.; Becker, S.; Ebihara, H.; Geisbert, T. W.; Johnson, K. M.; Kawaoka, Y.; Lipkin, W. I.; Negrodo, A. I.; Netesov, S. V.; Nichol, S. T.; Palacios, G.; Peters, C. J.; Tenorio, A.; Volchkov, V. E.; Jahrling, P. B. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Arch. Virol.* **2010**, *155*, 2083-2103.

¹⁰ https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses (pristupljeno 8. februara 2019. godine)

¹¹ Kuhn, J. H. *et al.* One (1) new species in the genus Ebolavirus (Mononegavirales: Filoviridae). *Report number: ICTV Proposal (Taxoprop)* No. 2019.007M, novembar **2018**

¹² Radoshitzky, S. R.; Bavari, S.; Jahrling, P. B.; Kuhn, J. H. FILOVIRUSES, MEDICAL ASPECTS OF BIOLOGICAL WARFARE, Poglavlje: 23, Izdavač: Borden Institute, US Army Medical Department Center and School, Health Readiness Center of Excellence, Urednici/Priredivači: Joel Bozue, Christopher K. Cote i Pamela J. Glass, 569, July 2018

¹³ Taylor, D. J.; Leach, R. W.; Bruenn, J. Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evolutionary Biology*, **2010**, *10*, 193.

¹⁴ <http://www.blic.rs/Vesti/Drustvo/491865/Srpski-lekari-prezivali-zarazu-opasniju-od-ebola> (pristupljeno 25. aprila 2019. godine)

¹⁵ <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/chronology.html> (pristupljeno 25. aprila 2019. godine)

¹⁶ <https://www.cdc.gov/vhf/marburg/outbreaks/chronology.html> (pristupljeno 25. aprila 2019. godine)

¹⁷ Bell, B. P.; Damon, I. K.; Jernigan, D. B.; Kenyon, T. A.; Nichol, S. T.; O'Connor, J. P.; Tappero, J. W. Overview, Control Strategies, and Lessons Learned in the CDC Response to the 2014–2016 Ebola Epidemic. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **2016**, *65*, 4-11.

¹⁸ Hayes, C. G.; Burans, J. P.; Ksiazek, T. G.; Del Rosario, R. A.; Miranda, M. E.; Manaloto, C. R.; Barrientos, A. B.; Robles, C. G.; Dayrit, M. M.; Peters, C. J. Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by an Ebola-related filovirus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **1992**, *46*, 664-671.

¹⁹ Olson, P.E.; Hames, C. S.; Benenson, A. S.; Genovese, E. N. The Thucydides syndrome: ebola deja vu? (or ebola reemergent?). *Emerging Infectious Diseases* **1996**, *2*, 155-156.

²⁰ Acuna-Soto, R.; Romero, L. C.; Maguire, J. H. Large Epidemics of Hemorrhagic Fevers in Mexico 1545–1815. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *62*, 733–739.

²¹ Towner, J. S.; Amman, B. R.; Sealy, T. K.; Carroll, S. A. R.; Comer, J. A.; Kemp, A.; Swanepoel, R.; Paddock, C. D.; Balinandi, S.; Khristova, M. L.; Formenty, P. B. H.; Albarino, C. G.; Miller, D. M.; Reed, Z. D.; Kayiwa, J. T.; Mills, J. N.; Cannon, D. L.; Greer, P. W.; Byaruhanga, E.; Farnon, E. C.; Atimmedi, P.; Okware, S.; Katongole-Mbidde, E.; Downing, R.; Tappero, J. W.; Zaki, S. R.; Ksiazek, T. G.; Nichol, S. T.; Rollin, P. E. Isolation of Genetically Diverse Marburg Viruses from Egyptian Fruit Bats. *PLoS Pathogens* **2009**, *5* (7), e1000536.

²² Taniguchi, S.; Watanabe, S.; Masangkay, J. S.; Omatsu, T.; Ikegami, T.; Alviola, P.; Ueda, N.; Iha, K.; Fujii, H.; Ishii, Y.; Mizutani, T.; Fukushi, S.; Saijo, M.; Kurane, I.; Kyuwa, S.; Akashi, H.; Yoshikawa, Y.; Morikawa, S. Reston ebolavirus antibodies in bats, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1559-1560.

²³ Yuan, J. F.; Zhang, Y. J.; Li, J. L.; Zhang, Y. Z.; Wang, L. F.; Shi, Z. L. Serological evidence of ebolavirus infection in bats, China. *Virology*. **2012**, *9*, 236.

²⁴ Olival, K. J.; Islam, A.; Yu, M.; Anthony, S. J.; Epstein, J. H.; Khan, S. A.; Khan, S. U.; Cramer, G.; Wang, L. F.; Lipkin, W. I.; Luby, S. P.; Daszak, P. Ebola virus antibodies in fruit bats, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 270–273.

²⁵ Olival, K. J.; Hayman, D. T. S. Filoviruses in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Viruses* **2014**, *6*, 1759-1788.

-
- ²⁶ Los Alamos National Library Hemorrhagic Fever Database <https://hfv.lanl.gov/content/index> (pristupljeno 25. aprila 2019. godine)
- ²⁷ Baseler, L.; Chertow, D. S.; Johnson, K. M.; Feldmann, H.; Morens, D. M. The Pathogenesis of Ebola Virus Disease. *Annu Rev Pathol.* **2017**, *12*, 387-418.
- ²⁸ Eichner, M.; Dowell, S. F.; Firese, N. Incubation Period of Ebola Hemorrhagic Virus Subtype Zaire. *Osong Public Health and Research Perspectives* **2011**, *2*, 3-7.
- ²⁹ Kortepeter, M. G.; Bausch, D. G.; Bray, M. Basic Clinical and Laboratory Features of Filoviral Hemorrhagic Fever. *Journal of Infectious Diseases*, **2011**, *204*, S810-S816.
- ³⁰ Khan, A. S.; Sanchez, A.; Pflieger, A. K. Filoviral haemorrhagic fevers. *British Medical Bulletin* **1998**, *54*, 675 – 692.
- ³¹ Paragas, J.; Geisbert, T. W. Development of treatment strategies to combat Ebola and Marburg viruses. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2006**, *4*, 67-76.
- ³² Hoenen, T.; Groseth, A.; Falzarano, D.; Feldmann, H.; Ebola virus: unraveling pathogenesis to combat a deadly disease. *Trends in Molecular Medicine* **2006**, *12*, 206-215.
- ³³ Olejnik, J.; Ryabchikova, E.; Corley, R. B.; Mühlberger, E. Intracellular Events and Cell Fate in Filovirus Infection. *Viruses* **2011**, *3*, 1501-1531.
- ³⁴ de Wit, E.; Feldmann, H.; Munster, V. J. Tackling Ebola: new insights into prophylactic and therapeutic intervention strategies. *Genome Medicine* **2011**, *3*, 5.
- ³⁵ Khan, S.; Muhammad; Rauf, A.; Khan, A.; Rizwan, M.; Patel, S.; Khan, H.; Mahasneh, A. M.; Mubarak, M. S. Comprehensive Review on Ebola (EBOV) Virus: Future Prospects. *Infect Disord Drug Targets* **2018**, *18*, 96-104.
- ³⁶ Carstea, E. D.; Polymeropoulos, M. H.; Parker, C. C.; Detera-Wadleigh, S. D.; O'Neill, R. R.; Patterson, M. C.; Goldin, E.; Xiao, H.; Straub, R. E.; Vanier, M. T. Linkage of Niemann-Pick disease type C to human chromosome 18. *PNAS* **1993**, *90*, 2002-2004.
- ³⁷ Carstea, E. D.; et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* **1997**, *277*, 228-231.
- ³⁸ Tang, Y.; Carneiro Leao, I.; Coleman, E. M.; Shepard Broughton, R.; Hildreth, J. E. K. Deficiency of Niemann-Pick Type C-1 Protein Impairs Release of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Results in Gag Accumulation in Late Endosomal/Lysosomal Compartments. *Journal of Virology* **2009**, *83*, 7982-7995.
- ³⁹ Coleman, E. M.; Walker, T. N.; Hildreth, J. E. K. Loss of Niemann Pick type C proteins 1 and 2 greatly enhances HIV infectivity and is associated with accumulation of HIV Gag and cholesterol in late endosomes/lysosomes. *Virology Journal* **2012**, *9*, 31.
- ⁴⁰ Carette J. E.; Raaben, M.; Wong, A. C.; Herbert, A. S.; Obernosterer, G.; Mulherkar, N.; Kuehne, A. I.; Kranzusch, P. J.; Griffin, A. M.; Ruthel, G.; Dal Cin, P.; Dye, J. M.; Whelan, S. P.; Chandran, K.; Brummelkamp, T. R. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* **2011**, *477*, 340-343.
- ⁴¹ Côté, M.; Misasi, J.; Ren, T.; Bruchez A.; Lee, K.; Filone, C. M.; Hensley, L.; Li, Q.; Ory, D.; Chandran, K.; Cunningham, J. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* **2011**, *477*, 344-348.
- ⁴² Schornberg, K.; Matsuyama, S.; Kabsch, K.; Delos, S.; Bouton, A.; White J. Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *Journal of virology* **2006**, *80*, 4174–4178

