

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Maja D. Vitorović-Todorović

**RACIONALNI DIZAJN I SINTEZA  
JEDINJENJA SA STRUKTURNIM  
SKELETOM AMIDA AROILAKRILNIH  
KISELINA KOJA ISPOLJAVAJU  
ANTIHOINESTERAZNU,  
ANTITUBULINSKU I  
ANTIPROLIFERATIVNU AKTIVNOST**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Maja D. Vitorović-Todorović

**RATIONAL DESIGN AND SYNTHESIS OF  
COMPOUNDS BASED ON  
AROYLACRYLIC ACID AMID SCAFFOLD  
THAT EXERT ANTICHOLINESTERASE,  
ANTITUBULINE AND  
ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

***Mentor*** dr Ivan O. Juranić

*Redovni profesor Hemijskog fakulteta*

Univerziteta u Beogradu

***Mentor*** dr Ljuba M. Mandić

*Redovni profesor Hemijskog fakulteta*

Univerziteta u Beogradu

***Članovi komisije*** dr Ivan O. Juranić

*Redovni profesor Hemijskog fakulteta*

Univerziteta u Beogradu

dr Ljuba M. Mandić

*Redovni profesor Hemijskog fakulteta*

Univerziteta u Beogradu

dr Marija Baranac-Stojanović

*Vanredni profesor Hemijskog fakulteta*

Univerziteta u Beogradu

***Datum odbrane doktorske teze:*** \_\_\_\_\_

## ***Izrazi zahvalnosti***

Vremena u kojima su doktorske disertacije bile isključivo delo samog doktoranda, odavno su ušle u istoriju. Zbog toga želim da se setim i da zahvalim onima koji su najzaslužniji za ostvarenje ove doktorske disertacije.

Teško je naći prave reči zahvalnosti za mog dugogodišnjeg saradnika i starijeg kolegu, mr Branka Drakulića. Realizacija ove doktorske disertacije bila je gotovo nemoguća bez njegove pomoći. Zahvalna sam mu na tome što je u meni probudio najpre interesovanje, a potom i ljubav prema medicinskoj hemiji. Ponosna sam što sam jedna od mnogih sa kojima nesebično deli svoje znanje i bogato iskustvo. Zahvalnost dugujem i našem načelniku, potpukovniku mr Željku Seniću na pruženom poverenju, podršci i na beskrajnom razumevanju za vreme koje iziskuje naučno-istraživački rad.

Najtoplije izraze zahvalnosti dugujem i svojim mentorima, prof. dr Ivanu Juraniću i prof. dr Ljubi Mandić na korektnoj i konstruktivnoj saradnji u izradi ove teze, tokom koje su me sigurno i racionalno vodili, i doveli do cilja. Prof. dr Mariji Baranac-Stojanović dugujem veliku zahvalnost za kritičke primedbe tokom pisanja ove teze, koje su znatno doprinele njenom kvalitetu.

Visoko cenim i zasluge kolegice iz Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, dr Aleksandre Erić-Nikolić i Branke Kolundžije za izvođenje citoloških eksperimenata. Posebnu zahvalnost dugujem i dr Slavici Ristić iz Instituta „Galenika“ za urađena *in vivo* ispitivanja sa našim jedinjenjima. Za konstruktivne diskusije i pomoć tokom izvođenja eksperimenata sa holinesterazama, dugujem zahvalnost mojoj izuzetnoj kolegici i prijatelju Sonji Bauk.

Odeljenje za hemijsku i nuklearnu zaštitu Vojnotehničkog instituta, u kome radim od 2004. godine, postalo je moja druga kuća. U atmosferi koja odiše drugarstvom, radošću, uzajamnim razumevanjem i uvažavanjem, veliko je zadovoljstvo raditi. Zato posebne reči najtoplije zahvalnosti upućujem svim članovima našeg odeljenja.

Ovo zadovoljstvo bilo bi nepotpuno bez topline porodičnog doma, u kome sam svakodnevno nailazila na osmehe, inspiraciju i snagu za sva životna, pa i ovo dostignuće. Zato, izraze svoje zahvalnosti, duboke ljubavi i poštovanja upućujem svojim najmilijima – suprugu Miodragu, sinu Konstantinu, ocu Dragoslavu, sestri Mili, i sada već počivšim – mojoj majci Druginji Vitorović i deki Miodragu Vitoroviću.

## Racionalni dizajn i sinteza jedinjenja sa strukturnim skeletom amida aroilakrilnih kiselina koja ispoljavaju antiholinesteraznu, antitubulinsku i antiproliferativnu aktivnost

### *Rezime*

U ovoj tezi su opisane različite strukturne modifikacije aroilakrilnih kiselina, zasnovane na relativno jednostavnim sintetičkim procedurama. Biološka aktivnost dobijenih novih jedinjenja (sa oznakama **1a-29a**, **1b-38b**, **151c**, **152c** i **156c**) je ispitana prema nekoliko bioloških meta relevantnih za maligna oboljenja i Alchajmerovu bolest.

Dizajnirana je i sintetizovana kongenerna serija dvadeset i devet amida (*E*)-4-aril-4-okso-2-butenskih kiselina, u nameri da se ispita njihova antiproliferativna aktivnost i mogući mehanizam dejstva. Antiproliferativna aktivnost je ispitana prema tri ćelijske linije humanih tumora (HeLa, FemX, K562). Jedinjenja su ispoljavala antiproliferativnu aktivnost u niskim mikromolarnim ili submikromolarnim koncentracijama. Najjače dejstvo su pokazala alkil-supstituisana jedinjenja na aroil-delu molekula. Četrnaest jedinjenja je inhibiralo polimerizaciju tubulina u koncentracijama nižim od 20  $\mu$ M. Jedinjenje sa najvećom jačinom antitubulinskog dejstva je derivat sa nesupstituisanim aroil-fenil- i nesupstituisanim fenilamidnim prstenom, **1a**, sa  $IC_{50}=2,9 \mu$ M. Testirana je i akutna toksičnost *in vivo*, na albino miševima (NMRI Hann).  $LD_{50}$  za fluoro-derivat **23a** iznosila je 45 mg/kg. Ovo ukazuje na značajnu toksičnost amida aroilakrilnih kiselina (**1a-29a**). Analiza ćelijskog ciklusa, urađena na K562 ćelijama, pokazala je da derivati **1a**, **2a** i **23a** izazivaju porast broja ćelija u G2/M fazi, međutim, inhibicija polimerizacije tubulina nije jedini mehanizam dejstva ovih jedinjenja. Uprkos tome, jedinjenja **1a-29a** predstavljaju dobre vodeće strukture za dizajn nove klase antitubulinskih agenasa.

Amidi aroilakrilnih kiselina su dalje modifikovani Majklovom adicijom odabranih sekundarnih cikličnih amina na aktiviranu dvostruku vezu, u nameri da se dobiju jedinjenja koja bi ispoljavala inhibicionu aktivnost prema enzimima iz grupe holinesteraza. Dizajnirana je i sintetizovana kongenerna serija od trideset i osam 4-aril-4-okso-2-(*N*-aril/cikloalkil)butanamida. Strukturne varijacije su obuhvatile cikloalkilamino-grupu na položaju C2 butanskog fragmenta, kao i grupu vezanu za amidni azot molekula. Dvanaest jedinjenja, uglavnom piperidinskih i imidazolskih derivata, inhibiralo je acetilholinesterazu

(AChE) u niskom mikromolarnom opsegu. Ova jedinjenja nisu bila aktivna prema butirilholinesterazi (BChE). Nekoliko *N*-metilpiperazinskih derivata je inhibiralo BChE u niskom mikromolarnom ili submikromolarnom opsegu koncentracija. Ova jedinjenja su bila neaktivna prema AChE. Prema tome, priroda cikloalkilamino-grupe na položaju C2 određuje selektivnost prema jednom, odnosno drugom enzimu. Najaktivniji inhibitor AChE ispoljava mešoviti tip inhibicije, što ukazuje na vezivanje i za slobodan enzim i za enzim-supstrat kompleks. Detaljna doking studija, urađena za sedam jedinjenja sa najvećom jačinom inhibicionog dejstva prema AChE, ukazala je na mogućnost formiranja vodonične veze između amidne -NH- grupe inhibitora i -OH grupe bočnog ostatka Tyr 124. Simulacija molekulske dinamike kompleksa AChE sa jedinjenjem (*S*)-**18**, duga 5 ns, pokazala je da je ova interakcija tokom vremena najstabilnija. Ovo je verovatno najjača interakcija između inhibitora i enzima.

U nameri da se dizajniraju dualni heterodimerni reverzibilni inhibitori AChE, sprovedena je 3D-QSAR studija, zasnovana na deskriptorima koji su nezavisni od međusobnog prostornog svrstavanja molekula, na setu od 110 dualnih reverzibilnih inhibitora AChE. Izvedena su tri modela, koristeći konformacije molekula dobijene na osnovu sledećih kriterijuma: (*i*) konformacije minimalne energije, (*ii*) konformacije najslabije sa konformacijom liganda kokristalisanog sa AChE i (*iii*) konformacije dobijene dokingom jedinjenja u šupljinu aktivnog mesta AChE. Sva tri modela imala su dobre statističke parametre i prediktivnost, nezavisno od toga koji je tip konformacija upotrebljen. Modeli su ukazali na važnost protonovanog piridinskog azota takrinskog fragmenta jedinjenja za inhibiciono dejstvo prema AChE. Takođe su interakcije donora i akceptora vodoničnih veza prepoznate kao veoma važne. Na ovo ukazuje prisustvo varijabli koje su povezane sa protonovanim piridinskim azotom i sa dve amino-grupe linkera. Polja molekulskih interakcija (MIF) izračunata za šupljinu aktivnog mesta AChE upotrebom N1= (piridinski azot) i DRY (hidrofobna) GRID proba omogućili su da se pronađe veza između aminokiselinskih ostataka u aktivnom mestu AChE i varijabli koje imaju visok pozitivan uticaj na modele. Spoljašnja prediktivnost modela je testirana na setu od 40 inhibitora AChE, od kojih je većina bila strukturno nesrodna sa jedinjenjima iz osnovnog seta, na osnovu koga je model izveden. Aktivnost nekih jedinjenja je određena na različitom enzimskom izvoru (*m*AChE). Nađeno je da spoljašnja prediktivnost modela jako zavisi od konformacija jedinjenja koje su upotrebene za izvođenje modela. Model zasnovan na

konformacijama jedinjenja dobijenih dokingom je imao superiornu prediktivnu moć u odnosu na ostala dva modela, što ukazuje na važnost upotrebe konformacija jedinjenja koje su dobijene u odnosu na geometrijska ograničenja vezivnog mesta AChE. Dizajnirano je nekoliko dualnih, heterodimernih inhibitora AChE zasnovanih na strukturi takrina i amida aroilakrilnih kiselina *in silico*, i njihova aktivnost je procenjena upotrebom modela izvedenog iz konformacija dobijenih dokingom. Tri jedinjenja su sintetisana i eksperimentalno je određena njihova aktivnost. Jedinjenja su aktivna u nanomolarnim koncentracijama, što je u saglasnosti sa aktivnošću procenjenom na osnovu modela.

*Ključne reči:* amidi aroilakrilnih kiselina, Majklova adicija, antiholinesterazna, antitubulinska i antiproliferativna aktivnost, odnosi 3D strukture i aktivnosti, doking.

**Naučna oblast:** Organska hemija

**Uža naučna oblast:** Medicinska hemija

**UDK:** 547

## Rational design and synthesis of compounds based on aroylacrylic acid amid scaffold that exert anticholinesterase, antitubuline and antiproliferative activity

### *Abstract*

In this thesis, various structural modifications of benzoylacrylic acid scaffold, achieved through relatively simple synthetic procedures were done. The resulting novel compounds were tested toward biological targets relevant for cancer and Alzheimers disease.

We designed and synthesized various aroylacrylic acid amides, aiming to test their antiproliferative activity and to possibly infer their principal mechanism of action. Antiproliferative activity of twenty-nine (*E*)-4-aryl-4-oxo-2-butenoic acid amides against three human tumor cell lines (HeLa, FemX, and K562) was tested. Compounds showed antiproliferative activity in one-digit micromolar to submicromolar concentrations. The most potent derivatives toward all cell lines tested, bear alkyl substituents on the aroyl moiety of the molecules. Fourteen compounds showed tubulin assembly inhibition at concentrations < 20  $\mu\text{M}$ . The most potent inhibitor of tubulin assembly was compound **1a**, with unsubstituted aroyl and phenylamido rings, with  $\text{IC}_{50} = 2.9 \mu\text{M}$ . Compound **23a** had an  $\text{LD}_{50}$  *in vivo* of 45 mg/kg in albino mice (NMRI Hann), as obtained by oral administration. Cell cycle analysis on K562 cells showed that the compounds **1a**, **2a** and **23a** cause accumulation of the cells in G2/M phase, but inhibition of microtubule polymerization is not the principal mode of action of compounds. Nevertheless, they may be useful leads for the design of a new class of antitubulin agents.

Further, we modified aroylacrylic acids amides by Michaelis addition of suitably chosen secondary cyclic amines on the activated double bond, with aim to obtain compounds which inhibit cholinesterase enzymes. Congeneric set of thirty-eight 4-aryl-4-oxo-2-(*N*-aryl/cycloalkyl)butyramides has been designed, synthesized and evaluated for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activity. Structural variations included cycloalkylamino group attached to C2 position of butanoyl moiety, and the variation of amido moiety of molecules. Twelve compounds, mostly piperidino and imidazolo derivatives, inhibited AChE in low micromolar range, and were inactive toward BChE. Several *N*-methylpiperazino derivatives showed inhibition of BChE in low micromolar or submicromolar concentrations, and were



inactive toward AChE. Therefore, the nature of the cycloalkylamino moiety governs the AChE/BChE selectivity profile of the compounds. The most active AChE inhibitor showed mixed-type inhibition, indicating binding to the free enzyme and to the enzyme-substrate complex. Thorough docking calculations of the seven most potent AChE inhibitors from the set, showed that the hydrogen bond can be formed between amide -NH- moiety of compounds and -OH group of Tyr 124. The 5 ns of productive, unconstrained, molecular dynamic simulation of the AChE-compound (*S*)-**18** complex showed that this interaction is the most persistent. This is, probably, the major anchoring point for the binding.

In intention to design dual heterodimeric, reversible, AChE inhibitors, the 3D-QSAR analysis, based on alignment independent descriptors (GRIND-2), was performed on the set of 110 structurally diverse, dual binding AChE reversible inhibitors. Three models were built, based on different conformations. Conformations were generated following criteria: (*i*) minimum energy conformations, (*ii*) conformation most similar to the co-crystallized ligand conformation, and (*iii*) docked conformation. We found that regardless on conformation used, all the three models had good statistics and predictivity. The models revealed the importance of protonated pyridine nitrogen of tacrine moiety for anti AChE activity, and recognized HBA and HBD interactions as highly important for the potency. This was revealed by the variables associated with protonated pyridinium nitrogen, and the two amino groups of the linker. Molecular interaction fields (MIF) calculated with the N1= (pyridinium nitrogen) and the DRY (hydrophobic) GRID probes in the AChE active site, enabled us to establish the relationship between aminoacid residues within AChE active site and the variables having high impact on models. External predictive power of the models was tested on the set of 40 AChE reversible inhibitors, most of them structurally different from the training set. Some of those compounds were tested on the different enzyme source. We found that external predictivity was highly sensitive on conformations used. Model based on docked conformations had superior predictive ability, emphasizing the need for the employment of conformations built by taking into account geometrical restrictions of AChE active site gorge. Several dual, heterodimeric AChE inhibitors, comprising tacrine and acryloyl acrylic acid amides molecular fragments were designed *in silico*, and their activity was estimated using model based on docked conformations of compounds. Three compounds were synthesized, and their anti-AChE activity was

determined. The experimentally obtained nanomolar anti-AChE activity of compounds appeared in a good agreement with the activity estimated from the model.

*Key words:* aroylacrylic acid amides, Michaels addition, anticholinesterase, antitubuline and antiproliferative activity, 3D structure – activity relationships, docking

**Scientific field:** Organic chemistry

**Field of academic expertise:** Medicinal chemistry

**UDC:** 547

### **Lista skraćenica:**

ACh – Acetiltioholin-jodid

AChE – Acetilholinesteraza

AcOEt – Etil-acetat

AD – (Alzheimers Disease), Alchajmerova bolest

APP- (Amyloid Precursor Protein), Amiloidni prekursorski protein

AS – (Anionic Site), anjonsko mesto

BCh – Butiriltioholin-jodid

BChE – Butirilholinesteraza

BW284C51 - 1,5-bis(4-alildimetilaminopropil)pentan-3-on dibromid

CAN – (Ceric ammonium nitrate), amonijumheksnitrocerat(IV)

ChAT - Holinacetiltransferaza

CoMFA – (Comparative Molecular Field Analysis), uporedna analiza molekulskih polja

CoMMA – (Comparative Molecular Moment Analysis), uporedna analiza molekulskih momenata

CoMSIA – (Comparative Molecular Similarity Index Analysis), uporedna analiza indeksa molekulske sličnosti

DCC – dicikloheksilkarbodimid

DMSO – Dimetilsulfoksid

DTNB – 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitrobenzoeva kiselina), Elmanov reagens

FBS – (Fetal Bovine Serum) – serum embriona govečeta

FDA – Food and Drug Administration

FFD – Fractional Factorial Design

GOLPE – "Generating Optimal Linear PLS Estimations"

GRIND – GRid INdependant Descriptors

HBA - (Hydrogen Bond Acceptor), akceptor vodonične veze

HBD – (Hydrogen Bond Donor), donor vodonične veze

HFIP - heksafluoroizopropanol

HOAt - 3*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin-3-ol

Izo-OMPA - izotetramonoizopropilpirofosfat tetraamid

LV – Latentna varijabla

MACC – Maximum Auto and Cross Covariance

MD – Molekulska dinamika

Mf286 - *cis*-2,6-dimetilmorfolinoktilkarbamil ezerolin

MIF – (Molecular Interaction Fields), polja molekulskih interakcija

MLR – višestruka linearna regresija

NHC - *N*-heterociklični karbenski katalizator

NFT – (NeuroFibrillary Tangles), Neurofibrilarni ugrušci

PAS – (Peripheral Anionic Site), Periferno anjonsko mesto

PCA – (Principal Component Analysis), analiza osnovnih komponenata

PDB – (Protein Data Bank), banka podataka o strukturi proteina

PLS – (Partial Least Squares), regresiona analiza delimičnih najmanjih kvadrata

QSAR – (Quantitative Structure Activity Relationships), kvantitativna analiza odnosa strukture i aktivnosti

SLD – (stathmin like domain), domen sličan statminu

TABO - 1,3,3-trimetil-6-azabicyklo[3.2.1]oktan

TBDMS - *tert*-butildimetilsilil

TBDPS - *tert*-butildifenilsilil

TMP – (trimethoxyphenyl), trimetoksifenil grupa

TMS – Tetrametilsilan

TOF-LC-ESI-MS – (Time-Of-Flight-Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry), masena spektrometrija sa elektrosprej jonizacijom kuplovana sa tečnom hromatografijom

## **SADRŽAJ:**

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPŠTI DEO</b> .....	4
<b>2.1. Sintetički postupci</b> .....	4
<b>2. 1. 1. Stvaranje amidne veze između karboksilnih kiselina i amina</b> .....	4
<b>2. 1. 2 Majklova adicija</b> .....	10
2.1.2.1. <i>Diastereoselektivna azu-Majklova reakcija</i> .....	12
2.1.2.1.1. <i>Upotreba hiralnih amina</i> .....	12
2.1.2.1.2. <i>Upotreba hiralnih supstrata</i> .....	13
2.1.2.2. <i>Enantioselektivna azu-Majklova adicija</i> .....	14
2.1.2.3. <i>Asimetrična azu-Majklova adicija katalizovana cinbona alkaloidima</i> .....	15
2.1.2.4. <i>Upotreba azu-Majklove adicije u sintezi prirodnih proizvoda</i> .....	16
<b>2. 1. 3. Fridlenderova sinteza hinolina i srodne reakcije</b> .....	17
2.1.3.1. <i>Regioselektivnost Fridlenderove reakcije</i> .....	18
2.1.3.2. <i>Tolerancija u odnosu na druge funkcionalne grupe reaktanata u Fridlenderovoj reakciji</i> .....	20
2.1.3.3. <i>Modifikacije Fridlenderove reakcije</i> .....	22
<b>2.1.4. Nukleofilne aromatične supstitucije</b> .....	24
2.1.4.1. <i>Uticaj odlazeće grupe na brzinu nukleofilne supstitucije</i> .....	25
2.1.4.2. <i>Efekat ostalih supstituenata na prstenu na reaktivnost 2-halopiridina</i> .....	27
2.1.4.3. <i>Silil trik: izbor između dva potencijalna mesta supstitucije</i> .....	28
<b>2.2 Metode molekuskog modelovanja</b> .....	31
<b>2.2.1. Analiza odnosa trodimenzionalne strukture i aktivnosti jedinjenja – 3D-QSAR metode</b> .....	31
2.2.1.1. <i>Polja molekulskih interakcija - GRID metod</i> .....	32
2.2.1.2. <i>GRID polje sila</i> .....	34
2.2.1.3. <i>Kalibracija GRID polja sila</i> .....	35
2.2.1.4. <i>GRIND molekulski deskriptori izvedeni iz MIF</i> .....	36
2.2.1.5. <i>Trodimenzionalna analiza strukture i aktivnosti (3D QSAR) upotrebom programa ALMOND i Pentacle</i> .....	41
<b>2.3. Biološke mete relevantne za amide aroilakrilnih kiselina i njihove derivate</b> .....	52
<b>2.3.1. Mikrotubule i tubulin</b> .....	52
2.3.1.1. <i>Struktura i fiziološka uloga mikrotubula</i> .....	52
2.3.1.2. <i>Antimitotski agensi</i> .....	58
2.3.1.3. <i>Mehanizam antimitotskog dejstva kolbicina i njegovih strukturnih analoga</i> .....	60

2.3.1.4. Odnos strukture i aktivnosti kolhicina i njegovih derivata.....	62
2.3.1.5 Farmakoforna svojstva liganada koji se vezuju za kolhicinsko vezivno mesto.....	65
<b>2.3.2. Holinesteraze.....</b>	<b>70</b>
2.3.2.1. Fiziološka uloga holinesteraza.....	70
2.3.2.2. Molekulski polimorfizam holinesteraza.....	71
2.3.2.3. Aminokiselinska sekvencija katalitičkih podjedinica.....	72
2.3.2.4. Tercijarna struktura enzima, katalitički mehanizam i dinamički efekti.....	73
2.3.2.5. Važnost AChE i BChE kao bioloških meta za razvoj novih terapijskih sredstava.....	82
2.3.2.6. Odabrane kristalne strukture AChE u kompleksu sa poznatim inhibitorima.....	86
<b>3. NAŠI RADOVI.....</b>	<b>91</b>
<b>3.1. Amidi aroilakrilnih kiselina (1a-29a) i njihova antiproliferativna i antitubulinska aktivnost.....</b>	<b>91</b>
3.1.1. Racionalni dizajn amida aroilakrilnih kiselina kao jedinjenja sa antiproliferativnim dejstvom.....	91
3.1.2. Sintaza jedinjenja 1a-29a i strukturna karakterizacija.....	92
3.1.2.1. <sup>1</sup> H NMR spektri 1a-29a.....	94
3.1.2.2. <sup>13</sup> C NMR spektri 1a-29a.....	96
3.1.3. Biološka aktivnost jedinjenja 1a-29a.....	96
3.1.3.1. Antiproliferativna aktivnost jedinjenja 1a-29a.....	96
3.1.3.2. Antitubulinska aktivnost jedinjenja 1a-29a.....	99
3.1.3.3. Akutna toksičnost in vivo jedinjenja 23a.....	102
3.1.4. Molekulsko modelovanje.....	102
<b>3.2. Majklovi adukti sekundarnih amina na amide aroilakrilnih kiselina (1b-38b) i njihova antiholinesterazna aktivnost.....</b>	<b>107</b>
3.2.1. Racionalni dizajn inhibitora holinesteraza zasnovan na Majklovim aduktima sekundarnih amina na amide aroilakrilnih kiselina.....	107
3.2.2. Sintaza i strukturna karakterizacija 4-aril-4-okso-2-aminilbutanamida (1b-38b).....	109
3.2.2.1. <sup>1</sup> H NMR spektri 1b-38b.....	109
3.2.2.2. <sup>13</sup> C NMR spektri 1b-38b.....	111
3.2.3. Antiholinesterazna aktivnost 4-aril-4-okso-2-aminilbutanamida (1b-38b).....	111
3.2.4. Molekulsko modelovanje.....	115
3.2.4.1. Analiza odnosa 3D strukture i aktivnosti jedinjenja 1b-47b.....	115
3.2.4.2. Doking studija najaktivnijih 4-aril-4-okso-2-aminilbutanamida prema AChE.....	119
3.2.4.3. Studije molekulske dinamike za kompleks AChE sa derivatom 18b.....	124

<b>3.3. Kvantitativna analiza odnosa trodimenzionalne strukture i aktivnosti dualnih reverzibilnih inhibitora AChE i dizajn novih heterodimernih takrinskih inhibitora.....</b>	<b>128</b>
<b>3.3.1 Opis seta dualnih inhibitora AChE za izvođenje modela i konformacija koje su korišćene.....</b>	<b>128</b>
3.3.1.1. <i>Kratak opis doking poza.....</i>	136
<b>3.3.2. Opis modela zasnovanih na različitim konformacijama 1c-110c.....</b>	<b>137</b>
3.3.2.1. <i>Model zasnovan na konformacijama minimalne energije (OMEGA model).....</i>	137
3.3.2.2. <i>Model zasnovan na ROCS konformacijama.....</i>	140
3.3.2.3. <i>Model zasnovan na VINA konformacijama.....</i>	142
<b>3.3.3. Polja molekulskih interakcija aktivnog mesta AChE.....</b>	<b>148</b>
<b>3.3.4. Prediktivnost modela.....</b>	<b>150</b>
<b>3.3.5. Model zasnovan na dvodimenzionalnim (2D) molekulskim deskriptorima.....</b>	<b>157</b>
<b>3.3.6. Predviđanje aktivnosti dualnih inhibitora AChE izvedenih iz takrina i amida aroilakrilnih kiselina i eksperimentalna validacija.....</b>	<b>158</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>163</b>
<b>4.1. Sinteza i karakterizacija jedinjenja.....</b>	<b>163</b>
4.1.1. <i>Opšte napomene.....</i>	163
4.1.2. <i>Sinteza i karakterizacija amida aroilakrilnih kiselina (1a-29a).....</i>	163
4.1.2.1. <i>Sinteza amida aroilakrilnih kiselina (1a-29a).....</i>	163
4.1.2.2. <i>Karakterizacija amida aroilakrilnih kiselina (1a-29a).....</i>	164
4.2.3. <i>Sinteza i karakterizacija Majklovih adukata na amide aroilakrilnih kiselina (1b-38b).....</i>	172
4.2.3.1. <i>Sinteza Majklovih adukata na amide aroilakrilnih kiselina (1b-38b).....</i>	172
4.2.3.2. <i>Karakterizacija Majklovih adukata na amide aroilakrilnih kiselina (1b-38b).....</i>	172
4.1.4. <i>Sinteza i karakterizacija jedinjenja 151c, 152c i 156c.....</i>	184
<b>4.2. Ispitivanje biološke aktivnosti jedinjenja.....</b>	<b>188</b>
4.2.1. <i>Ispitivanje biološke aktivnosti amida aroilakrilnih kiselina (1a-29a).....</i>	188
4.2.1.1. <i>Ispitivanje citotoksičnosti amida aroilakrilnih kiselina (1a-29a).....</i>	188
4.2.1.2. <i>Ispitivanje inhibicije polimerizacije tubulina i inhibicije vezivanja kolhicina za tubulin.....</i>	189
4.2.1.3. <i>Test akutne toksičnosti derivata 23a.....</i>	190

4.2.2. Ispitivanje biološke aktivnosti jedinjenja 1b-38b, 151c, 152c i 156c.....	191
4.2.2.1. Određivanje $IC_{50}$ vrednosti jedinjenja <b>1b-38b</b> i <b>151c</b> , <b>152c</b> i <b>156c</b> prema AChE i BChE.....	191
4.2.2.2. Određivanje tipa inhibicije jedinjenja <b>17b</b> prema AChE.....	191
<b>4.3. Metode molekuskog modelovanja.....</b>	<b>192</b>
4.3.1. Molekulska modelovanje vezano za amide aroilakrilnih kiselina (1a-29a).....	192
4.3.2. Izvođenje 3D-QSAR modela za jedinjenja 1b-38b i 1c-150c.....	192
4.3.3. Doking studija za jedinjenja 1b-38b.....	193
4.3.4 Simulacija molekulske dinamike kompleksa AChE – jedinjenje ( <b>S</b> )-18.....	194
4.3.5. Dobijanje različitih konformacija jedinjenja 1c-157c.....	194
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>196</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>200</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>212</b>
Prilog 1. $^1H$ i $^{13}C$ NMR spektri amida benzoilakrilnih kiselina (1a-29a).....	212
Prilog 2. $^1H$ i $^{13}C$ NMR spektri Majklovih adukata na amide benzoilakrilnih kiselina (1b-38b).....	230
Prilog 3. Dodatni podaci vezani za rezultate molekuskog modelovanja.....	256
Prilog 4. $^1H$ i $^{13}C$ NMR spektri jedinjenja 151c, 152c i 156c.....	265
<i>Biografija</i> .....	267



## 1. UVOD

Broj smrtnih slučajeva uzrokovan malignim oboljenjima je veći od onog uzrokovanog srčanim oboljenjima kod populacije ljudi starije od 85 godina. Novi biološki i hemoterapijski pristupi produžavaju život pacijenata i smanjuju mortalitet. Uprkos tome, predviđen je značajan porast broja slučajeva malignih oboljenja uzrokovan različitim faktorima. Na primer, u Evropi jedan od četiri smrtna slučaja, uzrokovan je malignim oboljenjima, a stopa oboljevanja kod populacije između 45. i 64. godine se skoro udvostručila u poslednjoj deceniji. Inovativne terapije koji bi dovele do nestanka ili zaustavljanja rasta tumora, zajedno sa dijagnostičkim strategijama koje bi omogućile definisanje optimalnog terapijskog tretmana za svakog pacijenta ponaosob, predstavljale bi ogroman napredak u tretiranju malignih oboljenja.

Mikrotubule su ključne komponente citoskeleta i uključene su u brojne ćelijske funkcije, a jedna od najvažnijih je ćelijska deoba, gde učestvuju u formiranju deobnog vretena i obezbeđuju vremenski i prostorno precizno razdvajanje hromozoma. Zbog toga su mikrotubule predstavljale važnu biološku metu za dizajn i razvoj nekoliko prirodnih i sintetičkih lekova za rak, kao što su paklitaksel, epotilon A i vinblastin. Ovi lekovi su od izuzetnog značaja za tretman raka jajnika, prostate i dojke. Međutim efikasnost i klinička upotreba trenutno dostupnih antimitotskih hemoterapeutskih sredstava je ograničena usled nedovoljno optimalnih farmakokinetičkih svojstava kao i zbog sistemske toksičnosti i pojave rezistencije kod nekih ćelijskih linija tumora. Stoga, dizajn i razvoj novih antimitotskih agenasa koji bi bili lišeni navedenih nepovoljnih svojstava predstavlja danas žižu interesovanja brojnih akademskih i industrijskih istraživačkih grupa.

Alchajmerova bolest (AD) je progresivan neurodegenerativan poremećaj, koji obuhvata 50 % slučajeva demencije i javlja se kod 5% ljudi starijih od 65 godina, dok je njena zastupljenost oko 20%, kod ljudi starijih od 80 godina. Dok sama bolest nije fatalna, medicinske komplikacije povezane sa AD su obično virusne i bakterijske infekcije koje dovode do letalnih ishoda. Stoga je AD treći najveći uzrok smrtnosti u zapadnom svetu, nakon kardiovaskularnih bolesti i raka. Uzevši u obzir povećanje prosečnog životnog veka i činjenicu da se incidenca

AD povećava sa povećanjem starosti, efekti ove bolesti postaju veliki problem. Danas je u svetu oko 20 miliona ljudi pogođeno ovom bolešću. Procenjeno je da se u SAD svake godine otkrije oko 800 000, a u Evropi oko 350 000 novih slučajeva AD. AD je trenutno jedan od vodećih zdravstvenih problema i biće verovatno najvažnije patološko stanje i važan socio-ekonomski problem 21. veka, kako u razvijenim zapadnim zemljama tako i u zemljama u razvoju. Ukupni ekonomski troškovi tretiranja demencije su u Evropi procenjeni na 55-66 milijardi evra godišnje. Srednja vrednost ukupnih godišnjih troškova nege po pacijentu je u Evropi procenjena na oko 28 000 evra. U svakom slučaju, tretiranje i nega pacijenata sa AD predstavlja ogromne finansijske troškove za negovatelje i društvo.

U poslednje dve decenije, čine se kontinuirani naponi da se utvrdi etiopatogeneza AD, kao i da se sprovede rana dijagnostika i terapijska kontrola ove bolesti. U protekloj deceniji uvedeni su specifični lekovi za palijativni (simptomatski) tretman AD, to su inhibitori holinesteraze (takrin, Cognex; donepezil, Aricept; rivastigmin, Exelon; i galantamin, Reminyl) i antagonist NMDA receptora, memantin. Nekoliko novih, ne samo palijativnih tretmana, već i onih koji utiču na tok bolesti su u fazi istraživanja.

Acetilholinesteraza (AChE) je enzim koji hidrolizuje acetilholin (ACh) na postsinaptičkim membranama nervnih i nervno-mišićnih spojeva. ACh je glavni neurotransmiter u perifernom (autonomnom i motoričkom) i centralnom nervnom sistemu. Otkada je otkrivena AChE, dvadesetih godina prošlog veka, inhibicija ovog enzima je kontinuirano (zlo)upotrebljavana na različite načine. Organofosfatna jedinjenja, bojni otrovi i pesticidi fosforiluju hidroksilnu grupu bočnog ostatka Ser 203, koji predstavlja integralni deo katalitičke trijade aktivnog centra AChE. Kovalentna inhibicija AChE izaziva konstantnu prekomernu stimulaciju nikotinskih i muskarinskih receptora ACh, što izaziva letalne efekte.

Otkriće deficita ACh kod Alchajmerove bolesti (AD), uslovilo je razvoj reverzibilnih inhibitora AChE, kao simptomatske terapije za ovu bolest. Prvobitni lekovi za AD pokazivali su skromne efekte poboljšanja kognitivnih funkcija kod pacijenata. Međutim, otkrićem neholinergičkih uloga AChE, interes za inhibitore ovog enzima je značajno porastao u poslednjoj deceniji prošlog i početkom ovog veka. Kao posledica toga, značajni naponi su

posvećeni razvoju novih inhibitora AChE sa poboljšanim farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima. Posebna pažnja je posvećena razvoju dualnih inhibitora enzima, koji simultano interaguju sa dva vezivna mesta na enzimu. Reverzibilni inhibitori AChE karbamatnog tipa se koriste u tretmanu mijastenije gravis i glaukoma, i kao profilaktička sredstva protiv trovanja bojnim otrovima u armijama zapadnih zemalja.

U ovoj tezi su opisane strukturne modifikacije aroilakrilnih kiselina i njihovih amida. Dobijeni su molekuli sa istim strukturnim motivom aroilakrilnih kiselina, koji ispoljavaju biološku aktivnost prema različitim i nesrodnim biološkim metama – tubulinu i enzimima iz grupe holinesteraza. Amidi aroilakrilnih kiselina ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost, dok neka od jedinjenja inhibiraju polimerizaciju tubulina. Majklovi adukti sekundarnih amina na amide aroilakrilnih kiselina inhibiraju holinesteraze (AChE i BChE) i pokazuju zanimljiv profil selektivnosti. Pokazano je da jedinjenja dobijena različitim strukturnim modifikacijama iste substrukture, postignute relativno jednostavnim sintetičkim procedurama, mogu da izazovu različit biološki odgovor *in vitro*.

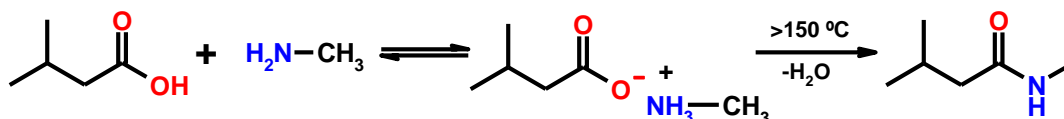
## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Sintetički postupci

#### 2. 1. 1. Stvaranje amidne veze između karboksilnih kiselina i amina

Povoljne osobine amida kao što su visoka polarnost i stabilnost, čine amidnu funkcionalnu grupu jednom od najpopularnijih i najpouzdanijih u različitim oblastima organske hemije. Na primer, na svakih dvanaest reakcija koje se koriste za sintezu jedinjenja – kandidata za lekove, bar jedna je formiranje amidne veze.<sup>1</sup> Studija sprovedena 1999. godine pokazala je da oko 25% molekula koji predstavljaju aktivne komponente farmaceutskih sredstava sadrži bar jednu amidnu vezu.<sup>2</sup>

Karboksilne kiseline reaguju sa aminima u tipično kiselinso-baznoj reakciji, pri čemu se kao proizvodi dobijaju odgovarajuće soli. Zagrevanjem na visokim temperaturama, soli se razlažu i dobija se odgovarajući amid (Shema 1).