-
- ⁴³ Brecher, M.; Schornberg, K. L.; Delos, S. E.; Fusco, M. L.; Saphire, E. O.; White, J. M. Cathepsin cleavage potentiates the Ebola virus glycoprotein to undergo a subsequent fusion-relevant conformational change. *Journal of virology* **2012**, *86*, 364–372.
- ⁴⁴ White, M. J.; Schornberg, L. K. A new player in the puzzle of filovirus entry. *Nature Reviews Microbiology* **2012**, *10*, 317-322.
- ⁴⁵ Ströher, U.; West, E.; Bugany, H.; Klenk, H.-D.; Schnittler, H.-J.; Feldmann, H. Infection and Activation of Monocytes by Marburg and Ebola. *Viruses. Journal of Virology* **2001**, *75*, 11025-11033.
- ⁴⁶ Sullivan, N.; Yang, Z.-Y.; Nabel, G. J. Ebola Virus Pathogenesis: Implications for Vaccines and Therapies. *Journal of Virology* **2003**, *77*, 9733-9737.
- ⁴⁷ Iampietro, M.; Younan, P.; Nishida, A.; Dutta, M.; Lubaki, N. M.; Santos, R. I.; Koup, R. A.; Katze, M. G.; Bukreyev, A. Ebola virus glycoprotein directly triggers T lymphocyte death despite of the lack of infection. *PLOS Pathogens* **2017**, *13*, e1006397
- ⁴⁸ Hotchkiss, R. S.; Strasser, A.; McDunn, J. E.; Swanson, P. E. Cell death. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1570-1583.
- ⁴⁹ Fink, S. L.; Cookson, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 1907-1916.
- ⁵⁰ U.S. Food and Drug Administration <https://www.fda.gov/EmergencyPreparedness/Counterterrorism/MedicalCountermeasures/MCMIssues/ucm608358.htm> (pristupljeno 25. aprila 2019. godine)
- ⁵¹ Cross, R. W.; Mire, C. E.; Feldmann, H.; Geisbert, T. W. Post-exposure treatments for Ebola and Marburg virus infections. *Nat Rev Drug Discov.* **2018**, *17*, 413-434.
- ⁵² Bradfute, S. B.; Dye, J. M.; Bavari, S. Filovirus vaccines. *Human Vaccines* **2011**, *7*, 701-711.
- ⁵³ Geisbert, T. W.; Feldmann, H. Recombinant Vesicular Stomatitis Virus–Based Vaccines Against Ebola and Marburg Virus Infections. *Journal of Infectious Diseases* **2011**, *204*, S1075-S1081.
- ⁵⁴ Warfield, K. L.; Aman, M. J. Advances in Virus-Like Particle Vaccines for Filoviruses. *Journal of Infectious Diseases* **2011**, *204*, S1053-S1059.
- ⁵⁵ Jones, S. M.; Stroher, U.; Fernando, L.; Qiu, X.; Alimonti, J.; Melito, P.; Bray, M.; Klenk, H. D.; Feldmann, H. Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **2007**, *196*, S404–412.
- ⁵⁶ Lambe, T.; Bowyer, G.; Ewer, K. J. A review of Phase I trials of Ebola virus vaccines: what can we learn from the race to develop novel vaccines? *Phil. Trans. R. Soc. B* **2017**, *372*, 20160295.
- ⁵⁷ Wong, G.; Audet, J.; Fernando, L.; Fausther-Bovendo, H.; Alimonti, J. B.; Kobinger, G. P.; Qiu, X. Immunization with vesicular stomatitis virus vaccine expressing the Ebola glycoprotein provides sustained long-term protection in rodents. *Vaccine* **2014**, *32*, 5722-5729.
- ⁵⁸ de Wit, E.; Marzi, A.; Bushmaker, T.; Brining, D.; Scott, D.; Richt, J. A.; Geisbert, T. W.; Feldmann, H. Safety of recombinant VSV–Ebola virus vaccine vector in pigs. *Emerg Infect Dis* **2015**, *21*, 702-704.
- ⁵⁹ Jones, S. M.; Feldmann, H.; Ströher, U.; Geisbert, J. B.; Fernando, L.; Grolla, A.; Klenk, H. D.; Sullivan, N. J.; Volchkov, V. E.; Fritz, E. A.; Daddario, K. M.; Hensley,

L. E.; Jahrling, P. B.; Geisbert, T. W. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* **2005**, *11*, 786-790.

⁶⁰ Feldmann, H.; Jones, S. M.; Daddario-DiCaprio, K. M.; Geisbert, J. B.; Ströher, U.; Grolla, A.; Bray, M.; Fritz, E. A.; Fernando, L.; Feldmann, F.; Hensley, L. E.; Geisbert, T. W. Effective post-exposure treatment of Ebola infection. *PLoS Pathog* **2007**, *3*, e2.

⁶¹ Geisbert, T. W.; Daddario-DiCaprio, K. M.; Lewis, M. G.; Geisbert, J. B.; Grolla, A.; Leung, A.; Paragas, J.; Matthias, L.; Smith, M. A.; Jones, S. M.; Hensley, L. E.; Feldmann, H.; Jahrling, P. B. Vesicular stomatitis virus-based Ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates. *PLOS Pathog* **2008**, *4*, e1000225.

⁶² Marzi, A.; Robertson, S. J.; Haddock, E.; Feldmann, F.; Hanley, P. W.; Scott, D. P.; Strong, J. E.; Kobinger, G.; Best, S. M.; Feldmann, H. VSV-EBOV rapidly protects macaques against infection with the 2014/15 Ebola virus outbreak strain. *Science* **2015**, *349*, 739-742.

⁶³ Chappell, K. J.; Watterson, D. Fighting Ebola: A Window for Vaccine Re-evaluation? *PLoS Pathog* **2017**, *13*, e1006037.

⁶⁴ Regules, J. A. *et al.* A recombinant vesicular stomatitis virus Ebola vaccine—preliminary report. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *376*, 330-341.

⁶⁵ Agnandji, S. T. *et al.* Phase 1 trials of rVSV Ebola vaccine in Africa and Europe. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1647-1660.

⁶⁶ Henao-Restrepo, A. M. *et al.* Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). *The Lancet* **2017**, *389*, 505-518.

⁶⁷ Chappell, K. J.; Watterson, D. Fighting Ebola: A Window for Vaccine Re-evaluation? *PLoS Pathogens* **2017**, *13*, e1006037.

⁶⁸ Martin, J. E.; Sullivan, N. J.; Enama, M. E.; Gordon, I. J.; Roederer, M.; Koup, R. A.; Bailer, R. T.; Chakrabarti, B. K.; Bailey, M. A.; Gomez, P. L.; Andrews, C. A.; Moodie, Z.; Gu, L.; Stein, J. A.; Nabel, G. J.; Graham, B. S. A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial. *Clin Vaccine Immunol.* **2006**, *13*, 1267-1277.

⁶⁹ Kibuuka, H. *et al.* Safety and immunogenicity of Ebola virus and Marburg virus glycoprotein DNA vaccines assessed separately and concomitantly in healthy Ugandan adults: a phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Lancet* **2015**, *385*, 1545-1554.

⁷⁰ Stanley, D. A.; *et al.* Chimpanzee adenovirus vaccine generates acute and durable protective immunity against ebolavirus challenge. *Nat Med* **2014**, *20*, 1126-1129.

⁷¹ Tapia, M. D. *et al.* Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis* **2016**, *16*, 31-42.

⁷² Ledgerwood, J. E. *et al.* Chimpanzee Adenovirus vector Ebola vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 928-938.

⁷³ Ledgerwood, J. E.; Costner, P.; Desai, N.; Holman, L.; Enama, M. E.; Yamshchikov, G.; Mulangu, S.; Hu, Z.; Andrews, C. A.; Sheets, R. A.; Koup, R. A.; Roederer, M.; Bailer, R.; Mascola, J. R.; Pau, M. G.; Sullivan, N. J.; Goudsmit, J.; Nabel, G. J.;

Graham, B. S.; VRC 205 Study Team. A replication defective recombinant Ad5 vaccine expressing Ebola virus GP is safe and immunogenic in healthy adults. *Vaccine* **2010**, *29*, 304-313.

⁷⁴ Zhu, F. C. *et al.* Safety and immunogenicity of a novel recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in China: preliminary report of a randomised, double-blind, placebocontrolled, phase 1 trial. *Lancet* **2015**, *385*, 2272-2279.

⁷⁵ Geisbert, T. W.; Bailey, M.; Hensley, L.; Asiedu, C.; Geisbert, J.; Stanley, D.; Honko, A.; Johnson, J.; Mulangu, S.; Pau, M. G.; Custers, J.; Vellinga, J.; Hendriks, J.; Jahrling, P.; Roederer, M.; Goudsmit, J.; Koup, R.; Sullivan, N. J. Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge. *J. Virol.* **2011**, *85*, 4222-4233.

⁷⁶ Shukarev, G.; Callendret, B.; Luhn, K.; Douoguih, M.; EBOVAC1 consortium. A two-dose heterologous prime-boost vaccine regimen eliciting sustained immune responses to Ebola Zaire could support a preventive strategy for future outbreaks. *Hum Vaccin Immunother.* **2017**, *13*, 266-270.

⁷⁷ Winslow, R. L.; Milligan, I. D.; Voysey, M.; Luhn, K.; Shukarev, G.; Douoguih, M.; Snape, M. D. Immune responses to novel Adenovirus type 26 and modified vaccinia virus Ankara-vectored Ebola vaccines at 1 Year. *JAMA* **2017**, *317*, 1075-1077.

⁷⁸ Geisbert, T. W. *et al.* Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet* **2010**, *375*, 1896-1905.

⁷⁹ <https://www.forbes.com/sites/davidkroll/2014/08/07/fda-moves-on-tekmiras-ebola-drug-while-sareptas-sits-unused/#4ef9d3e44373> (pristupljeno 25. aprila 2019. godine)

⁸⁰ Thi, E. P.; Mire, C. E.; Lee, A. C. H.; Geisbert, J. B.; Zhou, J. Z.; Agans, K. N.; Snead, N. M.; Deer, D. J.; Barnard, T. R.; Fenton, K. A.; MacLachlan, I.; Geisbert, T. W. Lipid nanoparticle siRNA treatment of Ebola virus Makona infected nonhuman primates. *Nature* **2015**, *521*, 362-365.

⁸¹ Dunning, J. *et al.* Experimental Treatment of Ebola Virus Disease with TKM-130803: A Single-Arm Phase 2 Clinical Trial. *PLoS Med* **2016**, *13*, e1001997.

⁸² Warfield, K. L.; Swenson, D. L.; Olinger, G. G.; Nichols, D. K.; Pratt, W. D.; Blouch, R.; Stein, D. A.; Aman, M. J.; Iversen, P. L.; Bavari, S. Gene-Specific Countermeasures against Ebola Virus Based on Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*, e1.

⁸³ Heald, A. E.; Iversen, P. L.; Saoud, J. B.; Sazani, P.; Charleston, J. S.; Axtelle, T.; Wong, M.; Smith, W. B.; Vutikullird, A.; Kaye, E. Safety and Pharmacokinetic Profiles of Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers with Activity against Ebola Virus and Marburg Virus: Results of Two Single-Ascending-Dose Studies *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 6639-6647.

⁸⁴ Heald, A. E. *et al.* AVI-7288 for Marburg Virus in Nonhuman Primates and Humans. *N Engl J Med* **2015**, *373*, 339-348.

⁸⁵ <https://www.sarepta.com/our-product> (pristupljeno 25. aprila 2019. godine)

⁸⁶ Qiu, X. *et al.* Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* **2014**, *514*, 47-53.

⁸⁷ PREVAIL II Writing Group; Multi-National PREVAIL II Study Team; Davey, R. T. J.; Dodd, L.; Proschan, M. A.; Neaton, J.; Neuhaus Nordwall, J.; Koopmeiners, J. S.; Beigel, J.; Tierney, J.; Lane, H. C.; Fauci, A. S.; Massaquoi, M. B. F.; Sahr, F.; Malvy,

D. A Randomized, Controlled Trial of ZMapp for Ebola Virus Infection. *N Engl J Med.* **2016**, *375*, 1448-1456.

⁸⁸ Olinger, G. G. J.; Pettitt, J.; Kim, D.; Working, C.; Bohorov, O.; Bratcher, B.; Hiatt, E.; Hume, S. D.; Johnson, A. K.; Morton, J.; Pauly, M.; Whaley, K. J.; Lear, C. M.; Biggins, J. E.; Scully, C.; Hensley, L.; Zeitlin, L. Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques. *PNAS* **2012**, *109*, 18030-18035.

⁸⁹ Wilson, J. A.; Hevey, M.; Bakken, R.; Guest, S.; Bray, M.; Schmaljohn, A. L.; Hart, M. K. Epitopes Involved in Antibody-Mediated Protection from Ebola Virus *Science* **2000**, *287*, 1664-1666.

⁹⁰ Lasala, F.; Arce, E.; Otero, J. R.; Rojo, J.; Delgado, R. Mannosyl Glycodendritic Structure Inhibits DC-SIGN-Mediated Ebola Virus Infection in cis and in trans. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3970-3972.

⁹¹ Ribeiro-Viana, R.; Sánchez-Navarro, M.; Luczkowiak, J.; Koeppe, J. R.; Delgado, R.; Rojo, J.; Davis, B. G. Virus-like glycodendrinanoparticles displaying quasi-equivalent nested polyvalency upon glycoprotein platforms potently block viral infection. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1303.

⁹² Illescas, B. M.; Rojo, J.; Delgado, R.; Martín N. Multivalent Glycosylated Nanostructures To Inhibit Ebola Virus Infection. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 6018-6025.

⁹³ Glazer, R. I.; Knode, M. C.; Tseng, C. K.; Haines, D. R.; Marquez, V. E. 3-Deazaneplanocin A: a new inhibitor of S-adenosylhomocysteine synthesis and its effects in human colon carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology* **1986**, *35*, 4523-4527.

⁹⁴ Bray, M.; Driscoll, J.; Huggins, J. W. Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral Research* **2000**, *45*, 135-147.

⁹⁵ Bray, M.; Raymond, J. L.; Geisbert, T.; Baker, R. O. 3-deazaneplanocin A induces massively increased interferon-alpha production in Ebola virus-infected mice. *Antiviral Research* **2002**, *55*, 151-159.

⁹⁶ Kinch, M. S.; Yunus, A. S.; Lear, C.; Mao, H.; Chen, H.; Fesseha, Z.; Luo, G.; Nelson, E. A.; Li, L.; Huang, Z.; Murray, M.; Ellis, W. Y.; Hensley, L.; Christopher-Hennings, J.; Olinger, G. G.; Goldblatt M. FGI-104: a broad-spectrum small molecule inhibitor of viral infection. *American Journal of Translational Research* **2009**, *1*, 87-98.

⁹⁷ Kinch, M.; Goldblatt, M. Methods of inhibiting viral infection WO2009091435 A2 **2009**

⁹⁸ Garrus, J. E.; von Schwedler, U. K.; Pornillos, O. W.; Morham, S. G.; Zavitz, K. H.; Wang, H. E.; Wettstein, D. A.; Stray, K. M.; Côté, M.; Rich, R. L.; Myszka, D. G.; Sundquist, W. I. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **2001**, *107*, 55-65.