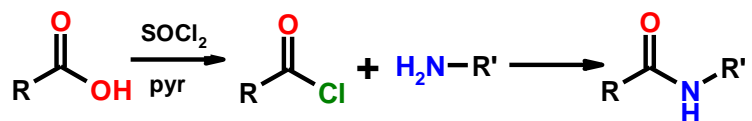


Shema 1. Stvaranje amidne veze između karboksilne kiseline i amina.

Hofman<sup>3</sup> je na ovaj način sintetizovao različite amide zagrevajući amonijum-soli alifatičnih kiselina 5-6 sati na 230 °C pod pritiskom. Dunlap,<sup>4</sup> Keler<sup>5</sup> i Verli<sup>6</sup> su modifikovali postupak zagrevajući natrijum-acetat i amonijum-hlorid na 240 °C. Međutim, ova reakcija ima ograničenu primenu i uglavnom se koristi prilikom sinteze amida izvedenih iz nekih aromatičnih kiselina i amina.

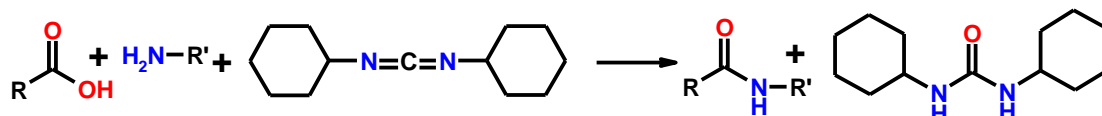
Metode za dobijanje amida obuhvataju aktiviranje karboksilne grupe, ili aktiviranje amino-grupe.<sup>7</sup> Najčešće upotrebljavane su metode prevođenja karboksilne grupe u reaktivnije

funkcionalne grupe (hloride kiselina,<sup>8</sup> mešovite anhidride, acil-azide, aktivirane estre), ili aktivacija karboksilne grupe *in situ* reagensima za kuplovanje, kao što su karbodiimidi.<sup>9,10</sup> Najpogodnija i najlakša metoda za aktiviranje karboksilne grupe je pretvaranje karboksilne kiseline u odgovarajući hlorid-kiseline, pomoću tionil-hlorida (Shema 2) ili fosforoksihlorida.



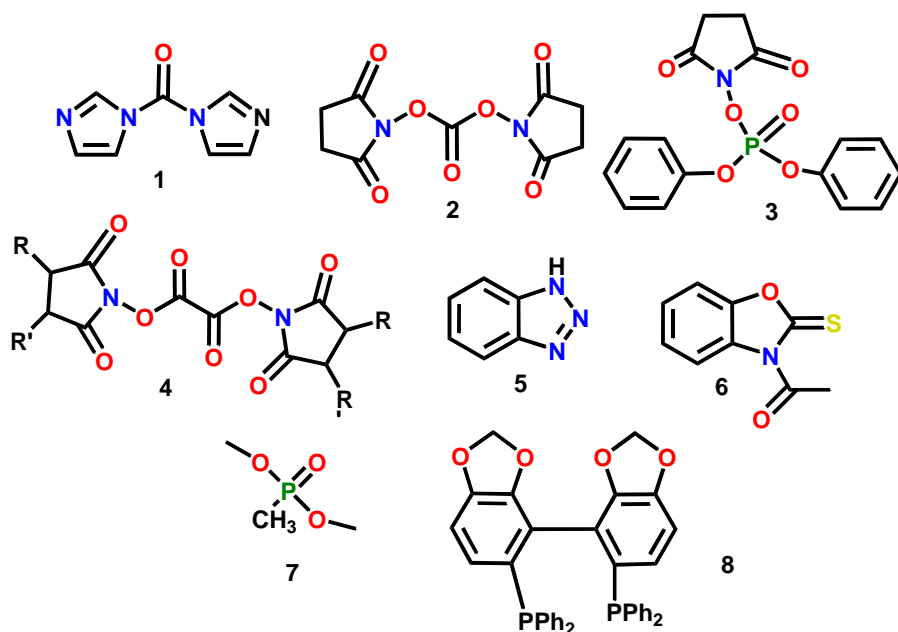
**Shema 2.** Nastajanje amidne veze pomoću tionil-hlorida.

Amidi se mogu dobiti i pomoću reagenasa koji omogućavaju reakcije kuplovanja između karboksilnih kiselina i amina. Reagens za kuplovanje prvo reaguje sa karboksilnom kiselinom i daje aktivirani intermedijer, koji podleže nukleofilnom napadu amina. Karbodiimidi, najčešće dicikloheksilkarbodiimid (DCC),<sup>11</sup> često se koriste kao reagensi za kuplovanje (Shema 3). Metodom sa DCC-om se dobija *N,N'*-dicikloheksilurea kao sporedni proizvod, koja je veoma loše rastvorna u većini organskih rastvarača ili vodi, pa se kao takva relativno lako uklanja iz reakcione smese.



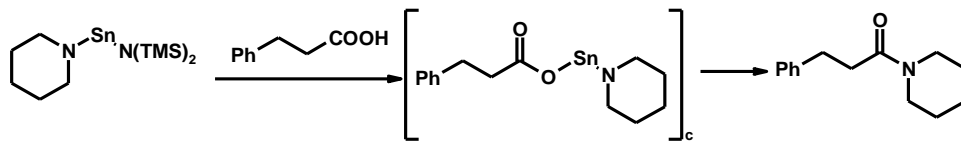
**Shema 3.** Nastajanje amidne veze pomoću DCC-a.

*N,N'*-Karbonildiimidazol<sup>12</sup> je takođe reaktivni reagens za kuplovanje, ali su njime dobijeni intermedijeri veoma osetljivi na vlagu. *N,N'*-Disukcinimidil karbonat,<sup>13</sup> *N*-sukcinimidil difenilfosfat<sup>14</sup> i derivati oksalata<sup>15</sup> su reagensi za aktivaciju koji, za razliku od DCC-a, ne daju sporedne proizvode kuplovanja. Benzotriazol,<sup>16</sup> *N*-acetiltioksobenzoksazol<sup>17</sup> i reagensi koji sadrže fosfor (u obliku fosfonata ili fosfina)<sup>18</sup> su efikasni reagensi za kuplovanje, ali se moraju pripremiti neposredno pre upotrebe (Shema 4).



**Shema 4.** Reagensi za kuplovanje:  $N,N'$ -karbonildiimidazol (1),  $N,N'$ -disukcinimidil karbonat (2),  $N$ -sukcinimidil difenilfosfat (3), derivati oksalata (4), benzotriazol (5),  $N$ -acetiltioksobenzoksazol (6), fosfonat (7), fosfin (8).

Prevođenje karboksilnih kiselina u amide se izvodi i metodom u kojoj se koriste kalaj(II) reagensi, tipa  $\text{SnN}(\text{TMS})_2\text{NR}_2$ . Asimetrični kalaj(II)amidi se pripremaju *in situ* dodavanjem amina na *bis*(bistrimetilsililamino)kalaj.<sup>19</sup> Daljom reakcijom  $\text{SnN}(\text{TMS})_2\text{NR}_2$  sa karboksilnom kiselinom nastaje kalaj(II)amido karboksilat, uz zamenu preostalog silazan-liganda. Ovaj intermedijer podleže intramolekulskom premeštanju pri čemu nastaje amid uz oslobađanje kalaj oksida (Shema 5).

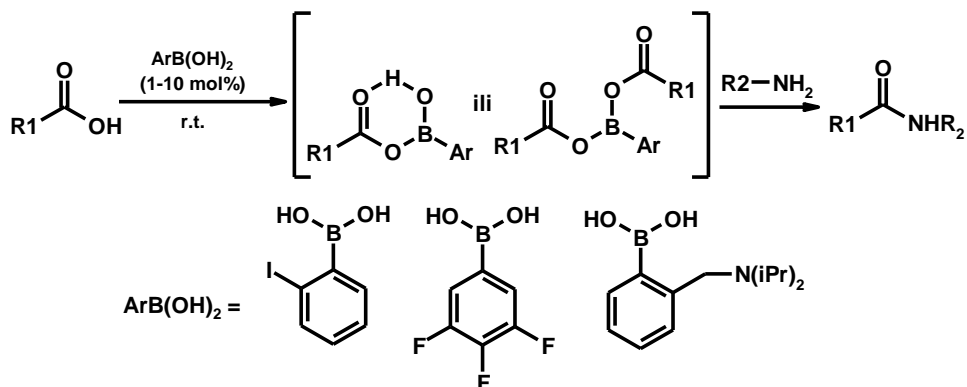


**Shema 5.** Stvaranje amidne veze pomoću kalaj(II) reagenasa.

Kalaj(II) reagensi se mogu dobiti iz primarnih ili sekundarnih amina kao što su benzilamin, piperolidin, piperidin ili morfolin.<sup>20</sup>

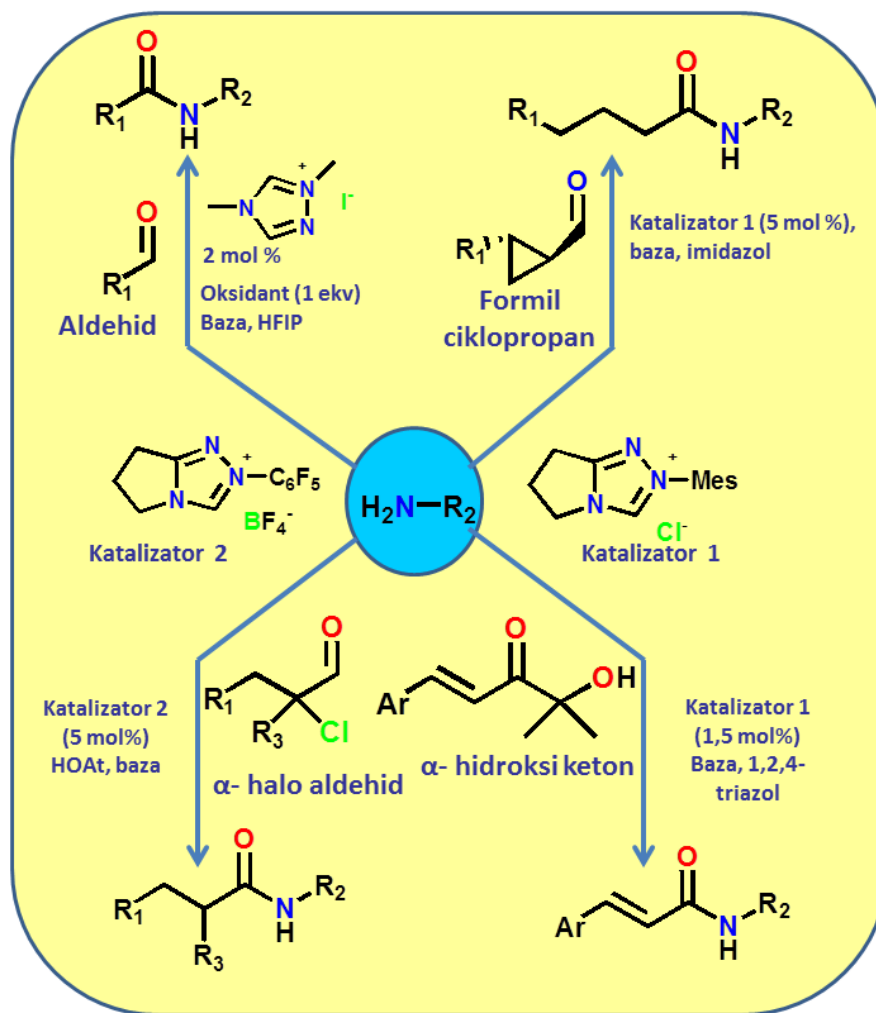
U poslednjih petnaest godina, opisano je i nekoliko reagenasa koji se koriste kao katalizatori za formiranje amidne veze. Za razliku od reagenasa za kuplovanje, koji se koriste u stehiometrijskom odnosu u reakciji, ovi reagensi se koriste u znatno manjim količinama.

Najzapaženiji su katalizatori zasnovani na bornoj kiselini i njenim derivatima.<sup>21</sup> Pretpostavlja se da borna kiselina i njeni derivati deluju na isti način kao i reagensi za kuplovanje, dakle stvaraju se aktivirani estari borne kiseline, pogodan za reakciju sa aminom i stvaranje amida, ali se borna kiselina regeneriše u reakciji (Shema 6), pa deluje kao katalizator.



**Shema 6.** Stvaranje amidne veze katalizovano derivatima borne kiseline

Relativno nov i važan koncept u organskoj hemiji jeste “koncept redoks ekonomije” kod kojeg interna razmena oksidacionih stanja između susednih funkcionalnih grupa unutar, ili između reaktanata, omogućava stvaranje reaktivnih intermedijera bez potrebe za stehiometrijskim količinama reagensa. U kontekstu formiranja amidne veze, ovo se postiže katalitičkim stvaranjem aktiviranih karboksilata iz funkcionalizovanih aldehida, kao što su formilciklopropani,  $\alpha,\beta$ -nezasićeni aldehidi<sup>22</sup>,  $\alpha$ -hidroksi enoni,<sup>23</sup>  $\alpha$ -haloaldehidi i epoksialdehidi<sup>24</sup>. Ovi procesi se odvijaju naročito dobro sa *N*-heterocikličnim karbenskim katalizatorom (NHC) i kokatalizatorom koji generiše aktivirani karboksilat, koji se konvertuje u amid (Shema 7). Formiranje amidne veze na ovaj način moguće je upotrebom samo katalitičkih količina ovih reagensa i što je posebno značajno, ne dolazi do stvaranja sporednih proizvoda reakcije.

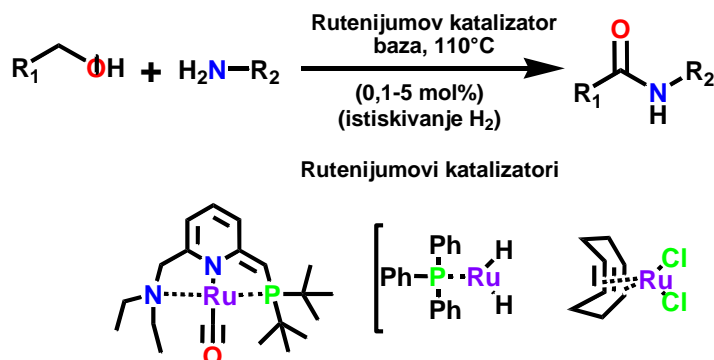


**Shema 7.** Katalitičke redoks hemoselektivne reakcije formiranja amidne veze reakcijom amina sa aldehydima, formilciklopropanima,  $\alpha$ -hidroksienonima i  $\alpha$ -haloaldehidima. (HFIP = heksafluoroizopropanol; HOAt = 3H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-3-ol).

Poseban primer oksidativnog formiranja amidne veze je kuplovanje alkohola i amina podpomognuto rutenijumskim katalizatorima (Shema 8).<sup>25</sup> Ova reakcija je ekonomična, odvija se bez prisustva kiseline, baze ili drugih reagenasa za kuplovanje, i stvara se samo molekulski (gasoviti) vodonik kao sporedni proizvod reakcije. Iako formalno spada u tip oksidativnih aminacija, oksidans nije potreban u stehiometrijskom odnosu. Mehanistički gledano, rutenijumov katalizator tipa „klešta” potpomaže, odnosno, omogućava dehidrogenizaciju alkohola do aldehida koji zatim formira amidnu vezu sa aminom (Shema 8). Za modifikaciju



ovog postupka, korišćeno je i nekoliko alternativnih rutenijumskih katalizatora koji su pružili skromna poboljšanja postupka u odnosu na originalan katalizator tipa „klešta“.<sup>26,27</sup>



**Shema 8.** Sinteza amida iz alkohola i amina, katalizovana kompleksima rutenijuma

Kao što su razvijene alternative kiselinama u reakciji formiranja amidne veze, u poslednjih nekoliko godina intenzivirana su istraživanja u ispitivanju alternativnih hemijskih vrsta za amine. Npr., pokazalo se da izonitrili reaguju sa karboksilnim kiselinama,<sup>28</sup> pri čemu se formiraju formimidatni karboksilatni mešoviti anhidridi. U uslovima visoke temperature i uz prisustvo mikrotalasa, ovi intermedijeri podležu premeštanju do *N*-formilamida, koji se konvertuju do primarnog amida, uklanjanjem *N*-formil grupe bazom. Međutim, ekstremni reakcioni uslovi i ograničena tolerancija prema drugim funkcionalnim grupama u molekulu ograničava primenu ove reakcije.

Nedavno je opisano nekoliko hemoselektivnih pristupa formiranju amidne veze iz tiokiselina.<sup>29</sup> Oni uključuju reakciju tiokiselina sa azidima<sup>30</sup> bez upotrebe aktivirajućih reagenasa ili reagenasa za kuplovanje. Veruje se da u reakciji tiokiselina i azida nastaje tiatriazolinski intermedijer koji se razlaže do amida, oslobađajući azot i elementarni sumpor. Tiokiseline takođe mogu reagovati sa izonitrilima na sobnoj temperaturi, tako da daju formimidatni karboksilatni mešoviti anhidrid (intermedijer) koji zatim reaguje sa aminom grupom i formira amidnu vezu<sup>31</sup> U sličnim reakcijama, tiokiseline mogu da reaguju sa elektron deficitarnim sulfonamidima,<sup>32</sup> izocijanatima ili izotiocijanatima tako da daju amide.<sup>33</sup> Ove reakcije se mogu sprovoditi u prisustvu nezaštićenih alkohola, delimično zaštićenih peptida i sterno zaklonjenih aminokiselina, pa su primenjive za sintezu glikopeptida.

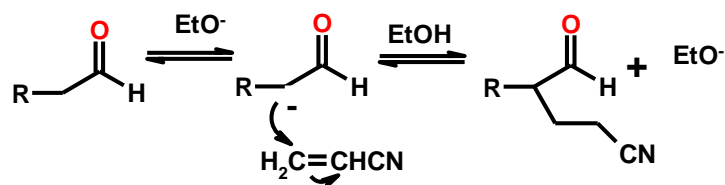
Amidi su najstabilniji od svih jedinjenja koja sadrže karbonilnu funkcionalnu grupu. Amidna veza je zajednička, i veoma važna, funkcionalna grupa peptida, biljnih polimera,  $\beta$ -laktamskih antibiotika, kao i sintetičkih polimera.

Peptidna veza je amidna veza (C(O)-NH) koja se formira između karboksilne grupe jedne aminokiseline i amino grupe druge aminokiseline uz eliminaciju vode, pri biosintezi proteina. Peptidna veza ima karakter delimično dvostruke veze (oko 40% u uobičajenim uslovima). Zbog toga je peptidna veza planarna i gotovo uvek ima *trans*-konfiguraciju. U oko 10% slučajeva peptidna veza može imati *cis*-konfiguraciju, obično kad u stvaranju peptidne veze učestvuje aminokiselina prolin.