⁹⁹ Perez, O. D.; Nolan, G. P. Resistance Is Futile: Assimilation of Cellular Machinery by HIV-1. *Immunity*, **2001**, *15*, 687-690.

¹⁰⁰ von Schwedler, U. K.; Stuchell, M.; Müller, B.; Ward, D. M.; Chung, H. Y.; Morita, E.; Wang, H. E.; Davis, T.; He, G. P.; Cimbara, D. M.; Scott, A.; Kräusslich, H. G.; Kaplan, J.; Morham, S. G.; Sundquist, W. I. The protein network of HIV budding. *Cell* **2003**, *114*, 701-713.

-
- ¹⁰¹ Harty, R. N.; Brown, M. E.; Wang, G.; Huibregtse, J.; Hayes, F. P. A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *PNAS* **2000**, *97*, 13871-13876.
- ¹⁰² Martin-Serrano, J.; Zang, T.; Bieniasz, P. D. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nature Medicine* **2001**, *7*, 1313-1319.
- ¹⁰³ Timmins, J.; Schoehn, G.; Ricard-Blum, S.; Scianimanico, S.; Vernet, T.; Ruigrok, R. W.; Weissenhorn, W. Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *326*, 493-502.
- ¹⁰⁴ Urata, S.; Noda, T.; Kawaoka, Y.; Morikawa, S.; Yokosawa, H.; Yasuda, J. Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *Journal of Virology* **2007**, *81*, 4895-4899.
- ¹⁰⁵ Silvestri, L. S.; Ruthel, G.; Kallstrom, G.; Warfield, K. L.; Swenson, D. L.; Nelle, T.; Iversen, P. L.; Bavari, S.; Aman, M. J. Involvement of vacuolar protein sorting pathway in Ebola virus release independent of TSG101 interaction. *Journal of Infectious Diseases* **2007**, *196*, S264-270.
- ¹⁰⁶ Warren, T. K.; Warfield, K. L.; Wells, J.; Enterlein, S.; Smith, M.; Ruthel, G.; Yunus, A. S.; Kinch, M. S.; Goldblatt, M.; Aman, M. J.; Bavari, S. Antiviral activity of a small-molecule inhibitor of filovirus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, *54*, 2152-2159.
- ¹⁰⁷ Bradfute, S. B.; Warfield, K. L.; Bray, M. Mouse Models for Filovirus Infections. *Viruses* **2012**, *4*, 1477-1508.
- ¹⁰⁸ Aman, M. J.; Bavari, S.; Burnett, J. C.; Lyn, K. Warfield Antiviral compounds and methods of using thereof. WO2008089125 A2 **2008**
- ¹⁰⁹ Aman, M. J.; Kinch, M. S.; Warfield, K.; Warren, T.; Yunus, A.; Enterlein, S.; Stavale, E.; Wang, P.; Chang, S.; Tang, Q.; Porter, K.; Goldblatt, M.; Bavari, S. Development of a broad-spectrum antiviral with activity against Ebola virus. *Antiviral Research* **2009**, *83*, 245-251.
- ¹¹⁰ Smith, D. R.; Ogg, M.; Garrison, A.; Yunus, A.; Honko, A.; Johnson, J.; Olinger, G.; Hensley, L. E.; Kinch, M. S. Development of FGI-106 as a broad-spectrum therapeutic with activity against members of the family Bunyaviridae. *Virus Adaptation and Treatment* **2010**, *2*, 9-20.
- ¹¹¹ Opsenica, I.; Burnett, J. C.; Gussio, R.; Opsenica, D.; Todorovic, N.; Lanteri, C. A.; Sciotti, R. J.; Gettayacamin, M.; Basilico, N.; Taramelli, D.; Nuss, J. E.; Wanner, L.; Panchal, R. G.; Šolaja, B. A.; Bavari, S. A chemotype that inhibits three unrelated pathogenic targets: The botulinum neurotoxin serotype a light chain, p. Falciparum malaria, and the ebola filovirus. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 1157-1169.
- ¹¹² Aman, J.; Kinch, M.; Enterlein, S.; Abdul, Y. Protease inhibitors and broad-spectrum antiviral. WO2011078937 A1 **2011**
- ¹¹³ Šegan, S. B.; Trifković, J. Đ.; Verbić, T. Z.; Opsenica, D. M.; Zlatović, M. V.; Burnett, J.; Šolaja, B. A.; Milojković-Opsenica, D. M. Correlation between structure, retention, property, and activity of biologically relevant 1,7-bis(aminoalkyl)diazachrysenes derivatives. *J. Pharm. and Biomed. Anal.* **2013**, *72*, 231-239.

-
- ¹¹⁴ Basu, A.; Li, B.; Mills, D. M.; Panchal, R. G.; Cardinale, S. C.; Butler, M. M.; Peet, N. P.; Majgier-Baranowska, H.; Williams, J. D.; Patel, I.; Moir, D. T.; Bavari, S.; Ray, R.; Farzan, M. R.; Rong, L.; Bowlin, T. L. Identification of a small-molecule entry inhibitor for filoviruses. *Journal of Virology* **2011**, *85*, 3106-3119.
- ¹¹⁵ Guo, H.; Pan, X.; Mao, R.; Zhang, X.; Wang, L.; Lu, X.; Chang, J.; Guo, J. T.; Passic, S.; Krebs, F. C.; Wigdahl, B.; Warren, T. K.; Retterer, C. J.; Bavari, S.; Xu, X.; Cuconati, A.; Block, T. M. Alkylated porphyrins have broad antiviral activity against hepadnaviruses, flaviviruses, filoviruses, and arenaviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, *55*, 478-486.
- ¹¹⁶ Panchal, R. G.; Reid, S. P.; Tran, J. P.; Bergeron, A. A.; Wells, J.; Kota, K. P.; Aman, J.; Bavari, S. Identification of an antioxidant small-molecule with broad-spectrum antiviral activity. *Antiviral Res.* **2012**, *93*, 23-29.
- ¹¹⁷ Kesel, A. J.; Huang, Z.; Murray, M. G.; Prichard, M. N.; Caboni, L.; Nevin, D. K.; Fayne, D.; Lloyd, D. G.; Detorio, M. A.; Schinazi, R. F. Retinazone inhibits certain blood-borne human viruses including Ebola virus Zaire. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **2014**, *23*, 197-215.
- ¹¹⁸ Reid, S. P.; Shurtleff, A. C.; Costantino, J. A.; Tritsch, S. R.; Retterer, C.; Spurgers, K. B.; Bavari, S. HSPA5 is an essential host factor for Ebola virus infection..*Antiviral Research* **2014**, *109*, 171-174.
- ¹¹⁹ Brown, C. S.; Lee, M. S.; Leung, D. W.; Wang, T.; Xu, W.; Luthra, P.; Anantpadma, M.; Shabman, R. S.; Melito, L. M.; MacMillan, K. S.; Borek, D. M.; Otwinowski, Z.; Ramanan, P.; Stubbs, A. J.; Peterson, D. S.; Binning, J. M.; Tonelli, M.; Olson, M. A.; Davey, R. A.; Ready, J. M.; Basler, C. F.; Amarasinghe, G. K. In silico derived small molecules bind the filovirus VP35 protein and inhibit its polymerase cofactor activity. *Journal of Molecular Biology* **2014**, *426*, 2045-2058.
- ¹²⁰ Filone, C. M.; Hodges, E. N.; Honeyman, B.; Bushkin, G. G.; Boyd, K.; Platt, A.; Ni, F.; Strom, K.; Hensley, L.; Snyder, J. K.; Connor, J. H. Identification of a broad-spectrum inhibitor of viral RNA synthesis: validation of a prototype virus-based approach. *Chemistry & Biology* **2013**, *20*, 424-433.
- ¹²¹ Wolf, M. C.; Freiberg, A. N.; Zhang, T.; Akyol-Ataman, Z.; Grock, A.; Hong, P. W.; Li, J.; Watson, N. F.; Fang, A. Q.; Aguilar, H. C.; Porotto, M.; Honko, A. N.; Damoiseaux, R.; Miller, J. P.; Woodson, S. E.; Chantasirivisal, S.; Fontanes, V.; Negrete, O. A.; Krogstad, P.; Dasgupta, A.; Moscona, A.; Hensley, L. E.; Whelan, S. P.; Faull, K. F.; Holbrook, M. R.; Jung, M. E.; Lee, B. A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses. *PNAS* **2010**, *107*, 3157-3162.
- ¹²² Baell, J. B.; Holloway, G. A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 2719-40.
- ¹²³ Furuta, Y.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Sakamoto, K.; Smee, D. F.; Barnard, D. L.; Gowen, B. B.; Julander, J. G.; Morrey, J. D. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. *Antiviral Research* **2009**, *82*, 95-102.
- ¹²⁴ Jin, Z.; Smith, L. K.; Rajwanshi, V. K.; Kim, B.; Deval, J. The Ambiguous Base-Pairing and High Substrate Efficiency of T-705 (Favipiravir) Ribofuranosyl 5'-Triphosphate towards Influenza A Virus Polymerase. *PLoS One* **2013**, *8*, e68347.

-
- ¹²⁵ Oestereich, L.; Lüdtke, A.; Wurr, S.; Rieger, T.; Muñoz-Fontela, C.; Günthera, S. Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral Research* **2014**, *105*, 17-21.
- ¹²⁶ Sissoko, D. *et al.* Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea. *PLoS Med* **2016**, *13*, e1001967.
- ¹²⁷ Misasi, J.; Chandran, K.; Yang, J. Y.; Considine, B.; Filone, C. M.; Côté, M.; Sullivan, N.; Fabozzi, G.; Hensley, L.; Cunningham, J. Filoviruses require endosomal cysteine proteases for entry but exhibit distinct protease preferences. *Journal of Virology*, **2012**, *86*, 3284-3292.
- ¹²⁸ Lee, K.; Ren, T.; Côté, M.; Gholamreza, B.; Misasi, J.; Bruchez, A.; Cunningham, J. Inhibition of Ebola virus infection: identification of Niemann-Pick C1 as the target by optimization of a chemical probe. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *4*, 239-243
- ¹²⁹ Cunningham, J.; Lee, K.; Ren, T.; Chandran, K. Small molecule inhibitors of ebola and lassa fever viruses. WO2013022550 A2 **2013**
- ¹³⁰ Chandran, K.; Sullivan, N. J.; Felbor, U.; Whelan, S. P.; Cunningham, J. M. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **2005**, *308*, 1643-1645.
- ¹³¹ Shoemaker, C. J.; Schornberg, K. L.; Delos, S. E.; Scully, C.; Pajouhesh, H.; Olinger, G. G.; Johansen, L. M.; White, J. M. Multiple cationic amphiphiles induce a Niemann-Pick C phenotype and inhibit Ebola virus entry and infection. *PLoS One* **2013**, *8*, e56265.
- ¹³² Gehring, G.; Rohrmann, K.; Atenchong, N.; Mittler, E.; Becker, S.; Dahlmann, F.; Pöhlmann, S.; Vondran, F. W. R.; David, S.; Manns, M. P.; Ciesek, S.; von Hahn, T. The clinically approved drugs amiodarone, dronedarone and verapamil inhibit filovirus cell entry. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *6*, 2123-2131.
- ¹³³ Madrid, P. B.; Chopra, S.; Manger, I. D.; Gilfillan, L.; Keepers, T. R.; Shurtleff, A. C.; Green, C. E.; Iyer, L. V.; Dilks, H. H.; Davey, R. A.; Kolokoltsov, A. A.; Carrion, R.; Patterson, J. L.; Bavari, S.; Panchal, R. G.; Warren, T. K.; Wells, J. B.; Moos, W. H.; Burke, R. L. Tanga, M. J. A systematic screen of FDA-approved drugs for inhibitors of biological threat agents. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60579.
- ¹³⁴ Madrid, P. B.; Panchal, R. G.; Warren, T. K.; Shurtleff, A. C.; Endsley, A. N.; Green, C. E.; Kolokoltsov, A.; Davey, R.; Manger, I. D.; Gilfillan, L.; Bavari, S.; Tanga, M. J. Evaluation of Ebola virus inhibitors for drug repurposing. *ACS Inf. Dis.* **2015**, *1*, 317-326.
- ¹³⁵ Johansen, L. M.; DeWald, L. E.; Shoemaker, C. J.; Hoffstrom, B. G.; Lear-Rooney, C. M.; Stossel, A.; Nelson, E.; Delos, S. E.; Simmons, J. A.; Grenier, J. M.; Pierce, L. T.; Pajouhesh, H.; Lehár, J.; Hensley, L. E.; Glass, P. J.; White, J. M.; Olinger, G. G. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity. *Sci Transl Med.* **2015**, *7*, 290ra89.
- ¹³⁶ Johansen, L. M.; Brannan, J. M.; Delos, S. E.; Shoemaker, C. J.; Stossel, A.; Lear, C.; Hoffstrom, B. G.; Evans DeWald, L.; Schornberg, K. L.; Scully, C.; Lehár, J.; Hensley, L. E.; White, J. M.; Olinger, G. G. FDA-approved selective estrogen receptor modulators inhibit Ebola virus infection. *Sci Transl Med.* **2013**, *5*, 190ra79.
- ¹³⁷ Dowall, S. D.; Bosworth, A.; Watson, R.; Bewley, K.; Taylor, I.; Rayner, E.; Hunter, L.; Pearson, G.; Easterbrook, L.; Pitman, J.; Hewson, R.; Carroll, M. W.

Chloroquine inhibited Ebola virus replication in vitro but failed to protect against infection and disease in the in vivo guinea pig model. *J Gen Virol.* **2015**, *96*, 3484-3492.

¹³⁸ Falzarano, D.; Safronetz, D.; Prescott, J.; Marzi, A.; Feldmann, F.; Feldmann, H. Lack of protection against Ebola virus from chloroquine in mice and hamsters. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1065-1067.

¹³⁹ Fan, H.; Du, X.; Zhang, J.; Zheng, H.; Lu, X.; Wu, Q.; Li, H.; Wang, H.; Shi, Y.; Gao, G.; Zhou, Z.; Tan, D.-X.; Li, X. Selective inhibition of Ebola entry with selective estrogen receptor modulators by disrupting the endolysosomal calcium. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 41226.

¹⁴⁰ Zhao, Y.; Ren, J.; Harlos, K.; Jones, D. M.; Zeltina, A.; Bowden, T. A.; Padilla-Parra, S.; Fry, E. E.; Stuart, D. I. Toremfifene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein. *Nature* **2016**, *535*, 169-172.

¹⁴¹ Warren, T. K.; Wells, J.; Panchal, R. G.; Stuthman, K. S.; Garza, N. L.; Van Tongeren, S. A.; Dong, L.; Retterer, C. J.; Eaton, B. E.; Pegoraro, G.; Honnold, S.; Bantia, S.; Kotian, P.; Chen, X.; Taubenheim, B. R.; Welch, L. W.; Minning, D. M.; Babu, Y. S.; Sheridan, W. P.; Bavari, S. Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature* **2014**, *508*, 402-405.

¹⁴² Warren, T. K.; Jordan, R.; Lo, M. K.; Ray, A. S.; Mackman, R. L.; Soloveva, V.; Siegel, D.; Perron, M.; Bannister, R.; Hui, H. C.; Larson, N.; Strickley, R.; Wells, J.; Stuthman, K. S.; Van Tongeren, S. A.; Garza, N. L.; Donnelly, G.; Shurtleff, A. C.; Retterer, C. J.; Gharaibeh, D.; Zamani, R.; Kenny, T.; Eaton, B. P.; Grimes, E.; Welch, L. S.; Gomba, L.; Wilhelmsen, C. L.; Nichols, D. K.; Nuss, J. E.; Nagle, E. R.; Kugelman, J. R.; Palacios, G.; Doerffler, E.; Neville, S.; Carra, E.; Clarke, M. O.; Zhang, L.; Lew, W.; Ross, B.; Wang, Q.; Chun, K.; Wolfe, L.; Babusis, D.; Park, Y.; Stray, K. M.; Trancheva, I.; Feng, J. Y.; Barauskas, O.; Xu, Y.; Wong, P.; Braun, M. R.; Flint, M.; McMullan, L. K.; Chen, S.-S.; Fearn, R.; Swaminathan, S.; Mayers, D. L.; Spiropoulou, C. F.; Lee, W. A.; Nichol, S. T.; Cihlar, T.; Bavari, S. Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature* **2016**, *531*, 381-385.