## 2. 1. 2 Majklova adicija

Majklova reakcija ili Majklova adicija je nukleofilna adicija karbanjona ili nekog drugog nukleofila na  $\alpha,\beta$ -nezasićeno karbonilno jedinjenje.<sup>34,35</sup> Kako je originalno definisao Artur Majkl,<sup>36</sup> reakcija predstavlja adiciju enolata ketona ili aldehida na  $\beta$ -ugljenikov atom  $\alpha,\beta$ -nezasićenog karbonilnog jedinjenja. Prema definiciji koju je predložio Koler,<sup>37,38</sup> Majklova reakcija je 1,4-adicija stabilizovanog ugljeničnog nukleofila (metilenska grupa 1,3-dikarbonilnog jedinjenja i slično) na  $\alpha,\beta$ -nezasićeno karbonilno jedinjenje. Neki primeri nukleofila uključuju  $\beta$ -ketoestre, malonate i  $\beta$ -cijanoestre.

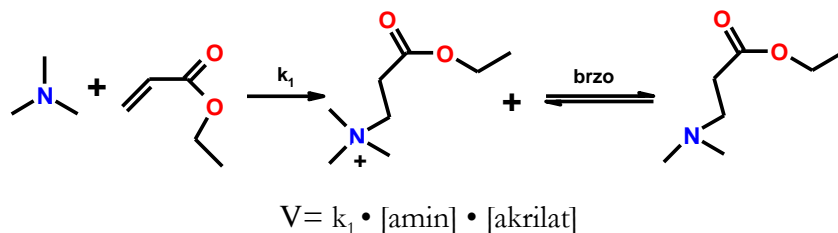
U reakciji Majklove adicije baza deprotonuje nukleofil, Majklov donor, koji zatim napada Majklov akceptor, tj. aktiviranu nezasićenu vrstu, i vrši nukleofilnu adiciju, pri čemu nastaje C-C veza (Shema 9). Reakcija se izvodi u prisustvu katalitičkih količina baza pomoću kojih nastaje ravnotežna koncentracija karbanjona. Reakcija je reverzibilna i smatra se da je stepen koji određuje brzinu reakcije nastajanje C-C veze, odnosno reakcija između karbanjona i supstituisanog alkena. Kao baze u Majklovoj reakciji koriste se tercijarni amini, piridin, piperidin, KOH, Na-alkoksidi (NaOEt, NaOtBu), u katalitičkim količinama. Kao rastvarači koriste se etanol, metanol ili etarski rastvarači. Majklovi akceptori poseduju elektron-privlačne i rezonanciono-stabilizujuće grupe, kao što su NO<sub>2</sub>, COR, CHO, COOR, CN, SO<sub>2</sub>R, koje stabilizuju anjonski intermedijer. Najčešći Majklovi donori (prekursori karbanjona) su CH<sub>2</sub>(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>, MeCOCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et, NCCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et, RCH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> i drugi.<sup>39</sup>



Shema 9. Mehanizam Majklove reakcije.

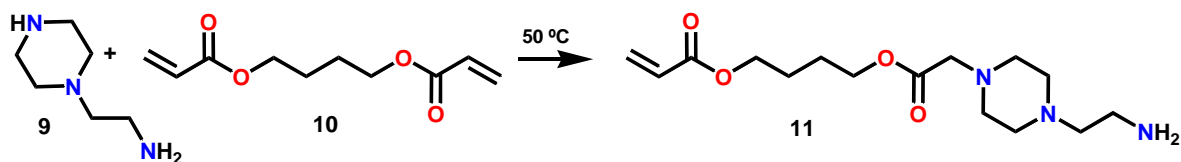
Karbanjoni, kao nukleofili, predstavljaju samo jednu vrstu potencijalnih donora koji se koriste u reakcijama Majklove adicije. Pored njih se koriste i nukleofili sa heteroatomima kao što su azot, sumpor, kiseonik i fosfor. Kada se kao donor koristi nukleofil koji poseduje azot, Majklova adicija se češće naziva aza-Majklova reakcija.<sup>40</sup> O njoj detaljnije u tekstu koji sledi.

Pošto su amini i nukleofili i baze, za odigravanje aza-Majklove reakcije najčešće nije potrebna dodatna baza, već je potrebno reaktante pomešati u organskom rastvaraču. Kinetika reakcije je drugog reda, jer zavisi i od koncentracije olefinskog akceptora i od koncentracije amina (Shema 10).



Shema 10. Primer aza-Majklove reakcije.

U aza-Majklovoj reakciji, sekundarni amini su jači nukleofili od primarnih amina i zato su reaktivniji. Ipak, treba naglasiti da reaktivnost veoma zavisi od elektronskih i sternih osobina amina. Na primer, 1,4-butandiol diakrilat (**10**) reaguje sa 1-(2-aminoetil)piperazinom (**9**) u ekvimolarnoj količini,<sup>41</sup> pri čemu reaguje samo sekundarni amin (**11**) iz piperazinskog prstena (Shema 11).



Shema 11. Veća reaktivnost sekundarnih amina u aza-Majklovoj reakciji.

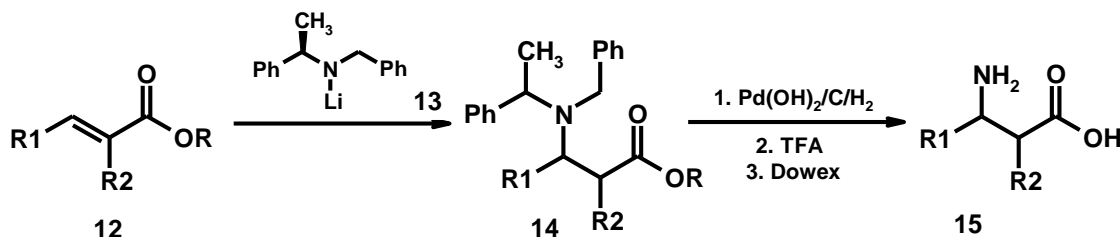
### 2.1.2.1. Diastereoselektivna aza-Majklova reakcija

Diastereoselektivnost u aza-Majklovoj reakciji se može postići upotrebom hiralnih amina ili upotrebom hiralnih supstrata.

#### 2.1.2.1.1. Upotreba hiralnih amina

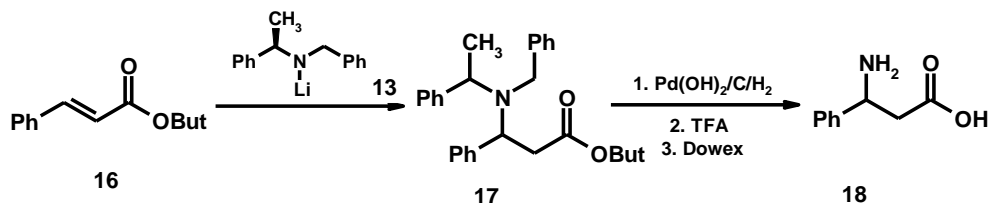
Litijum-amidi, poznati kao jake baze, od nedavno se koriste kao nukleofili u stereohemijski kontrolisanim aza-Majklovim adicijama. Prvu asimetričnu aza-Majklovu reakciju su opisali Hawkins i saradnici.<sup>42</sup>

Davies i saradnici su opisali da sekundarni homohiralni litijum amidi kao što je **13**, (Shema 9) podležu diastereoselektivnoj konjugovanoj adiciji na  $\alpha,\beta$ -nezasićene estre (**12**).<sup>43,44</sup> Nastali proizvod **14** podleže debenzilovanju uz prisustvo katalizatora, pri čemu se dobija odgovarajuća  $\beta$ -amino kiselina (**15**) u visokom prinosu (Shema 12).<sup>45</sup>



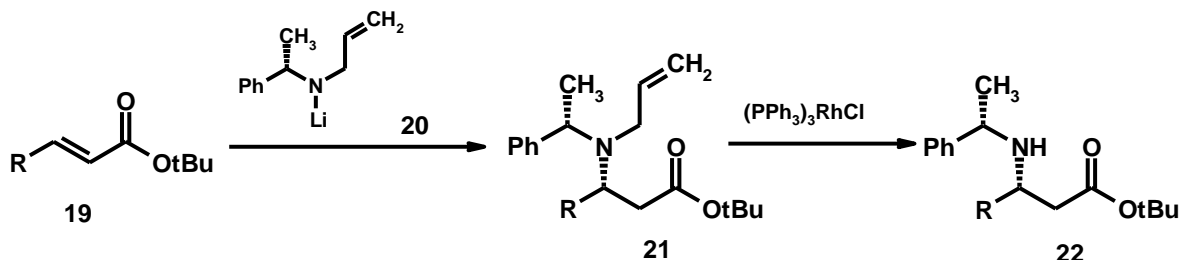
**Shema 12.** Dijastereoselektivna konjugovana adicija hiralnih litijum-amida (**13**) na  $\alpha,\beta$ -nezasićene estre, (**12**) pri čemu se dobija odgovarajuća  $\beta$ -amino kiselina (**15**).

Sličnim postupkom se može sintetizovati  $\beta$ -fenilalanin (Shema 13).<sup>46</sup> Visoka stereoselektivnost se postiže konjugovanom adicijom litijum-(*R*)-(a-metilbenzil)benzamidom (**13**) na *tert*-butilcinamat (**16**) na  $-78$  °C, pri čemu se dobija odgovarajući  $\beta$ -fenilalaninski derivat (**17**) sa 95% diastereoselektivnosti. Kada se na  $\beta$ -fenilalaninski derivat (**17**) primeni hidrogenoliza, a zatim hidroliza i jonoizmenjivačka hromatografija, dobija se (*S*)- $\beta$ -fenilalanin (**18**).



**Shema 13.** Dijastereoselektivno dobijanje (*S*)- $\beta$ -fenilalanina (**18**).

Dejvis i saradnici<sup>47,78</sup> su demonstrirali upotrebu litijum-*(S)*-(*a*-metilbenzil)alilamida (**20**) pri konjugovanim adicijama na enolate (**19**). Pri tome, *N*-alil grupa u Majklovom aduktu (**21**) može da se ukloni Wilkinson-ovim katalizatorom (Shema 14), i nastaje jedinjenje (**22**).

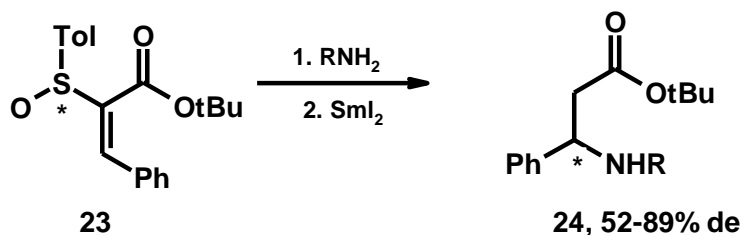


**Shema 14.** Upotreba litijum-*(S)*-(*a*-metilbenzil)alilamida (**20**) pri konjugovanim adicijama na enolate (**19**).

#### 2.1.2.1.2. Upotreba hiranih supstrata

Stereoselektivne 1,4-adicije ahiralnih amina, kao nukleofila, na hiralne akceptore su mnogo proučavane<sup>49,50</sup> i uočeno je da ahiralni amini podležu dijastereoselektivnim konjugovanim adicijama.

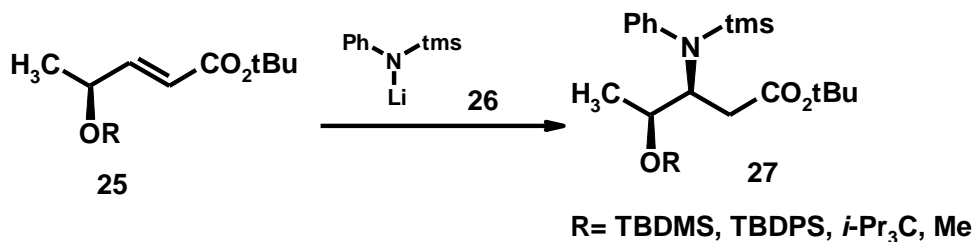
Matsujama i saradnici su opisali adiciju različitih acikličnih azotnih nukleofila na hiralni *p*-tolilsulfinil-cinamat (**22**), pri čemu su dobili adukt **24** (Shema 15) u dobrom dijastereoselektivnom višku.<sup>51,52</sup>



**Shema 15.** Adicija različitih acikličnih azotnih nukleofila na hiralni *p*-tolilsulfinil-cinamat (**23**), katalizovanu samarijum-jodidom.

Jamamoto i saradnici<sup>53</sup> su opisali konjugovanu adiciju ahiralnih litijum-amida (**26**) na hiralne enoate (**25**) (Shema 16), pri čemu nastaje smeša *syn* i *anti* proizvoda u visokim prinosima.

Sterno voluminozne grupe kao što su TBDMS (*tert*-butildimetilsilil) i TBDPS (*tert*-butildifenilsilil) daju *syn*-diastereomer (27), isključivo ili predominantno.

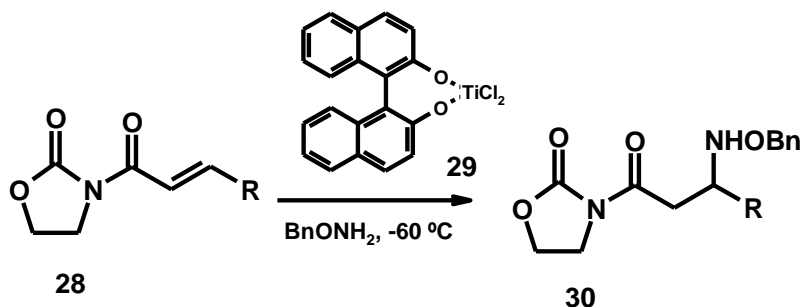


**Shema 16.** Konjugovana adicija ahiralnih litijum amida (26) na hiralne enoate (25).

#### 2.1.2.2. Enantioselektivna aza-Majklova adicija

Proteklih nekoliko godina, asimetrična aza-Majklova reakcija se pokazala kao odličan postupak za sintezu hiralnih  $\beta$ -amino karbonilnih jedinjenja.

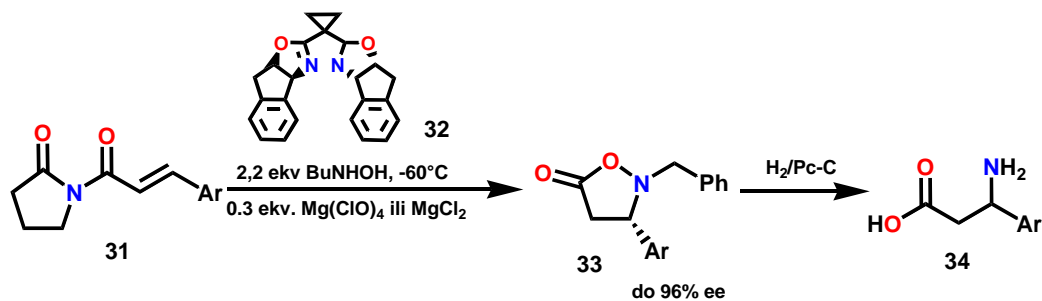
Mnoge istraživačke grupe širom sveta postigle su veliki uspeh u primeni organometalnih reagenasa u aza-Majklovim adicijama.<sup>54,55</sup> Prvi rad su objavili Jørgensen i saradnici 1996. godine. U njemu su opisali upotrebu titanijum-BINOL katalizatora (29) za katalizu adicije Ph-CH<sub>2</sub>-ONH<sub>2</sub> (Bn-ONH<sub>2</sub>) na *N*-aciloksazolidinone (28),<sup>56</sup> pri čemu se dobija jedinjenje 30 sa 42% enantioselektivnosti (Shema 17).



**Shema 17.** Upotreba titanijum-BINOL katalizatora (29) za katalizu adicije BnONH<sub>2</sub> na *N*-aciloksazolidinone (28).

Poznato je da *N*-supstituisani hidroksilamini (BnNHOH), koji su nukleofilniji od *O*-supstituisanih hidroksilamina, mogu podleći konjugovanoj adiciji na  $\alpha,\beta$ -nezasićene amide (31) pri čemu se dobijaju izoksazolidinoni (33), prekursori za sintezu  $\beta$ -amino kiselina (34).<sup>57</sup> Ova metoda se pokazala kao dobar postupak za dobijanje derivata  $\beta$ -aril- $\beta$ -amino kiselina visoke

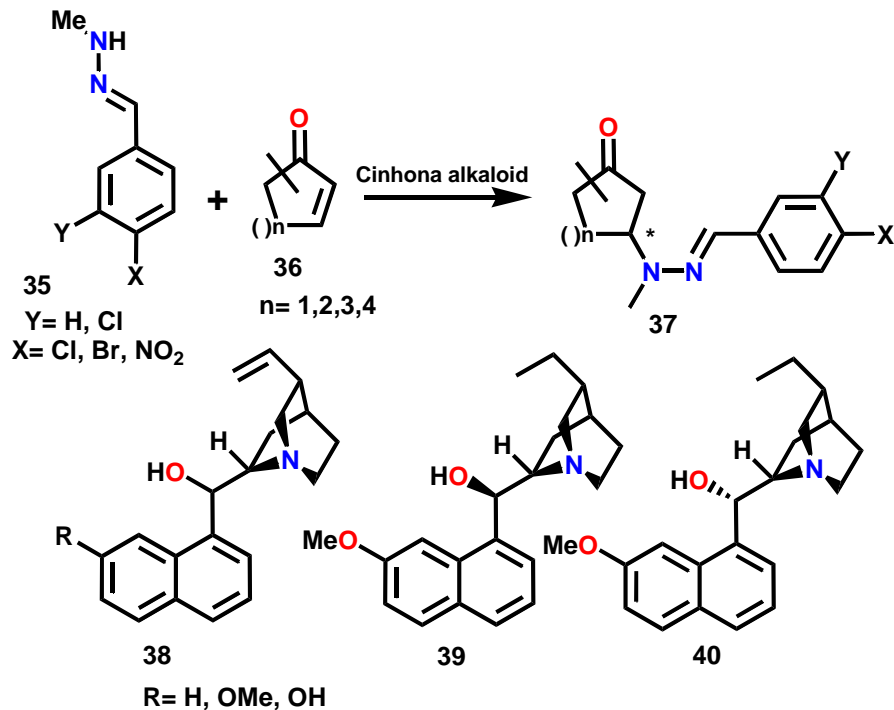
enantiomerne čistoće, uz upotrebu katalitičkih količina hiralnih Luisovih kiselina (**32**) (Shema 18).