¹⁴³ Lo, M. K.; Jordan, R.; Arvey, A.; Sudhamsu, J.; Shrivastava-Ranjan, P.; Hotard, A. L.; Flint, M.; McMullan, L. K.; Siegel, D.; Clarke, M. O.; Mackman, R. L.; Hui, H. C.; Perron, M.; Ray, A. S.; Cihlar, T.; Nichol, S. T.; Spiropoulou, C. F. GS-5734 and its parent nucleoside analog inhibit Filo-, Pneumo-, and Paramyxoviruses. *Sci Rep.* **2017**, *7*, 43395.

¹⁴⁴ Palani, A.; Shapiro, S.; Josien, H.; Bara, T.; Clader, J. W.; Greenlee, W. J.; Cox, K.; Strizki, J. M.; Baroudy, B. M. Synthesis, SAR, and biological evaluation of oximino-piperidino-piperidine amides. 1. Orally bioavailable CCR5 receptor antagonists with potent anti-HIV activity. *J Med Chem.* **2002**, *45*, 3143-3160.

¹⁴⁵ Hall, C. M.; Wright, J. B.; Johnson, H. G.; Taylor, A. J. Quinoline Derivatives as Antiallergy Agents. 2. Fused-Ring Quinaldic Acids. *Journal of Medicinal Chemistry* **1977**, *20*, 1337-1343.

¹⁴⁶ Zwegw, D.; Chen, C.; Deer, C. A Mild and Efficient Synthesis of 4-Quinolones and Quinolone Heterocycles. *Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 4276-4279.

¹⁴⁷ Dun, G. E.; Lee, G. K.; Thimm, H. Kinetics and Mechanism of Decarboxylation of some Pyridinecarboxylic Acids in Aqueous Solution. *Canadian Journal of Chemistry* **1972**, *50*, 3017-3027.

- ¹⁴⁸ Knölker, H.-J.; Hitzemann R. Selective Reactions of Functionalized Imidazo[1,2-a]pyridines: Stereospecific Synthesis of 5,6-Dihydroimidazo[1,2-a]pyridines. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 2157-2160.
- ¹⁴⁹ Krapcho, A. P. Recent synthetic applications of the dealkoxycarbonylation reaction. Part 1. Dealkoxycarbonylations of malonate esters. *ARKIVOC* **2007**, (ii), 1-53.
- ¹⁵⁰ Ritchie, T. J.; Macdonald, S. J. F.; The impact of aromatic ring count on compound developability - are too many aromatic rings a liability in drug design? *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 1011-1020.
- ¹⁵¹ Johns, A.; Alan Porter, R. Cinnamide derivatives as orexin-1 receptors antagonists. Int. Patent 2000047576, August 17, 2000.
- ¹⁵² Castro, A. C.; Evans, C. A.; Janardanannair, S.; Lesarbeau, A.; Liu, T.; Snyder, D. A.; Tremblay, M. R.; Ren, P.; Liu, Y.; Li, L.; Chan, K. Heterocyclic compounds and uses thereof. Int. Patent 2013012915, January 24, 2013.
- ¹⁵³ Brown, S. B.; Dewar, M. J. S.; Centrosymmetric 1,5-Naphthyridine Derivatives: Synthesis, Tautomerism, and Thermal Rearrangements. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1331-1337.
- ¹⁵⁴ Provencal, D. P.; Gesenberg, K. D.; Wang, H.; Escobar, C.; Wong, H.; Brown, M. A.; Staab, A. J.; Pendri, Y. R. Development of an Efficient and Scalable Process of a Respiratory Syncytial Virus Inhibitor. *Org. Proc. Res. Dev.* **2004**, *8*, 903-908.
- ¹⁵⁵ Noritake, Y.; Umezawa, N.; Kato, N.; Higuchi, T. Manganese Salen Complexes with Acid-Base Catalytic Auxiliary: Functional Mimetics of Catalase. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 3653-3662.
- ¹⁵⁶ Panchal, R. G.; Kota, K. P.; Spurgers, K. B.; Ruthel, G.; Tran, J. P.; Boltz, R. C.; Bavari, S. Development of high-content imaging assays for lethal viral pathogens. *J. Biomol. Screen.* **2010**, *15*, 755-765
- ¹⁵⁷ Mudhasani, R.; Kota, K. P.; Retterer, C.; Tran, J. P.; Tritsch, S. R.; Zamani, R.; Whitehouse, C. A.; Bavari, S. High-content image-based screening of a signal transduction pathway inhibitor small-molecule library against highly pathogenic RNA viruses. *J. Biomol. Screen.* **2015**, *20*, 141-152.
- ¹⁵⁸ Lee, K.; Ren, T.; Côté, M.; Gholamreza, B.; Misasi, J.; Bruchez, A.; Cunningham, J. Inhibition of Ebola virus infection: identification of Niemann-Pick C1 as the target by optimization of a chemical probe. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *4*, 239-243.
- ¹⁵⁹ Department of Defense, ADMET Center at USAMRICD, Gunpowder, Maryland, USA.
- ¹⁶⁰ Punith, R.; Hegde, A. H.; Jaldappagari, S. Binding of an anti-inflammatory drug lornoxicam with blood proteins: insights from spectroscopic investigations. *J. Fluoresc.* **2011**, *21*, 487-495.
- ¹⁶¹ Zsila, F.; Visy, J.; Mády, G.; Fitos, I. Selective plasma protein binding of antimalarial drugs to α 1-acid glycoprotein. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3759-3772.
- ¹⁶² Schwertz, G.; Witschel, M. C.; Rottmann, M.; Bonnert, R.; Leartsakulpanich, U.; Chitnumsub, P.; Jaruwat, A.; Ittarat, W.; Schäfer, A.; Aponte, R. A.; Charman, S. A.; White, K. L.; Kundu, A.; Sadhukhan, S.; Lloyd, M.; Freiberg, G. M.; Srikumaran, M.; Siggel, M.; Zwysig, A.; Chaiyen, P.; Diederich, F. Antimalarial inhibitors targeting serine hydroxymethyltransferase (SHMT) with in vivo efficacy and analysis of their binding mode based on X-ray cocrystal structures. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 4840-4860.

-
- ¹⁶³ ACD/Labs Release 12.0, ACD/PhysChem build 39480 - Advanced Chemistry Development, Inc. 8 King Street East, Suite 107, Toronto, Ontario, Canada M5C 1B5
- ¹⁶⁴ ADMET Predictor, Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, USA, ver. 8.5, 2017.
- ¹⁶⁵ Fraczekiewicz, R.; Lobell, M.; Göller, A. H.; Krenz, U.; Schoenneis, R.; Clark, R. D.; Hillisch, A. Best of both worlds: Combining pharma data and state of the art modeling technology to improve in silico pKa prediction. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2014**, *55*, 389-397.
- ¹⁶⁶ Schulman J. M.; Strichartz, G. R. Local anesthetic pharmacology. In *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*, 3rd edition; Golan, D. E.; Tashjian, A. H.; Armstrong E. J.; Armstrong, A. W.; LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS: Philadelphia, **2012**; pp 147-163.
- ¹⁶⁷ Chakraborty, C.; Sharma, A. R.; Sharma, G.; Lee, S-S. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *J. Nanobiotechnol.* **2016**, *14*, 65.
- ¹⁶⁸ MacRae, C. A.; Peterson, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2015**, *14*, 721-731.
- ¹⁶⁹ Zhang, Y.; Han, L.; He, Q.; Chen, W.; Sun, C.; Wang, X.; Chen, X.; Wang, R.; Hsiao, C.-D.; Liu, K. A rapid assessment for predicting drug-induced hepatotoxicity using zebrafish. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2017**, *84*, 102-110.
- ¹⁷⁰ Hill, A.; Mesens, N.; Steemans, M.; Xu, J. J.; Aleo, M. D. Comparisons between in vitro whole cell imaging and in vivo zebrafish-based approaches for identifying potential human hepatotoxicants earlier in pharmaceutical development. *Drug Metabolism Reviews* **2012**, *44*, 127-140.
- ¹⁷¹ Bray, M.; Davis, K.; Geisbert, T.; Schmaljohn, C.; Huggins, J. A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* **1998**, *178*, 651-661.
- ¹⁷² Iversen, P. L.; Warren, T. K.; Wells, J. B.; Garza, N. L.; Mourich, D. V.; Welch, L. S.; Panchal, R. G.; Bavari, S. Discovery and early development of AVI-7537 and AVI-7288 for the treatment of Ebola virus and Marburg virus infections. *Viruses* **2012**, *4*, 2806-2830.
- ¹⁷³ Chang, J.; Warren, T. K.; Zhao, X.; Gill, T.; Guo, F.; Wang, L.; Comunale, M. A.; Du, Y.; Alonzi, D. S.; Yu, W.; Ye, H.; Liu, F.; Guo, J. T.; Mehta, A.; Cuconati, A.; Butters, T. D. Bavari, S.; Xu, X.; Block, T. M. Small molecule inhibitors of ER alpha-glucosidases are active against multiple hemorrhagic fever viruses, *Antiviral Res.* **2013**, *98*, 432-440.
- ¹⁷⁴ Funk, R. S.; Krise, J. P. Cationic amphiphilic drugs cause a marked expansion of apparent lysosomal volume: implications for an intracellular distribution-based drug interaction. *Mol Pharm* **2012**, *9*, 1384-1395.
- ¹⁷⁵ Mingo, R.M.; Simmons, J. A.; Shoemaker, C. J.; Nelson, E. A.; Schornberg, K. L.; D'Souza, R. S.; Casanova, J. E.; White, J. M. Ebola virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus display late cell entry kinetics: evidence that transport to NPC1+ endolysosomes is a rate-defining step. *J Virol* **2015**, *89*, 2931-2943.
- ¹⁷⁶ Wong, A. C.; Sandesara, R. G.; Mulherkar, N.; Whelan, S. P.; Chandran, K. A forward genetic strategy reveals destabilizing mutations in the Ebolavirus glycoprotein that alter its protease dependence during cell entry. *J Virol* **2010**, *84*, 163-175.
- ¹⁷⁷ Sieczkarski, S. B.; Whittaker, G. R. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic* **2003**, *4*, 333-343.

- ¹⁷⁸ Wool-Lewis, R. J.; Bates, P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J Virol* **1998**, *72*, 3155-3160.
- ¹⁷⁹ Maxfield, F. R.; Yamashiro, D. J. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol* **1987**, *225*, 189-198.
- ¹⁸⁰ Tapper, H.; Sundler, R. Bafilomycin A1 inhibits lysosomal, phagosomal, and plasma membrane H(+)-ATPase and induces lysosomal enzyme secretion in macrophages. *J Cell Physiol* **1995**, *163*, 137-144.
- ¹⁸¹ Thome, M. P.; Filippi-Chiela, E. C.; Villodre, E. S.; Migliavaca, C. B.; Onzi, G. R.; Felipe, K. B.; Lenz, G. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *J Cell Sci* **2016**, *129*, 4622-4632.
- ¹⁸² Zilbermintz, L.; Leonardi, W.; Jeong, S. Y.; Sjodt, M.; McComb, R.; Ho, C. L.; Retterer, C.; Gharaibeh, D.; Zamani, R.; Soloveva, V.; Bavari, S.; Levitin, A.; West, J.; Bradley, K. A.; Clubb, R. T.; Cohen, S. N.; Gupta, V.; Martchenko, M. Identification of agents effective against multiple toxins and viruses by host-oriented cell targeting. *Sci Rep* **2015**, *5*, 13476.
- ¹⁸³ Lum, J. J.; Bauer, D. E.; Kong, M.; Harris, M. H.; Li, C.; Lindsten, T.; Thompson, C. B. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **2005**, *120*, 237-248.
- ¹⁸⁴ Goodall, M. L.; Wang, T.; Martin, K. R.; Kortus, M. G.; Kauffman, A. L.; Trent, J. M.; Gately, S.; MacKeigan, J. P. Development of potent autophagy inhibitors that sensitize oncogenic BRAF V600E mutant melanoma tumor cells to vemurafenib. *Autophagy* **2014**, *10*, 1120-1136.
- ¹⁸⁵ Yamasaki, K.; Chuang, V. T. G.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 5435-5443.
- ¹⁸⁶ Israili, Z. H.; Dayton, P. G. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab. Rev.* **2001**, *33*, 161-235.
- ¹⁸⁷ Smith, D. A.; Di, L.; Kerns, E. H. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 929-939.
- ¹⁸⁸ Kouznetsova, J.; Sun, W.; Martínez-Romero, C.; Tawa, G.; Shinn, P.; Chen, C. Z.; Schimmer, A.; Sanderson, P.; McKew, J. C.; Zheng, W.; García-Sastre, A. Identification of 53 compounds that block Ebola virus-like particle entry via a repurposing screen of approved drugs. *Emerg Microbes Infect* **2014**, *3*, e84.
- ¹⁸⁹ Nelson, E. A.; Barnes, A. B.; Wiehle, R. D.; Fontenot, G. K.; Hoenen, T.; White, J. M.; Clomiphene and its isomers block Ebola virus particle entry and infection with similar potency: potential therapeutic implications. *Viruses* **2016**, *8*, 206.
- ¹⁹⁰ Salata, C.; Calistri, A.; Parolin, C.; Baritussio, A.; Palù, G.; Antiviral activity of cationic amphiphilic drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2017**, *15*, 483-492.
- ¹⁹¹ Nadanaciva, S.; Lu, S.; Gebhard, D. F.; Jessen, B. A.; Pennie, W. D.; Will, Y. A high content screening assay for identifying lysosomotropic compounds. *Toxicol. In Vitro* **2011**, *25*, 715-723.
- ¹⁹² Lu, S.; Sung, T.; Lin, N.; Abraham, R. T.; Jessen, B. A. Lysosomal adaptation: How cells respond to lysosomotropic compounds. *PLoS One*. **2017**, *12*, e0173771.

-
- ¹⁹³ Logan, R.; Kong, A. C.; Axcell, E.; Krise, J. P. Amine-containing molecules and the induction of an expanded lysosomal volume phenotype: a structure-activity relationship study. *J Pharm Sci.* **2014**, *103*, 1572-1580.
- ¹⁹⁴ Sakurai, Y.; Kolokoltsov, A. A.; Chen, C. C.; Tidwell, M. W.; Bauta, W. E.; Klugbauer, N.; Grimm, C.; Wahl-Schott, C.; Biel, M.; Davey, R. A.; Ebola virus. Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment. *Science* **2015**, *347*, 995-998.
- ¹⁹⁵ Jiang, P.; Nishimura, T.; Sakamaki, Y.; Itakura, E.; Hatta, T.; Natsume, T.; Mizushima, N. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell.* **2014**, *25*, 1327-1337.
- ¹⁹⁶ Shayman, J. A.; Abe, A. Drug induced phospholipidosis: an acquired lysosomal storage disorder. *Biochim Biophys Acta.* **2013**, *1831*, 602-611.
- ¹⁹⁷ Garbutt, M.; Liebscher, R.; Wahl-Jensen, V.; Jones, S.; Möller, P.; Wagner, R.; Volchkov, V.; Klenk, H. D.; Feldmann, H.; Ströher, U. Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J Virol* **2004**, *78*, 5458-5465.
- ¹⁹⁸ Fung, C.; Lock, R.; Gao, S.; Salas, E.; Debnath, J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* **2008**, *19*, 797-806.
- ¹⁹⁹ Mudhasani, R.; Kota, K. P.; Retterer, C.; Tran, J. P.; Whitehouse, C. A.; Bavari, S. Highcontent image-based screening of a protease inhibitor library reveals compounds broadly active against Rift Valley fever virus and other highly pathogenic RNA viruses. *PLoS Negl Trop Dis.* **2014**, *8*, e3095.
- ²⁰⁰ Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, *43*, 1739-1753.
- ²⁰¹ Gans, P.; O'Sullivan, B. *Talanta* **2000**, *51*, 33-37.
- ²⁰² OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 236, (2013).

Биографски подаци о кандидату:

Живота Селаковић рођен је 19. септембра 1988. године у Ваљеву, Република Србија. Основну и средњу школу завршио је у Ваљеву.

Основне академске студије на студијском програму Дипломирани хемичар уписао је школске 2007/08. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду. Студије је завршио са просечном оценом 10 (десет), а завршни рад под називом „Бис-аминохинолински деривати холне киселине као инхибитори ботулиnum неуротоксина“ одбранио је 14. септембра 2011. године код професора Богдана Шолаје.