**Shema 18.** Dobijanje izoksazolidinona (**33**), prekursora za sintezu  $\beta$ -amino kiselina (**34**).

### 2.1.2.3. Asimetrična aza-Majklova adicija katalizovana cinhona alkaloidima

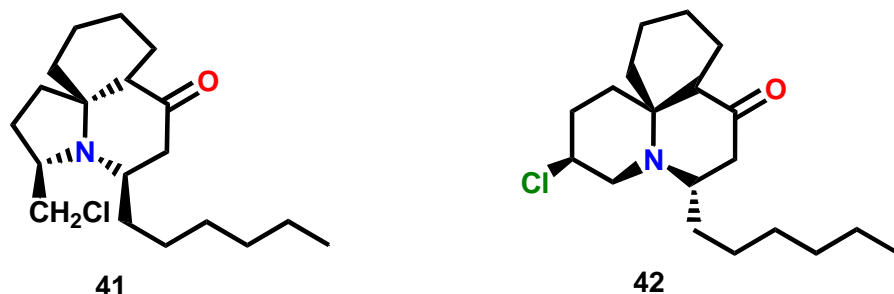
Jorgensen i Perdikia<sup>58</sup> su prvi razvili metod asimetrične aza-Majklove adicije hidrazona (**35**) na ciklične enone (**36**) potpomognute jeftinim i komercijalno dostupnim cinhona alkaloidima (**38**, **39** i **40**) kao katalizatorima, pri čemu se dobijaju proizvodi (**37**) u dobrom prinosu (do 100%) i do 77% optičke čistoće (*ee*) (Shema 19).



**Shema 19.** Asimetrična aza-Majklova adicija hidrazona (**35**) na ciklične enone (**36**) potpomognuta cinhona alkaloidima (**38**, **39**, **40**) kao katalizatorima.

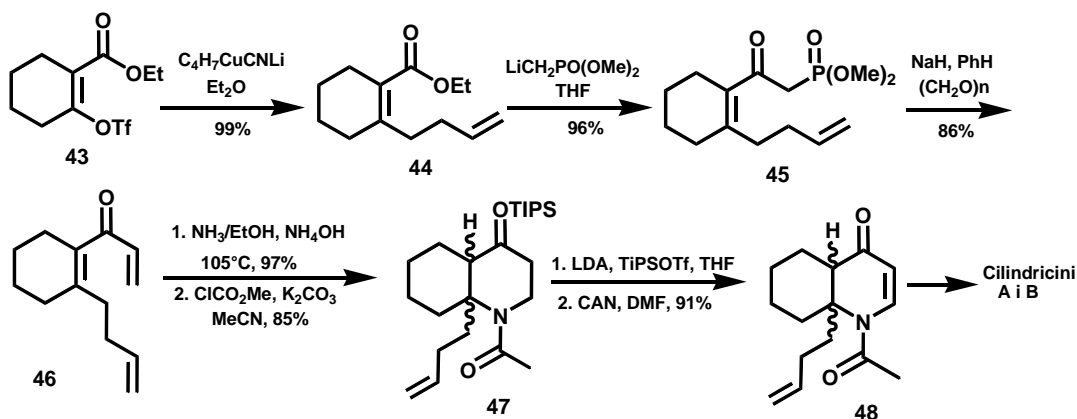
#### 2.1.2.4. Upotreba aza-Majklove adicije u sintezi prirodnih proizvoda

Aza-Majklova adicija se koristi za dobijanje cilindricina A i B. Cilindricini A i B su alkaloidi izolovani iz biljke *Clavelina cylindrica*. Cilindricin A je (3R, 4R, 5S, 7aR, 11aR)-3-hlormetil-5-heksil-perhidro-pirolu-[2,1-j]hinolin-7-on, a cilindricin B je (3S, 5R, 6S, 8aR, 12aR)-3-hloro-6-heksil-perhidropirido[2,1-j]hinolin-8-on (Schema 20).



Schema 20. Hemijske strukture Cilindricina A (41) i Cilindricina B (42).

Cilindricin B je prvi opisani primer pirido-[2,1-j]-hinolinskog cikličnog sistema, a cilindricin A prvi pirolu[2,1-j]hinolin otkriven u prirodi.



Schema 21. Upotreba aza-Majklovom reakcije za dobijanje cilindricina A i B.

Prvo se alkiluje jedinjenje (43) do diena (44), koji se zatim prevodi u ketofosfonat (45). Ketofosfonat (45) se potom prevodi u dienon (46) Wittig-Horner-ovom reakcijom. Zagrevanjem jedinjenja (46) sa amonijum-hidroksidom u etanolu dolazi do dvostruke Majklove reakcije kojom se dobija željeni 1-azadekalin (47) u visokom prinosu, kao 1:1 smeša *cis* i *trans* izomera (Schema 21).<sup>59</sup> Izomeri se razdvajaju upotrebom HPLC-a (High-performance liquid

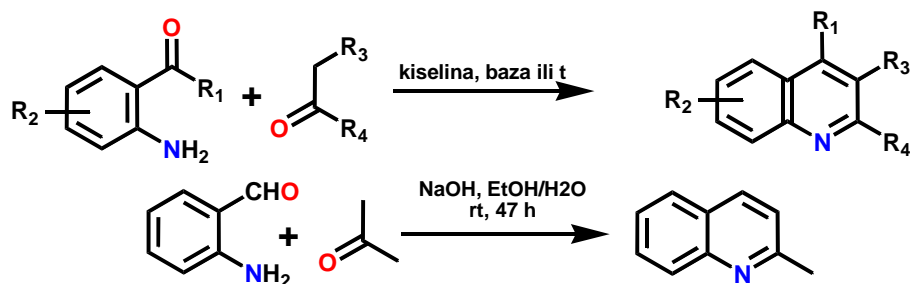


chromatography - visoko efikasnom tečnom hromatografijom) i prevode u derivate oktahidro-4-hinolina (48), a zatim se nezavisno koriste u sintezama cilindricina A i B.

Asimetrična aza-Majklova adicija se dosta primenjuje u organskoj sintezi, prvenstveno zbog značaja  $\beta$ -amino-kiselina ili  $\beta$ -amino-alkohola koji se nalaze u mnogim prirodnim proizvodima; kao i za dizajniranje novih jedinjenja koja sadrže  $\beta$ -amino kiseline, ili amino alkohole, a koja se koriste kao bioizosteri  $\alpha$ -amino kiselina.

### 2. 1. 3. Fridlenderova sinteza hinolina i srodne reakcije

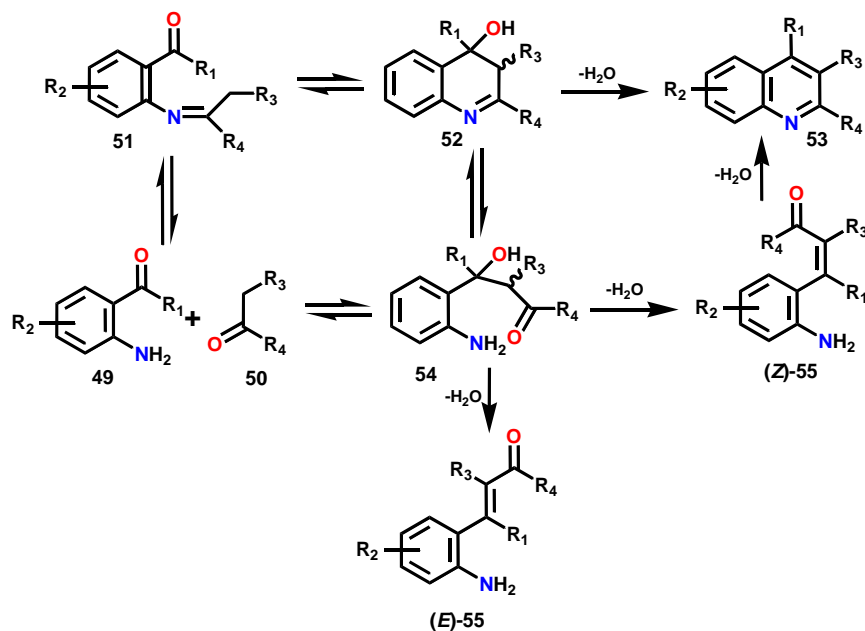
Hinolinski prsten je prisutan u velikom broju biološki aktivnih prirodnih proizvoda i sintetičkih molekula. Shodno tome, razvijene su brojne metode za sintezu hinolina i njegovih derivata, a Fridlenderova reakcija je jedan od najjednostavnijih sintetičkih postupaka. Ovaj tip reakcije prvi su opisali Fišer i Rudolf<sup>60</sup> iste godine kada je Fridlender opisao sintezu hinolina iz 2-aminobenzaldehida i acetaldehida.<sup>61</sup> U najopštijem obliku, Fridlenderova reakcija je bazno ili kiselo katalizovana kondenzacija aromatičnih 2-aminosupstituisanih karbonilnih jedinjenja (aldehida, ketona) sa odgovarajuće supstituisanim karbonilnim jedinjenjima koja sadrže reaktivnu  $\alpha$ -metilensku grupu, praćena ciklodehidratacijom (Shema 22). Fridlenderove anelacije (zatvaranje prstena) se sprovode refluktovanjem vodenih ili alkoholnih rastvora reaktanata u prisustvu baze ili kiseline, ili grejanjem smeše reaktanata na visokim temperaturama (150-220 °C), u odsustvu katalizatora.<sup>62</sup>



Shema 22. Fridlenderova kondenzacija.

Pretpostavljaju se dva moguća mehanizma Fridlenderove reakcije. Prema jednom, prvo se formira Šifova baza (51, Shema 23), koja je praćena intramolekulskom aldolnom reakcijom koja

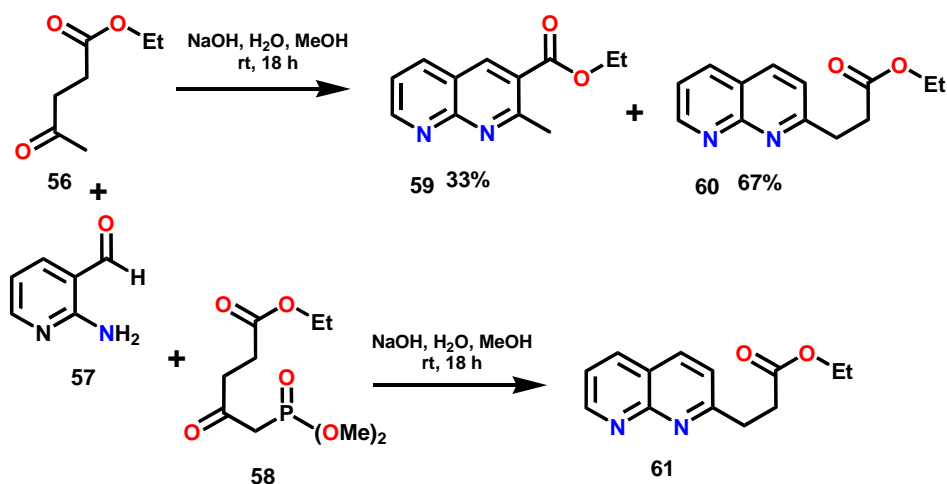
daje hidroksiimin (52). Nakon toga, dolazi do gubitka molekula vode i dobija se hinolin (53). Prema drugom mehanizmu, prvi, najsporiji korak reakcije je intermolekulska aldolna reakcija, kojom se dobija proizvod 54, koji se transformiše u hinolin, preko hidroksiiminskog intermedijera (52) ili preko oksoaminskog intermedijera (55).



Shema 23. Mehanizam Fridlenderove reakcije.

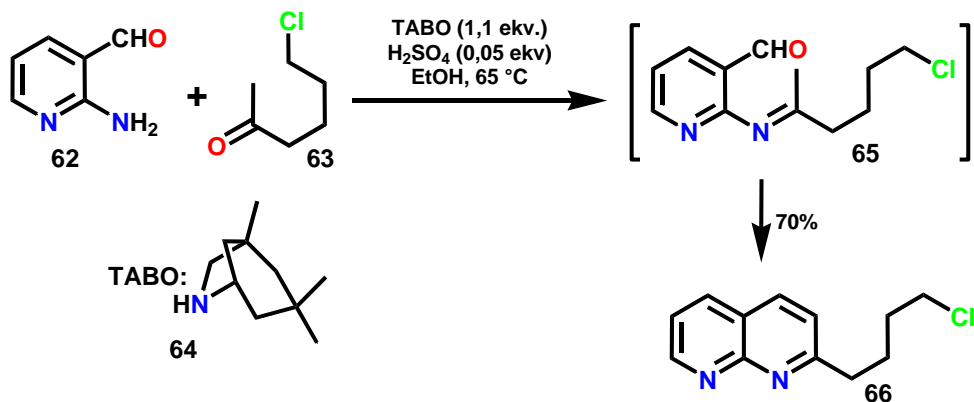
### 2.1.3.1. Regioselektivnost Fridlenderove reakcije

Kada u Fridlenderovoj reakciji učestvuju asimetrični ketoni, regioselektivnost reakcije zavisi od vrste katalizatora i reakcionih uslova. Naročito je teško postići regioselektivnost u slučaju reakcije asimetričnih 2-alkanona. Tada se se dobija smeša regioizomera, tj. 2,3-disupstutuisanih i 2-monosupstutuisanih hinolinskih derivata. Međutim, ukoliko se u  $\alpha$ -položaj karbonilnog jedinjenja uvede aktivirajuća (elektron-privlačna) grupa, predominantno se dobijaju 2-monosupstutuisani proizvodi. Na primer, hidroksidom katalizovana Fridlenderova reakcija 2-aminonikotinaldehida (57, Shema 24) sa etil-estrom 4-oksopentanske kiseline (56) daje smešu 2,3-disupstutuisanih i 2-monosupstutuisanih 1,8-naftiridina u molskom odnosu 2:1 (59 i 60). Međutim, uvođenje aktivirajuće fosfonatne grupe u molekul (58) dovodi do regioselektivne Fridlenderove reakcije, u kojoj se dobija samo 2-supstutuisani proizvod (61).<sup>63,64</sup>



**Shema 24.** Kontrola regioselektivnosti Fridlenderove reakcije između nikotinaldehida (**56**) i etil-4-oksopentanoata (**57**).

Korisno rešenje problema regioselektivnosti Fridlenderove reakcije postignuto je upotrebom pirolidinskih derivata kao katalizatora. Kada se metil-alkil-ke-ton (**63**) dodaje sporo u etanolni rastvor 2-aminoarilaldehida (**62**) i TABO-a (1,3,3-trimetil-6-azabicyklo[3.2.1]oktana, **64**), u prisustvu katalitičkih količina sumporne kiseline (Shema 25),<sup>65</sup> postignuti su visoki prinosi i regoselektivnost, pa se dobijaju 2-supstituisani proizvodi (**66**). Ovakav rezultat je objašnjen brzom transaminacijom 2-aminonikotinaldehida i formiranjem intermedijernog enamina koji se formira između 6-hloro-2-heksanona (**63**) i TABO-a, što vodi brzom formiranju Šifove baze i reakciji ciklizacije.

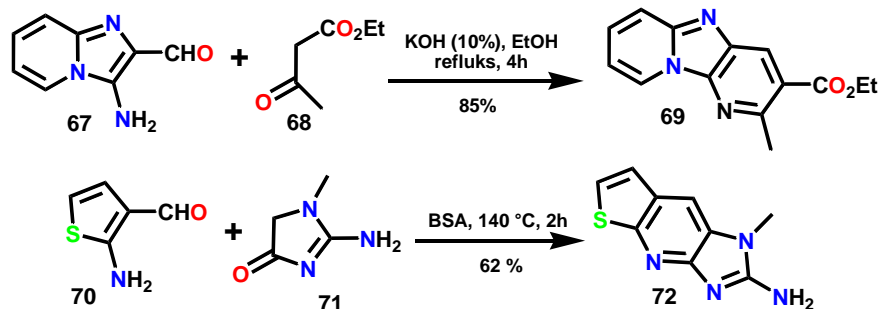


**Shema 25.** Kontrola regioselektivnosti Fridlenderove reakcije pomoću pirolidinskih katalizatora.

### 2.1.3.2. Tolerancija u odnosu na druge funkcionalne grupe reaktanata u Fridlenderovoj reakciji

Velika vrednost Fridlenderove reakcije jeste visoki stepen tolerancije u odnosu na druge funkcionalne grupe koje mogu biti prisutne na reaktantima. Jedino ograničenje u odnosu na funkcionalne grupe prisutne na aromatičnom prstenu 2-aminokarbonilnog reaktanta jeste stabilnost u odnosu na bazne ili kisele uslove koji se koriste da katalizuju reakciju. U skladu sa ovim  $R_2$  (Shema 22) može biti vodonik, alkil, aril, halogen ili *O*-alkil supstituent. U suštini, i elektron-bogata i elektron deficitarna 2-aminobenzokarbonilna jedinjenja podležu ovoj reakciji.<sup>66,67</sup> Najviše korišćena 2-aminosupstituisana aromatična karbonilna jedinjenja u Fridlenderovoj reakciji su 2-aminobenzaldehid, 2-aminoacetofenon ili 2-aminobenzofenon i njihovi derivati.

Heterociklični sistemi prstenova koji sadrže 2-aminokarboksaldehidnu grupu, kao što su 3-amino-2-formilimidazo[1,2*a*]piridin (**67**, Shema 26),<sup>68</sup> takođe se često koriste u Fridlenderovoj reakciji. Slično, 2-aminotiofenkarboksaldehid (**70**) reaguje sa 2-amino-1-metil-4-imidazolinom (kreatininom, **71**) uz upotrebu *bis*(trimetilsilil)acetamida (BSA) kao rastvarača.<sup>69</sup>

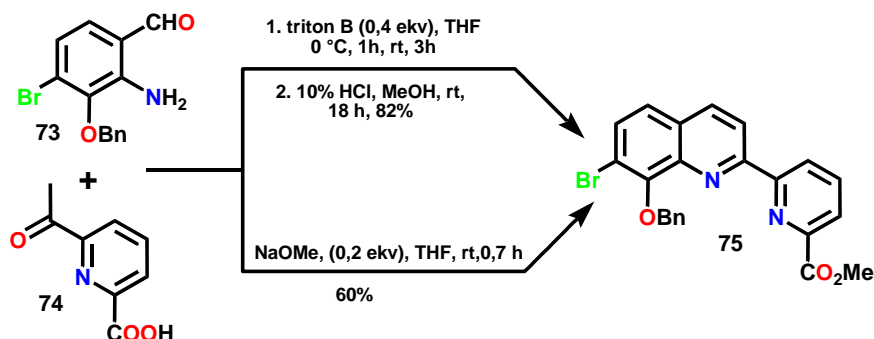


**Shema 26.** Primeri heterocikličnih sistema koji učestvuju u Fridlenderovoj reakciji.

U karbonilnom jedinjenju sa reaktivnom *α*-metilenskom grupom (Shema 22),  $R_3$  može biti vodonik, alkil, aril, alkoksi ili amino-grupa, a  $R_4$  može biti vodonik, alkil, nitro, acil, karboksi, karboksamidna, cijano, hidroksi, sulfonil i srodne funkcionalne grupe.