Мастер академске студије на студијском програму Мастер хемичар уписао је школске 2011/12. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду. Студије је завршио са просечном оценом 10 (десет), а мастер рад под називом „Нови 1,7-бис(алкиламино)-4,10-диазахризени: синтеза и биолошка активност“ одбранио је 7. августа 2012. године.

Школске 2012/13. уписао је докторске студије на Хемијском факултету у Београду, при Катедри за органску хемију. Положио је све испите предвиђене програмом докторских студија са просечном оценом 10 (десет).

Од 1. новембра 2012. до 31. децембра 2012. радио је као истраживач-приправник на Иновационом центру Хемијског факултета. Од 1. јануара 2013. до 10. децембра 2018. радио је као асистент на Хемијском факултету Универзитета у Београду. Од 13. септембра 2018. има звање истраживач-сарадник.

Ради на домаћем фундаменталном пројекату 172008 (Синтеза аминокиселина и њихових деривата као антималярија и инхибитора ботулиnum неуротоксина А) од 2012. године. Од октобра 2012. до данас ангажован је у настави - држао је лабораторијске и теоријске вежбе из предмета Органска хемија 1, Органска хемија 2, Органска хемија, Практикум из органске хемије и Одабране области органске хемије.

Кандидат је био студент генерације Хемијског факултета 2011. године. Добио је Годишњу награду Српског хемијског друштва 2012. године за успех у току студија. Фонд Ненада М. Костића доделио му је награду за најбољи мастер рад из области хемијских наука у периоду од 1. 4. 2012. до 31. 3. 2013. године.

Библиографија кандидата

● Радови објављени у међународним часописима изузетних вредности (M21a):

1. Videnović, M.; Opsenica, D. M.; Burnett, J. C.; Gomba, L.; Nuss, J. E.; Selaković, Ž.; Konstantinović, J.; Krstić, M.; Šegan, S.; Zlatović, M.; Sciotti, R. J.; Bavari, S.; Šolaja, B. A. Second Generation Steroidal 4-Aminoquinolines Are Potent, Dual-Target Inhibitors of the Botulinum Neurotoxin Serotype A Metalloprotease and P. falciparum Malaria. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4134-4153.

Chemistry, Medicinal (3/58)

IF = 5,480 (2013)

Издавач: American Chemical Society

Print Edition ISSN: 0022-2623; Web Edition ISSN: 1520-4804

Web часописа: <http://pubs.acs.org/journal/jmcmar>

Web: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm500033r>

doi: 10.1021/jm500033r

2. Selaković, Ž.; Tran, J. P.; Kota, K. P.; Lazić, M.; Retterer, C.; Besh, R.; Panchal, R. G.; Soloveva, V.; Sean, V. A.; Wells, J. B.; Pavić, A.; Verbić, T.; Vasiljević, B.; Kuehl, K.; Duplantier, A. J.; Bavari, S.; Mudhasani, R.; Šolaja, B. A. Second generation of diazachrysenes: protection of Ebola virus infected mice and mechanism of action. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *162*, 32-50.

Chemistry, Medicinal (4/59)

IF = 4,816 (2017)

Издавач: Elsevier France ^Editions Scientifiques et Medicales

Print Edition ISSN: 0009-4374; Web Edition ISSN: 0223-5234

Web часописа: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523418309383>

doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.061

● Радови објављени у истакнутим међународним часописима (M22):

1. Selaković, Ž.; Opsenica, D.; Eaton, B.; Retterer, C.; Bavari, S.; Burnett, J. C.; Šolaja, B. A.; Panchal, R. G. A Limited Structural Modification Results in a Significantly More Efficacious Diazachrysene-Based Filovirus Inhibitor. *Viruses* **2012**, *4*, 1279-1288.

Virology (18/34)

IF = 2,435 (2012).

Издавач: MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute), Basel

ISSN: 1999-4915

Web часописа: <http://www.mdpi.com/journal/viruses>

Web: <http://www.mdpi.com/1999-4915/4/8/1279>

doi: 10.3390/v4081279

● Радови објављени у међународним часописима (M23):

1. Selaković, Ž.; Soloveva, V.; Gharaibeh, D.; Wells, J.; Šegan, S.; Panchal, R. G., Šolaja, B. A. Anti-Ebola Activity of Diazachrysene Small Molecules. *ACS Inf. Dis.* **2015**, *1*, 264-271.

Chemistry, Medicinal (59/59)

IF = 0,000 (2015)

Издавач: American Chemical Society

Web Edition ISSN: 2373-8227

Web часописа: <http://pubs.acs.org/journal/aidcbc>

Web: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsinfecdis.5b00028>

doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00028

● **Радови објављени у часописима националног значаја (M53):**

1. Kolarski, D.; Milić, J.; Selaković, Ž.; Filipović, V. Nobelova nagrada za hemiju 2010. *Hemijski pregled* **2011**, 52(1), 3-11.
2. Selaković, Ž. Ebola virus. *Hemijski pregled* **2014**, 55(4), 19-26.
3. Selaković, Ž.; Šolaja, B. A. Advances in tackling filoviruses. *CONTRIBUTIONS, Section of Natural, Mathematical and Biotechnical Sciences, MASA*, **2018**, 39, 83-90.

Издавач: Macedonian Academy of Sciences and Arts

Print ISSN 1857-9027;

Web ISSN 1857-9949

Web часописа: <http://csnmbs.manu.edu.mk/index.php/csnmbs/index>

Web: <http://csnmbs.manu.edu.mk/index.php/csnmbs/article/view/127>

doi: <http://dx.doi.org/10.20903/csnmbs.masa.2018.39.2.127>

● **Радови саопштени на скуповима међународног значаја штампани у изводу (M34):**

1. Selaković, Ž.; Soloveva, V.; Panchal, R. G.; Šolaja, B. A. Novel Diazachrysen-Based Filovirus Inhibitors. 22^{èmes} Journées Jeunes Chercheurs / 22nd Young Research Fellows Meeting: Chemistry and Biology: A permanent Dialogue, Paris, France, February 4-6th, **2015**, Book of Abstracts OC-20

● **Радови саопштени на скуповима националног значаја штампани у изводу (M64):**

1. Selaković, Ž.; Šolaja B. A. The Impact of a Limited Structural Modification on the Activity of Diazachrysen-Based Filovirus Inhibitors, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Belgrade, October 19-20th **2012**, Book of Abstracts HS P16, pg. 63; ISBN 978-86-7132-050-4
2. Selaković, Ž.; Šegan, S. B.; Panchal, R. G.; Šolaja, B. A. "Nova farmakofora aktivna na Ebola virus", 53. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Kragujevac, June 10-11th **2016**, Book of Abstracts OH O3, pg. 97; ISBN 978-86-7132-061-0
3. Lazić, M.; Selaković, Ž.; Panchal, R. G.; Šolaja, B. A. "Novi derivati bis(alkilamino)diazahrizena aktivni na Ebola virus", Četvrta konferencija mladih hemičara Srbije, Belgrade, November 5th **2016**, Book of Abstracts HS P04, pg. 40; ISBN 978-86-7132-063-4
4. Selaković, Ž.; Jiang, X.; Milić, D.; Panchal, R. G.; Šolaja, B. A. "Pokušaj sinteze lipozomskog in vivo inhibitora virusa ebole", Peta konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 29. i 30. septembar **2017**, izvodi radova KMH 05, str. 97; ISBN 978-86-7132-067-2

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Живота Селаковић**

Број индекса **ДХ28/2012**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Развој нових 4,10-диазахризенских и 1,5-нафтиридинских инхибитора вируса еболе

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 13. мај 2019. године

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Живота Селаковић**

Број индекса **ДХ28/2012**

Студијски програм **доктор хемијских наука**

Наслов рада **Развој нових 4,10-диазахризенских и 1,5-нафтиридинских
инхибитора вируса еболе**

Ментор **академик др Богдан А. Шолаја, редовни професор Универзитета у
Београду – Хемијског факултета у пензији**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 13. мај 2019. године

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Развој нових 4,10-диазахризенских и 1,5-нафтиридинских инхибитора вируса еболе

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____ 13. мај 2019. године _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.