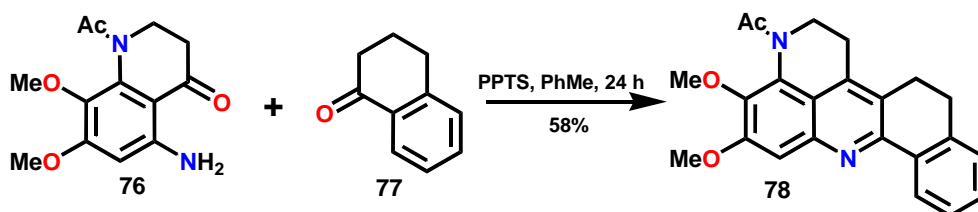
Fridlenderova reakcija 2-amino-3-(benziloksi)-4-brombenzaldehyda (**73**, Shema 27) sa metil-2-acetilpiridin-6-karboksilatom (**74**) daje 8-(benziloksi)-7-brom-2-(2'-piridil)hinolin-6'-karboksilnu kiselinu, koja se konvertuje u odgovarajući metil-estar (**75**) uobičajenim

metodama.<sup>70</sup> Alternativno, nađeno je da reakcija katalizovana natrijum-metoksidom daje isto jedinjenje u samo jednom reakcionom koraku, u umereno visokom prinosu (Shema 27).



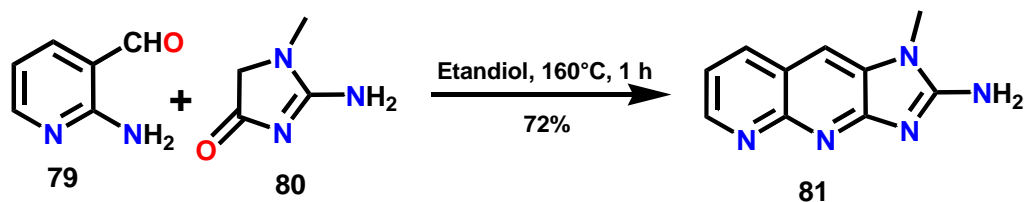
**Shema 27.** Sinteza metil estra 8-(benziloksi)-7-brom-2-(2'-piridil)hinolin-6'-karboksilne kiseline (75), Fridlenderovom reakcijom u različitim reakcionim uslovima.

Efikasna sinteza jedinjenja koja sadrže skelet benzo[*d*]pirido[2,3,4-*k*]akridina (78, Shema 28) postignuta je Fridlenderovom reakcijom između 1-acetil-5-amino-7,8-dimetoksi-2,3-dihidro-1*H*-hinolinona (76) i *a*-tetralona (77) u prisustvu piridinium-*p*-toluensulfonata (PPTS).<sup>71</sup>



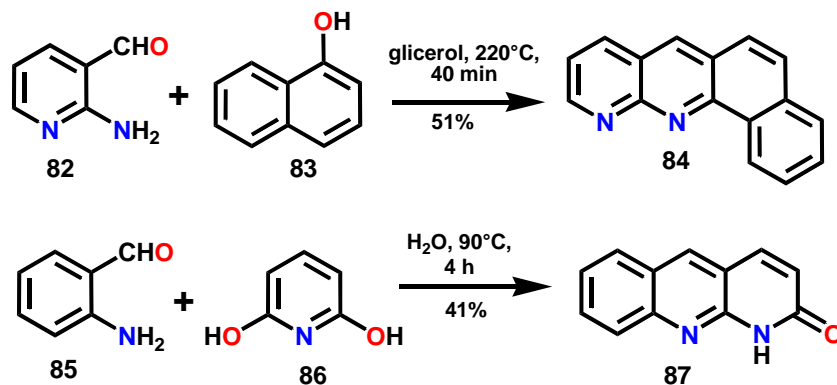
**Shema 28.** Sinteza jedinjenja sa skeletom benzo[*d*]pirido[2,3,4-*k*]akridina (78) Fridlenderovom reakcijom.

Neuobičajeni ketoni, kao što je 2-amino-1-metil-4-imidazolinon (80, Shema 29), reaguju sa 2-aminonikotinaldehidom (79) u Fridlenderovoj reakciji i daju odgovarajuće naftiridine (81) u dobrom prinosu.<sup>72</sup>



**Shema 29.** Imidazolidinoni (80) kao reaktanti u Fridlenderovoj reakciji.

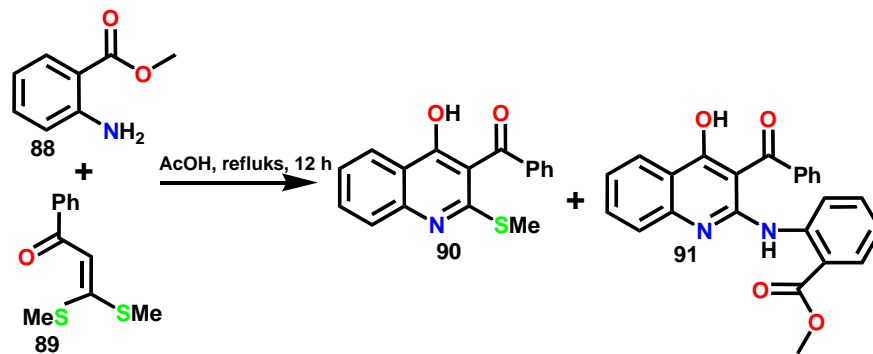
Fenolna funkcionalna grupa aromatičnih jedinjenja kao što je 1-naftol (**83**, Shema 30)<sup>73</sup> ili 2,6-dihidroksipiridin (**86**)<sup>74</sup> korišćena je uspešno kao zamena za karbonilnu grupu u sintezi supstituisanih [1,8]-naftiridina (**84** i **87**), u Fridlenderovoj reakciji sa odgovarajuće supstituisanim 2-aminobenzaldehidima (**82** i **85**).



**Shema 30.** Primeri upotrebe fenolnih jedinjenja kao zamene za karbonilna jedinjenja u Fridlenderovoj reakciji.

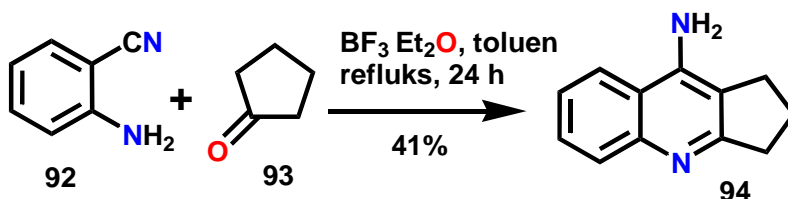
### 2.1.3.3. Modifikacije Fridlenderove reakcije

Pfcingerova reakcija<sup>75</sup> i reakcija Nijementovskog spadaju<sup>76,77</sup> u modifikovane Fridlenderove reakcije, koje se razlikuju u reaktantima. U reakciji Nijementovskog, umesto aromatičnog 2-aminosupstituisanog karbonilnog jedinjenja kao reaktant se koriste odgovarajuće aromatične 2-aminosupstituisane karboksilne kiseline ili njihovi estri. Na primer, reakcije  $\alpha$ -aroiiketenskih ditioacetala (**89**) sa estrima 2-aminobenzoeve kiseline (**88**) daju preferencijalno 2-metiltiohinolone (**90**) i 2-anilino-3-aroiilhinoline (**91**) preko  $\alpha$ -aroiiketenskih *N,S*-acetalnih, odnosno  $\alpha$ -aroiiketenskih aminalskih intermedijera (Shema 31).<sup>78</sup>



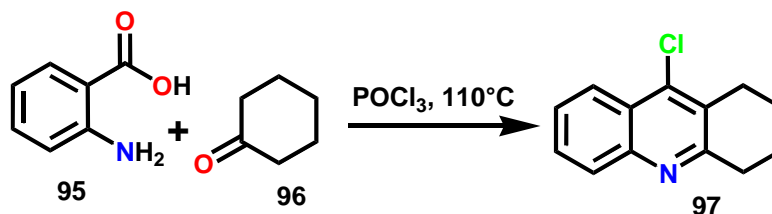
**Shema 31.** Reakcija Nijementovskog

Dalje modifikacije reakcije Nijementovskog uključuju i upotrebu aromatičnih 2-aminonitrila umesto odgovarajućih karboksilnih kiselina, pri čemu se dobijaju 4-aminohinolinski proizvodi. Na primer, antranilonitril (**92**),<sup>79</sup> 3-amino-4-cijano-1-fenilpirazoli,<sup>80</sup> ili etil-estri 6-amino-4-aril-5-cijano-4*H*-piran-3-karboksilnih kiselina<sup>81</sup> daju 4-aminohinolinske derivate. Tipični eksperimentalni uslovi podrazumevaju mešanje 2-aminonitrilnog jedinjenja sa odabranim ketonom u nitrobenzenu kao rastvaraču, u prisustvu cink(II)-hlorida na 120 °C,<sup>82</sup> ili u prisustvu aluminijum-trihlorida u dihloretanu uz refluks; ili u prisustvu bortrifluorida u toluenu, ili titanijumtetrahlorida u metilenhloridu.<sup>83</sup> Na ovaj način su sintetizovani takrin i njegovi derivati (**94**), nanomolarni inhibitori acetil- i butirilholinesteraze, potencijalna terapijska sredstva za tretman Alchajmerove bolesti (Shema 32).



Shema 32. Antranilonitrili kao reaktanti u reakciji Nijementovskog.

Još jedna modifikacija reakcije Nijementovskog podrazumeva zagrevanje antranilne kiseline (**95**) ili supstituisane antranilne kiseline i odgovarajućih ketona u fosforoksihloridu, koji u ovom slučaju služi i kao katalizator i kao rastvarač. Na ovaj način se dobijaju 4-hlorohinolinski derivati. Ovim postupkom su sintetizovani različiti 9-hlorotetrahidroakridinski derivati (**97**)<sup>84</sup> (Shema 33), kao prekursori za sintezu dualnih takrinskih inhibitora AChE. Prisustvo 9-hloro supstituenta na molekulu omogućilo je dalju funkcionalizaciju derivata, obično reakcijama nukleofilne aromatične supstitucije, i sintezu velikog broja strukturno različitih dualnih inhibitora acetilholinesteraze, koji istovremeno interaguju sa dva vezivna mesta na enzimu.



Shema 33. Sinteza 9-hlorotetrahidroakridina modifikovanom reakcijom Nijementovskog

#### 2.1.4. Nukleofilne aromatične supstitucije

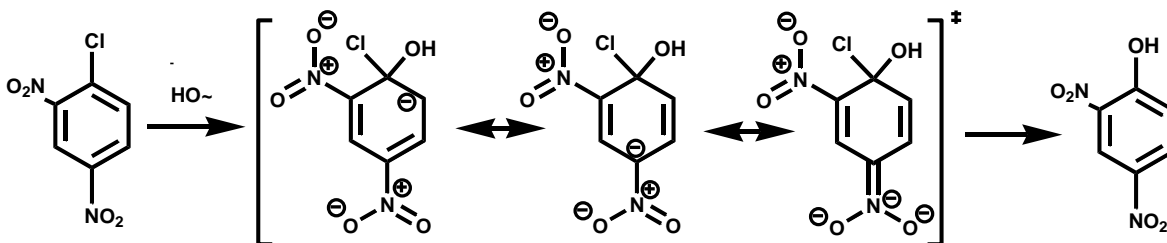
Nukleofilna aromatična supstitucija je reakcija u kojoj nukleofil zamenjuje dobro-odlazeću grupu (na primer halogen) na aromatičnom prstenu. Postoji šest mehanizama nukleofilne aromatične supstitucije:

1.  $S_NAr$  – mehanizam adicija – eliminacija
2.  $S_N1Ar$  – mehanizam koji se sreće kod arildiazonijum soli
3. mehanizam koji se odvija preko dehidrobenzenskog intermedijera
4.  $S_{RN}1$  – slobodno-radikaliski mehanizam
5. ANRORC mehanizam
6. Vikarijusova nukleofilna supstitucija

U ovom delu teksta posebno ćemo posvetiti pažnju mehanizmu adicija-eliminacija, obzirom na to da smo ovaj tip reakcije koristili za sintezu heterodimernih takrinskih inhibitora holinesteraza.

U poređenju sa alkil-halogenidima, aril-halogenidi su znatno manje reaktivni u reakcijama nukleofilne supstitucije jer je veza između halogena i  $sp^2$  hibridizovanog ugljenikovog atoma na aromatičnom prstenu jača zbog delokalizacije slobodnih elektronskih parova halogena na aromatičnom prstenu. Međutim, ukoliko je aromatično jezgro aktivirano nekom elektron-privlačnom grupom (kao što su nitro, karbonilna i slične grupe) nukleofilne supstitucije se lako vrše na umerenim temperaturama. Kada se osvrnemo na mehanizam reakcije, ovo postaje razumljivo: napadom nukleofila, aromatično jezgro postaje intemedijarni anjon u kome je negativna šarža delokalizovana na ugljenikove atome u prstenu, a elektron-privlačne grupe, ako su vezane u *o*- ili *p*-položaju u odnosu na odlazeću grupu, stabilizuju ovaj anjonski intermedijer (Shema 34). Bez prisustva elektron-privlačnih supstituenata, nukleofilne supstitucije se teško vrše i zahtevaju visoke temperature. Prisustvo tri nitro-grupe na aromatičnom prstenu može toliko efikasno da stabilizuje negativno naelektrisanje na anjonskom intermedijeru, da ne dolazi do odlaska odlazeće grupe, već se formira stabilan Majzenhajmerov kompleks. Ovo se dešava na primer, kada se natrijum-metoksid dodaje u rastvor 2,4,6-trinitrofenola.<sup>85</sup>





**Shema 34.** Mehanizam adicija-eliminacija ( $S_NAr$ ) nukleofilne aromatične supstitucije

U nekim slučajevima dolazi do supstitucije i kada na aromatičnom prstenu nisu prisutni aktivirajući supstituenti. Na primer, fluorbenzen (sa natrijum-metoksidom, na 0 °C),<sup>86</sup> 1- ili 2-bromnaftalen (sa piperidnom na 230 °C),<sup>87</sup> i 1-fluornaftalen (sa litijum-piperididom na 40 °C)<sup>88</sup> podležu direktnoj supstituciji prema mehanizmu adicije-eliminacije. Sa druge strane, mogu se naći literaturni podaci koji podržavaju lančani radikalski mehanizam, iniciran jednoelektronskim transferom, kod supstitucija na ovakvim neaktiviranim aromatičnim prstenovima.<sup>89</sup>

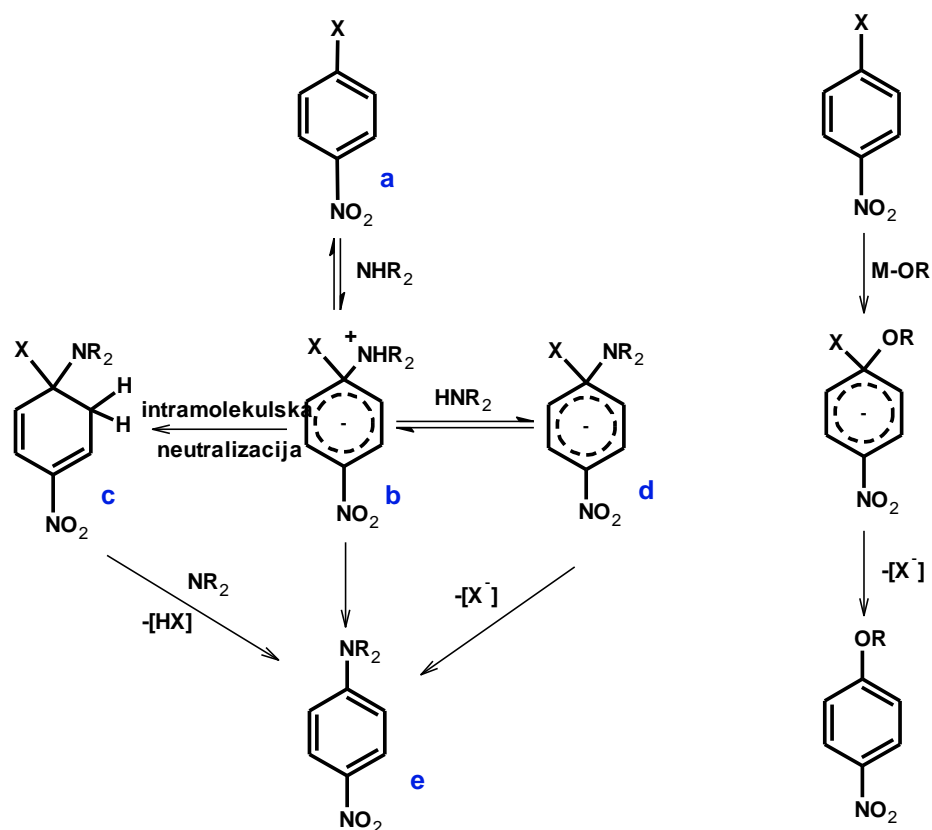
Azotov atom u piridinskom prstenu ima približno isti aktivirajući efekat kao i nitro-grupa vezana za benzenov prsten. 2- i 4-supstituisani halopiridini lako podležu nukleofilnoj supstituciji. Halogenovani diazini kao što je 2,4-dibrompirimidin<sup>90</sup> su još reaktivniji. Iako najveći stabilizujući efekat imaju nitro-grupe ili atomi azota na položajima 2-, 4- i 6- fenil, odnosno heteroaromatičnog prstena, u nekim slučajevima heteroaromatični azot i nitro-grupe na položajima 3- i 5- mogu da ispolje aktivirajući efekat u odnosu na nukleofilnu aromatičnu supstituciju. Tako na primer, 1-fluor-3-nitrobenzen,<sup>91</sup> 3-fluorbenzotrifluorid,<sup>92</sup> 3-hlorbenzotrifluorid,<sup>93</sup> 1,3-dinitrobenzen<sup>94</sup> i 3-brompiridin<sup>95</sup> reaguju sa natrijum-alkoksidom ili piperidinom, dok je hlorbenzen<sup>96</sup> inertan prema ovim nukleofilima.

#### 2.1.4.1. Uticaj odlazeće grupe na brzinu nukleofilne supstitucije

Red reaktivnosti aril-halogenida u reakciji nukleofilne supstitucije je  $F > Cl > Br > I$ . Za razliku od alkil-fluorida, aril-fluoridi su najreaktivniji zbog toga što faza koja određuje brzinu

reakcije jeste adicija nukleofila na aromatični prsten. Obzirom da je fluor najelektronegativniji, on najbolje stabilizuje negativno naelektrisanje u prelaznom stanju reakcije.

1-Fluor-2,4-dinitrobenzen spada u najčešće korišćena jedinjenja koja sadrže fluor. Zahvaljujući lakom kuplovanju sa terminalnim amino-grupama peptida, postao je ključni reagens za prvi pouzdan metod sekvencioniranja proteina.<sup>97</sup> Nađeno je da je ovaj, Sendžerov reagens, daleko reaktivniji prema amino-grupama od prekursora za njegovu sintezu, 1-hlor-2,4-dinitrobenzena. Superiorna reaktivnost fluorarena u odnosu na hlorarene u reakcijama aromatične nukleofilne supstitucije je opšti fenomen. Sreće se kod mono-, di- i tri-nitrosupstituisanih derivata.<sup>98</sup> Odnosi konstanti brzina reakcija ( $k_F/k_{Cl}$ ) kreću se u opsegu 300-1300 kada se kao nukleofili koriste natrijum-alkoksidi, odn. 40-770 kada se kao nukleofili koriste aromatični i alifatični amini. Međutim, u jedinstvenom slučaju, 2,4-dinitrohlorbenzen reaguje nešto brže od fluor- analoga sa *N*-metilanilinom ( $k_F/k_{Cl}=0,73$ ). Ova inverzija halogenskog efekta treba da nas podseti na mehanističku kompleksnost  $S_NAr$  reakcija sa aminima kao nukleofilima. Aktivirani haloareni, 1-fluor- i 1-hlor-4-nitrobenzen (**a**, X=F ili Cl, Shema 35) reaguju sa amonijakom, primarnim i sekundarnim aminima tako da daju unutrašnju so (Majzenhajmerov kompleks), 6-amonijum-6-halocikloheksa-2,4-dien (**b**). Ovaj intermedijer može da se 'vрати' do reaktanata, ili da se deprotonuje bazom (**d**), ili da intramolekulski prenese proton, tako da se dobije 5-amino-5-halo-1,3-cikloheksadien (**c**), koji podleže  $\beta$ -eliminaciji halovodonika, tako da se dobija konačni proizvod supstitucije (**e**). Ova reakcija, u poređenju sa nukleofilnom aromatičnom supstitucijom sa alkoxidima (Shema 35, desno), može da ima nekoliko mogućih dodatnih reakcionih koraka.



**Shema 35.** Mehanistički putevi  $S_NAr$  reakcije sa aminima kao nukleofilima (levo) nisu jednoznačni kao u slučaju alkoksida kao nukleofila (desno).

Šloser i saradnici su nedavno ispitivali uticaj odlazeće grupe na reaktivnost halopiridina u reakcijama nukleofilne supstitucije.<sup>99</sup> Veliki broj 2-halopiridina i nekoliko 4-halopiridina su tretirani natrijum-etoksidom u dietiletru na 25 °C. Relativne reaktivnosti jedinjenja procenjene su eksperimentima kompeticije. U svim ispitanim reakcijama, fluor se pokazao kao bolja odlazeća grupa od ostalih halogena.

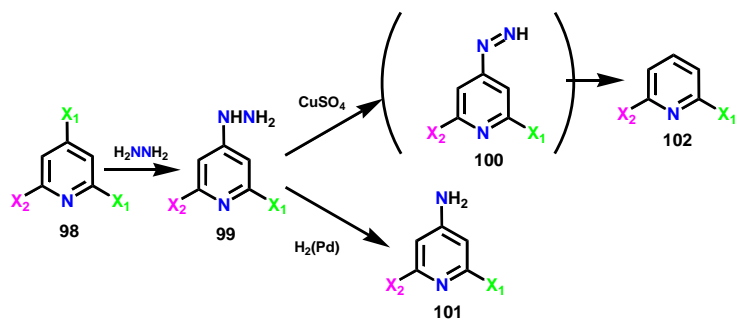
#### 2.1.4.2. Efekat ostalih supstituenata u prstenu na reaktivnost 2-halopiridina

Pri ispitivanju u kojoj meri ostali supstituenti na piridinskom prstenu ubrzavaju ili usporavaju nukleofilnu aromatičnu supstituciju. Nađeno je da elektron-donorske grupe kao što je etoksi, usporavaju reakciju, dok elektron-privlačni supstituenti, kao što je trifluorometil ubrzavaju reakciju. Kod 2-halopiridina, fluor, kao supstituent, zahvaljujući svom induktivnom elektron-privlačnom efektu ubrzava reakciju, kada se nalazi u *m*- ili *p*- položaju prema odlazećoj

grupi, ali je usporava u *o*- položaju, zbog odbijanja slobodnih elektronskih parova. Procena reaktivnosti 2,6-difluoropiridina sa natrijum-etoksidom potvrđuje prethodno zapažene trendove. Fluor na položaju 3- i 4- ubrzava nukleofilnu aromatičnu supstituciju, dok je usporava u položaju 5. Svi ostali halogeni, nezavisno od njihovog položaja, ubrzavaju reakciju nukleofilne supstitucije, jedan do dva reda veličine. Naročito je interesantan efekat koji trimetilsilil-grupa ispoljava u reakciji nukleofilne aromatične supstitucije. Kao umerena elektron-akceptorska grupa, ona ubrzava nukleofilni napad kada je udaljena od mesta supstitucije.<sup>100</sup> Međutim, kada se nalazi u blizini mesta na kom se vrši supstitucija ona sterno sprečava reakciju.

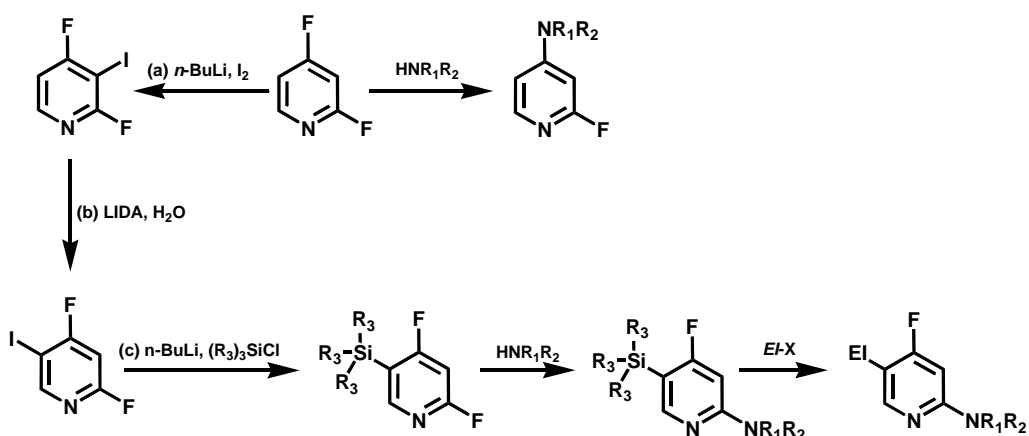
#### 2.1.4.3 Silil-trik: izbor između dva potencijalna mesta supstitucije

Ako dva ili tri halogena na piridinskom prstenu zauzimaju mesta na kojima se lako vrši nukleofilna supstitucija, teško je *a priori* reći koji halogen će reagovati kao odlazeća grupa, a koji će ostati na aromatičnom prstenu. Nedostatak regioselektivnosti u reakcijama nukleofilne aromatične supstitucije je odavno poznat. Na primer, 2,4-dihlorpiridin<sup>101</sup> i 2,4,6-tribrompiridin<sup>102</sup> daju 2- i 4-amino-supstitucione proizvode u odnosu 1:3, ili 1:1, kada se tretiraju vodenim rastvorom amonijaka na 150-175 °C. Regioselektivnost u položaju 4- može se postići sa sekundarnim aminima (npr. dimetil-aminom) i sa hidrazin-hidratom.<sup>103</sup> Tako dobijeni arilhidrazini (**99**) mogu se prevesti blagim oksidacionim sredstvima (kao što je bakar(II)sulfat) preko aril-diazina (**100**) u odgovarajuće arene (**102**, Shema 36). Alternativno, arilhidrazini se mogu redukovati do aminopiridina (**101**) uz upotrebom cinka,<sup>104</sup> natrijuma,<sup>105</sup> Raney nikla<sup>106</sup> ili vodonika.<sup>107</sup>



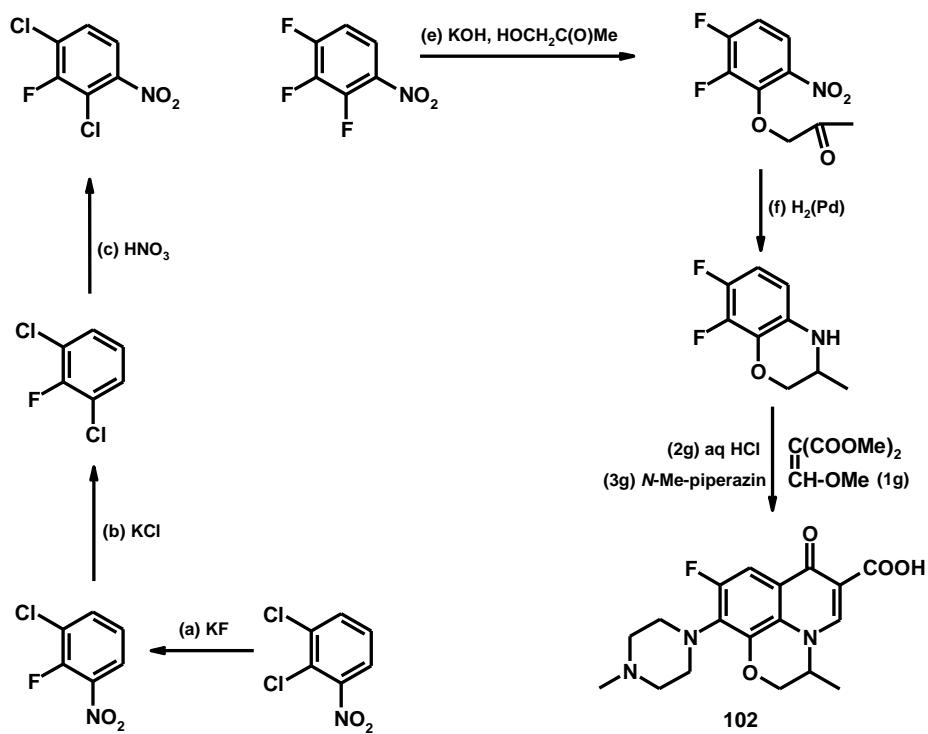
**Shema 36.** Regioselektivna supstitucija 2,4-dihalo- ili 2,4,6-trihalo-piridina hidrazinom na položaju 4- i dalje transformacije proizvoda.

Kada je kod 2,4-dihalopiridina u položaju 5- prisutna trimetilsilil-grupa, nukleofilna supstitucija se isključivo vrši u položaju 2. Ovo je tzv. "silil-trik".<sup>103</sup> Trialkilsilil-grupa se može uvesti sekvencom reakcija (Shema 37): (a) uvođenje joda u položaj 3- pomoću organolitijumovih reagenasa, (b) migracija joda sa položaja 3- u položaj 5- pomoću litijum-diizopropilamida (LIDA), (c) interkonverzijom I/Li i kondenzacijom sa hlortrimetil- ili hlortrietilsilanom. Trialkilsilil-grupa se može ukloniti sa molekula ili zameniti bromom ili jodom upotrebom tetrabutilamonijum-fluorid-hidrata, molekulskim bromom ili jod-hloridom.<sup>103,108</sup>



**Shema 37.** Selektivna nukleofilna supstitucija 2,4-difluorpiridina na položaju 4-, ili na položaju dva, uz pomoć trialkilsilil grupe.

Jedan primer upotrebe nukleofilne aromatične supstitucije je sinteza antibiotika ofloksacina (**102**), inhibitora enzima giraze. Ova sintetička sekvenca obuhvata šest  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  reakcija.<sup>109</sup> Polazeći od komercijalno dostupnog 1,2-dihlor-3-nitrobenzena, hlor na položaju 2- se zamenjuje fluorom (Shema 38, **a**). Zatim sledi denitrovanje/hlorovanje (**b**) i ponovno uvođenje nitro grupe na položaju 6- (**c**), čime se dobija 1,3-dihlor-2-fluor-4-nitrobenzen, što omogućava duplu Cl/F izmenu kalijum-fluoridom (**d**). Tretman kalijum-hidroksidom i hidroksiacetonom (**e**), praćen katalitičkom hidrogenizacijom (**f**) daje 7,8-difluoro-3,4-dihidro-3-metil-2H-1,4-benzoksazin. Kondenzacija sa dietil(etoksimetilen)-malonatom (**1g**), zatim kiselo katalizovana ciklizacija praćena hidrolizom estera (**2g**) i zamena fluora na položaju 7- N-metilpiperazinom (**3g**) daje konačno antibiotik ofloksacin.



Shema 38. Sinteza antibiotika ofloksacina.

## 2.2 Metode molekuskog modelovanja

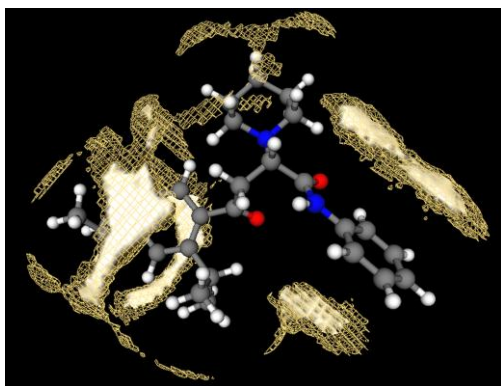
### 2.2.1. Analiza odnosa trodimenzionalne strukture i aktivnosti jedinjenja – 3D-QSAR metode

Korelacija biološke aktivnosti jedinjenja sa njihovim svojstvima izvedenim na osnovu trodimenzionalnih struktura, i identifikacija ključnih strukturnih karakteristika jedinjenja koje doprinose njihovoj biološkoj aktivnosti, odnosno potentnosti, predstavlja centralni problem u dizajnu lekova. Još osamdesetih godina prošlog veka su razvijene brojne metode za 3D QSAR analizu, a CoMFA<sup>110</sup> metod (**C**omparative **M**olecular **F**ield **A**nalysis, Komparativna analiza molekulskih polja) je jedan od najviše upotrebljivanih metoda. CoMFA se primenjuje na seriju jedinjenja koja su međusobno svrstana u konfiguracionom prostoru na osnovu pogodno izabranog kriterijuma. Ovako međusobno svrstani molekuli opisuju se različitim trodimenzionalnim poljima (prvobitno je korišćeno samo sterno i elektrostatičko polje), izračunatim u tačkama u prostoru oko molekula, upotrebom odgovarajuće probe. Analiza delimičnih najmanjih kvadrata (PLS) se koristi za kvantitativnu korelaciju deskriptora izvedenih iz molekulskih polja i jačine biološkog dejstva ispitivanih jedinjenja. Međusobno svrstavanje molekula u konfiguracionom prostoru je ključni problem za uspešnu CoMFA analizu, i predstavlja usko grlo i najveći izvor grešaka u CoMFA studijama. Na žalost, ne postoje nikakva čvrsto utemeljena pravila za postupak međusobnog svrstavanja molekula. Ukoliko strukturni podaci o kompleksima između liganda i biološke mete (najčešće proteina) ne postoje, molekuli se međusobno svrstavaju na osnovu svih drugih dostupnih informacija: farmakofornih hipoteza ili na osnovu sličnosti između molekulskih fragmenata. Ukoliko je eksperimentalno određena struktura biološke mete (enzima, receptora) dostupna, tada se koriste tzv. metode međusobnog svrstavanja molekula zasnovane na strukturi (biološke mete). One obuhvataju doking molekula u vezivno mesto biološke mete ili svrstavanje molekula u odnosu na ligand koji je kokristalisan sa biološkom metom. Drugi problem vezan za CoMFA i srodne metode za 3D-QSAR analizu jeste nizak odnos signala i šuma u PLS analizi. Šum u ovom kontekstu znači da se deskriptori (varijable) koje nisu relevantne za jačinu dejstva jedinjenja razmatraju pri izvođenju modela. U nekim slučajevima šum može da nadvlada udeo varijabli koje su zaista

relevantne za model.<sup>111</sup> Prema tome, odabir najinformativnijih varijabli i isključivanje pozadinskog šuma predstavlja opšti problem u 3D-QSAR analizi. Razvijene su brojne metode odabira relevantnih varijabli:  $q^2$ -GRS,<sup>112</sup> GARGS<sup>113</sup> i GOLPE.<sup>114</sup> Takođe, učinjeni su i napor da se razviju molekularni deskriptori nezavisni od međusobnog prostornog svrstavanja molekula. To su CoMMA,<sup>115</sup> EVA<sup>116</sup> i WHIM<sup>117</sup> deskriptori, pi čemu se smatra da su EVA deskriptori najmanje osetljivi na male promene u konformaciji molekula. Pastor i saradnici razvili GRIND (**GRid INdependent Descriptors**) deskriptore. Ovaj tip deskriptora smo koristili u našem istraživačkom radu, pa će metod biti detaljno opisan u tekstu koji sledi.

#### 2.2.1.1. Polja molekularnih interakcija - GRID metod

Polja molekularnih interakcija (MIF, “molecular interaction fields”)<sup>118,119</sup> pokazuju prostornu varijaciju energije interakcije između molekula mete i odgovarajuće probe. Ona se mogu izračunati za bilo koji molekul poznate trodimenzionalne strukture. MIF-ovi, dakle, daju informaciju gde su energetske povoljne, a gde energetske nepovoljne pozicije probe u prostoru oko molekula mete (Slika 1).



**Slika 1.** Polja molekularnih interakcija

Zamislamo za početak program koji izračunava elektrostatički potencijal molekula. Kompjuterski model molekula se prvo napravi tako što se položaji atoma opišu u Dekartovim koordinatama, atomi se povežu odgovarajućim vezama i svakom atomu u molekulu se dodeli odgovarajući tip atoma, i ovaj model se zatim okruži zamišljenom ortogonalnom mrežom tačaka (kutijom). Sledeći korak jeste da se izračuna rad potreban da se dovede jedinično elektrostatičko naelektrisanje iz beskonačnosti do prve tačke mreže (kutije). Ista procedura se



zatim ponavlja za svaku od tačaka kutije, uključujući i one koje se nalaze unutar molekula, dok potencijal nije izračunat za svaku poziciju. Najbolji način da se predstave rezultati ovakvog izračunavanja jeste da se napravi trodimenzionalni grafik koji pokazuje konturnu površinu koja okružuje molekul (Slika 1). Ova konturna površina predstavlja jednu, izabranu vrednost elektrostatičkog potencijala.

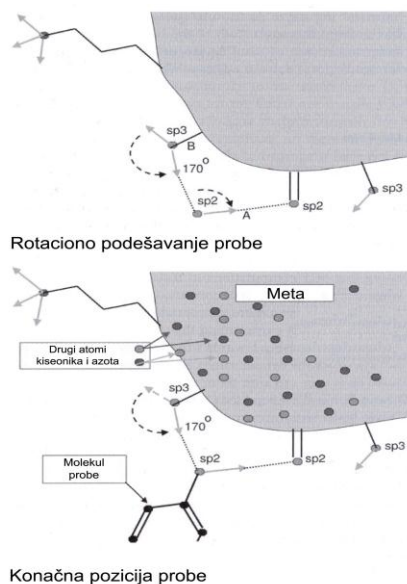
Program GRID funkcioniše na sličan način, ali sa ciljem da pruži hemijski specifične informacije o molekulu. Generičko ime „meta” se koristi za molekul (ili grupu molekula) koji se proučavaju programom GRID, a objekat kojim se mere potencijali u svakoj tački kutije zove se proba. Individualne vrednosti potencijala u tačkama kutije nazivaju se „GRID vrednosti” a konačan grafik „GRID mapa”. Mogu se koristiti različite probe, koje predstavljaju specifične hemijske grupe, tako da se mogu dobiti hemijski specifične informacije o načinu na koji meta može povoljno interagovati sa drugim molekulima.

GRID metod ima tri specifične osobine:

1. GRID probe su anizotropne. Proba predstavlja atom ili malu grupu atoma. Program funkcioniše tako što centralni atom probe smešta u odgovarajuću tačku kutije, a zatim se proba rotira dok se ne nađe ona orijentacija probe, odnosno takva usmerenost hemijskih veza u prostoru, koja odgovara energetski najpovoljnijoj interakciji atoma mete i atoma probe. Ovo je naročito značajno kod proba koje služe da se opiše vodonično vezivanje.
2. Meta „odgovara” kada se proba pomera oko nje iz mesta u mesto. Ovo znači da se na sličan način i atomi mete pomeraju u prostoru (rotiraju oko odgovarajućih veza) dok se ne ostvari energetski najpovoljnija interakcija atoma mete i atoma probe. Ovo se može predstaviti primerom na Slici 2. Atom probe je hidroksilna grupa, vezana za aromatični sistem, tj. „ $sp^2$  hibridizovana”, a metu predstavljaju bočni serinski aminokiselinski ostatak, sa  $sp^3$  hibridizovanom –OH grupom i peptidna karbonilna grupa. U ovom slučaju GRID program radi sledeće: rotira probu u prostoru, pri čemu je kiseonikov atom fiksiran u tački kutije, sve dok vodonikov atom nije usmeren tako da može da formira vodoničnu vezu sa amidnim  $sp^2$  kiseonikovim atomom. Proba se zatim rotira

oko zamišljene  $sp^2$ - $sp^2$  ose, sve dok slobodni elektronski parovi na kiseoniku, ne budu usmereni ka  $sp^3$  kiseoniku serinskog ostatka. Zatim se  $sp^3$  hidroksi-grupa serina rotira, dok njen vodonikov atom ne bude usmeren tako da može da formira vodoničnu vezu sa  $sp^2$  kiseonikovim atomom probe. Rotacije serinskog kiseonika se naziva „odgovorom mete na probu”.

3. Pretpostavljeno je da su i meta i proba „potopljene u vodu”. Pretpostavljeno je *a priori* da okolina koja okružuje metu ima dielektričnu konstantu 80 (što odgovara vodenoj sredini), i da se ona smanjuje na vrednost 4 u šupljinama velikih globularnih makromolekula, što predstavlja uprosečenu vrednost dielektrične konstante zbog različitog lokalnog elektrostatickog polja koje formiraju aminokiselinski ostaci unutar proteina.



**Slika 2.** Podešavanje molekula probe i molekula mete

### 2.2.1.2. GRID polje sila

Pre početka GRID izračunavanja, fajl molekula mete se priprema i proverava programom GRIN. Najvažniji proces koji GRIN sprovodi jeste spajanje nepolarnih vodonikovih atoma sa njihovim susednim teškim atomima tako da daju „prošireni tip atoma”. Ovo omogućava da se GRID izračunavanja sprovode mnogo brže. GRID energije se računaju između probe u odgovarajućoj grid tački (svakom “čvoru” kutije u koju je molekul “zaronjen”) i svakog

proširenog atoma mete. Ukupna energija predstavlja zbir sledećih pojedinačnih osnovnih energetskih doprinosa: 1. disperzione sile, opisane su Lennard-Jones-ovim 12, 6 potencijalom, 2. elektrostatički doprinos, opisan klasičnim Coulomb-ovim zakonom i 3. član koji opisuje vodonično vezivanje, a predstavlja proizvod tri člana, jednog koji je funkcija rastojanja između teških atoma probe i mete koji formiraju vodoničnu vezu i druga dva su ugaoni članovi koji zavise od međusobnog prostornog rasporeda atoma koji učestvuju u vodoničnom vezivanju. Pored ovih osnovnih članova postoje i drugi naknadno dodati članovi: 1. član koji opisuje vodonične interakcije u kojima učestvuju atomi vodonika vezani za alifatične ugljenikove atome; to su obično *N*-terminalni  $\alpha$  ugljenikovi atomi peptida i proteina; 2. članovi koji opisuju interakcije jona metala; 3. članovi koji posebno tretiraju molekule vode koji formiraju četiri vodonične veze i stoga imaju tetraedarsku geometriju, odnosno one koji formiraju tri vodonične veze, odnosno zauzimaju planarnu geometriju, 4. molekuli vode koji su čvrsto vezani za metu (u ovom slučaju protein), i stoga se ponašaju kao deo mete, tretiraju se na specifičan način, uzimajući u obzir njihovu lokalnu okolinu; 5. u poslednjim verzijama programa polje sadrži članove koji opisuju entropijske doprinose kao i 6. hidrofobnu („DRY”) probu, koja detektuje hidrofobne regione na površini mete. Ova proba takođe uzima u obzir entropijski doprinos.

### 2.2.1.3. Kalibracija GRID polja sila

Postoji nekoliko važnih činjenica koje se tiču kalibracije GRID polja. GRID polje je kalibrisano na taj način da dobro opisuje reverzibilne sisteme u ravnotežnom stanju. Nije primenljivo na stanja van ravnoteže kao ni na molekule koji se kovalentno vezuju za receptor. Kalibracija je dovoljno osetljiva da prepozna razlike između sličnih, ali ipak različitih tipova atoma. Npr., u sadašnjoj verziji programa postoji 10 tipova kiseonikovih i oko 20 tipova atoma azota. To se postiže odgovarajućim brojem tipova atoma koji nije ograničen u GRID polju sila. Po potrebi kalibrišu se novi tipovi atoma. GRID polje je kalibrisano uglavnom upotrebom eksperimentalnih podataka. Za razlikovanje entalpijskih i entropijskih doprinosa ukupnoj slobodnoj energiji ( $\Delta G$ ) interakcije su upotrebljena kalorimetrijska merenja. Iz kristalografskih podataka dobijene su vrednosti za Van der Walsove poluprečnike različitih tipova atoma. Takođe, korišćene su eksperimentalno određene polarizabilnosti molekula da se predvidi Lenard-Džonsov potencijal. Atomska naelektrisanja određena su teorijskim metodama. Svi ovi

parametri nalaze se u „GRUB” fajlu. Program GRIN uvek analizira ulazne podatke pre svakog GRID izračunavanja. Ovaj program proverava i strukturu mete i integritet GRUB fajla i upozorava korisnika o bilo kakvim nesigurnim karakteristikama u oba fajla.

#### 2.2.1.4. GRIND molekularni deskriptori izvedeni iz MIF

Klasičan način da se koriste MIF-ovi jeste identifikacija povoljnih vezivnih mesta za probe na makromolekulima kao metama, što se može koristiti za dizajn potentnijih liganada. Sa druge strane, MIF-ove je moguće izračunati za seriju malih molekula u nameri da se okarakterišu prema njihovom potencijalu da deluju kao ligandi, vezujući se za određene vrste makromolekula. Kada se koriste na ovaj način, MIF-ovi su ustvari izračunati „molekularni deskriptori” koji predstavljaju svojstva molekula. Molekularni deskriptori zasnovani na GRID MIF-ovima su korišćeni u različitim 3D-QSAR metodama: CoMFA, CoMSIA,<sup>120</sup> GRID-GOLPE.<sup>121</sup>

Međutim da bi poredili MIF-ove različitih molekula, molekuli moraju biti precizno „preklopljeni”, odn. da imaju takvo uzajamno svrstavanje („alignment”) koji omogućava poređenje onih fragmenata strukturno različitih molekula koji interaguju sa istim delom biološke mete. Ovakvo preklapanje molekula, moguće je postići na nekoliko načina. Kada su poznate strukture ligand-receptor kompleksa, međusoban raspored se može dobiti preklapanjem ekvivalentnih atoma, odnosno onih koji interreaguju sa istim delovima receptora. Ukoliko strukture kompleksa nisu dostupne, ali je poznata struktura makromolekula, moguće je uraditi doking 3D struktura ispitivanih molekula u vezivno mesto receptora i tako dobiti strukture kompleksa koje služe za dalje preklapanje. Međutim, ako ni struktura makromolekula nije poznata, što je često slučaj, molekuli se mogu preklapati na osnovu svih relevantnih informacija, kao što su određene hipoteze farmakofore, slični strukturi fargmenti, itd. Međutim, ovakve operacije uvek uvode određenu dozu subjektivnosti u proces preklapanja.

Osim problema sa međusobnim rasporedom molekula, „usko grlo” u procesu 3D-QSAR analize, vezano je i za prirodu samih MIF-ova. U MIF-u su informacije date sa mnogo različitih varijabli. Ukupan broj varijabli je uvek veliki, npr. oko nekoliko stotina hiljada. Zbog toga ne mogu da se upotrebe jednostavne statističke metode kao što je MLR (višestruka linearna regresija) i potrebna je upotreba multivarijantnih i megavarijantnih metoda kao što su analiza

delimičnih najmanjih kvadrata (PLS, partial least squares) i/ili analiza glavnih komponenata (PCA, principal component analysis).

Zbog toga je razvijen novi tip molekulskih deskriptora, koji kondenzuju relevantne informacije u mnogo manjem broju varijabli nego što ih ima u inicijalnom setu. Rezultat ovih napora bili su VolSurf i GRIND (GRid INdependant Descriptors) deskriptori, sa različitim metodama ekstrahovanja i kondenzovanja informacija i sa različitim potencijalnim primenama. VolSurf deskriptori<sup>122</sup> služe da opišu farmakokinetičke (ADME) osobine molekula, a GRIND<sup>123</sup> deskriptori da opišu farmakodinamičke osobine molekula, odnosno sposobnost molekula da se vezuje za biološke makromolekule.

#### *Osnovna svojstva GRIND deskriptora*

GRIND metod je razvijen sa ciljem da se ekstrahuju najrelevantnije informacije iz MIF-a i kondenzuju u korisne varijable. Zahtevi koji GRIND deskriptori ispunjavaju su sledeći:

1. Rezultujuće varijable su nezavisne od međusobne pozicije ili orijentacije molekula u prostoru.
2. Varijable imaju hemijsko značenje i lako se mogu interpretirati.
3. Mali broj varijabli treba da sadrže najvažnije informacije.
4. Dobijene varijable su pogodne za analizu standardnim hemometrijskim metodama kao što su PCA i PLS.
5. Deskriptori se mogu izračunati brzo i automatski.

Dobijanje (izračunavanje) GRIND deskriptora podrazumeva tri koraka:

#### *1. Izračunavanje MIF-ova (polja molekulskih interakcija)*

MIF-ovi se računaju programom GRID. GRIND Metod izračunava tri vrste MIF-ova, sa sledećim GRID probama: DRY, koja karakteriše hidrofobne interakcije, O ( $\gamma^2$  kiseonik) koji opisuje akceptore vodničnih veza i N1 (planarni, amidni azot) koji opisuje donore vodoničnih veza. Međutim ukoliko je poznata priroda vezivnog mesta biološke mete moguće je proširiti izbor proba ukoliko je to potrebno, npr. dodati probe koje odgovaraju naelektrisanim grupama u vezivnom mestu. U novijim verzijama programa ALMOND<sup>124</sup> i Pentacle<sup>125</sup> uvedena je i „TIP“,<sup>126</sup> proba koja opisuje oblik molekula.

## 2. Ekstrakcija najznačajnijih regiona MIF-ova (diskretizacija MIF-ova)

Najznačajniji regioni su oblasti MIF-ova u kojima ligand može da ostvari jake povoljne interakcije sa probom (odn. grupama u vezivnom mestu molekula mete). Proces odabira najvažnijih regiona je najkritičniji u celom GRIND postupku. Odabirom samo nekoliko GRID pozicija (nodova), svi ostali se uklanjaju i više se ne koriste. Veliki deo informacija sadržanih u MIF-u se odbacuje u ovoj fazi izračunavanja. Kod GRIND procedure visoko relevantni regioni se biraju balansiranom kombinacijom dva različita kriterijuma.

Vrednosti polja u odabranim regionima treba da budu negativne (povoljne) i da budu intenzivne tj. da imaju visoke apsolutne vrednosti. Sa druge strane, rastojanje između ovih regiona treba da bude relativno veliko da ne bi bilo prevelike koncentracije nodova u malom broju oblasti. U principu, doprinos jednog ili drugog kriterijuma se može podešavati u programu ALMOND. Takođe se može podešavati broj izabranih nodova, predefinisana vrednost je 100, međutim kada se radi sa nešto većim jedinjenjima, ili jedinjenja sadrže veći broj supstituenata, ovaj broj nodova nije dovoljan da se stvori kompletna mapa relevantnih regiona i stoga ga treba povećati.

Nedavno je opisan i novi način diskretizacije MIF-ova, prema AMANDA<sup>127</sup> algoritmu koji je brži i daje drugu generaciju GRIND deskriptora (GRIND-2). AMANDA funkcioniše na sličan način, sa tim što broj izabranih nodova nije fiksiran, već se određuje maksimalan broj nodova za svaki atom u molekulu. Zbog toga, ukupan broj nodova zavisi od broja atoma ili grupa koje mogu da proizvode relevantne interakcije. Opcije koje se mogu podešavati: faktor skaliranja, odnosno faktor koji se koristi u modulaciji izabranog broja nodova za svaki atom u molekulu meti, i granične vrednosti energija interakcija za probe; MIF nodovi sa energijom koja je viša (negativne energije održavaju povoljne interakcije) od ovih definisanih graničnih vrednosti se odbacuju. Na ovaj način se dobijaju profiltrirani MIF-nodovi iz kojih se dalje ekstrahuju najznačajniji regioni polja. Budući da ima samo dva parametra koji se ne moraju posebno podešavati za svaku seriju jedinjenja, ovaj algoritam je posebno koristan jer ne mora da bude proveravan od strane korisnika programa i pogodan je za analizu serija koje sadrže veoma različite molekule. AMANDA algoritam diskretizacije nodova je inkorporiran u program Pentacle. Autori su u originalnom radu pokazali da sa empirijski izabranim faktorom

skaliranja i graničnim vrednostima interakcija, AMANDA algoritam mnogo bolje opisuje interakcije liganada sa receptorom od originalnog GRIND algoritma, na velikom broju primera preuzetih iz PDB-a.

### 3. *Prevođenje informacije iz MIF u deskriptore („kodiranje”) upotrebom MACC2 (maximum auto- and crosscovariance) kriterijuma*<sup>128</sup>

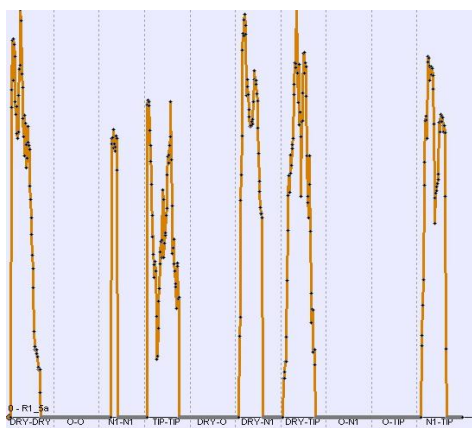
Sledeći korak u GRIND postupku jeste da se opiše prostorni raspored nodova (čvorova) odabranih najznačajnijih regiona, ali bez upotebe njihovih apsolutnih koordinata ili spoljašnjeg referentnog sistema. GRIND metod se zasniva na tome da se opišu rastojanja između nodova kao i energije MIF-a reprezentovane ovim nodovima. Da bi se ovo postiglo, rastojanja između nodova se konvertuju u diskretan set različitih opsega rastojanja, a zatim se svaki par odabranih nodova analizira, tako što se meri njihovo međusobno rastojanje i par se pripisuje određenom opsegu rastojanja. Na kraju ove analize, svaka varijabla je predstavljena parom nodova za koji je proizvod vrednosti njihovih MIF-ova najviši. Rezultat ove analize jeste skup vrednosti, po jedna za svaku varijablu, pri čemu je vrednost 0 ukoliko ne postoji par nodova na takvom rastojanju, a ukoliko postoji jeste energetska vrednost proizvoda, ali normirana tako da ima vrednosti između 0 i 1. Treba napomenuti da je veoma kritičan odabir broja opsega rastojanja; veliki broj opsega daće mnogo “praznih” rastojanja, a mali broj će kondenzovati rastojanja u jednu varijablu, što rezultuje gubitkom informacija.

U programu Pentacle uvedena je alternativna metodologija kodiranja MIF-ova, CLACC, koja se koristi za serije strukturno sličnih jedinjenja. Međutim, CLACC je veoma spor pa ga ne treba koristiti za velike serije jedinjenja, iako daje bolje rezultate od MACC-a.

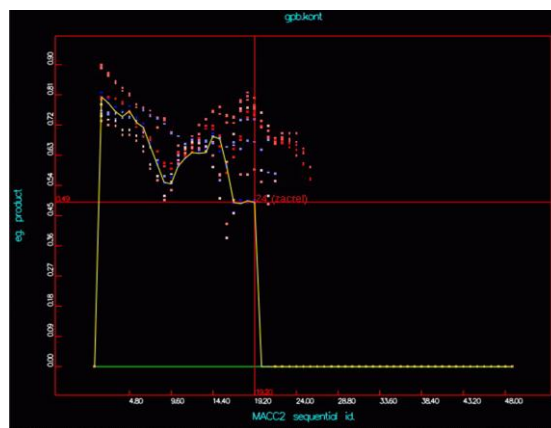
Ovako dobijene rezultate – deskriptore (varijable), moguće je prikazati različitim tipovima korelograma u kojima su rastojanja predstavljena horizontalnom osom a normalizovani proizvodi energija vertikalnom osom (Slika 3). Ova procedura se ponavlja za svaki izračunati tip MIF-a. Autokorelogrami opisuju rastojanja između nodova koji pripadaju istom tipu MIF-a, a kroskorelogrami rastojanja između nodova koji pripadaju različitom tipu MIF-a. Svaki korelogram je blok deskriptora (varijabli) koje karakterišu različite sposobnosti ispitivanog molekula da interaguje sa probom na određenim pozicijama. Ukupan broj varijabli koji se dobija zavisi od veličine najvećeg jedinjenja koje opisuje najveće rastojanje između dva noda u

seriji i rezolucije grida. Jedinjenja koja poseduju osobine lekova („drug like“) obično sadrže 50-80 varijabli po korelogramu.

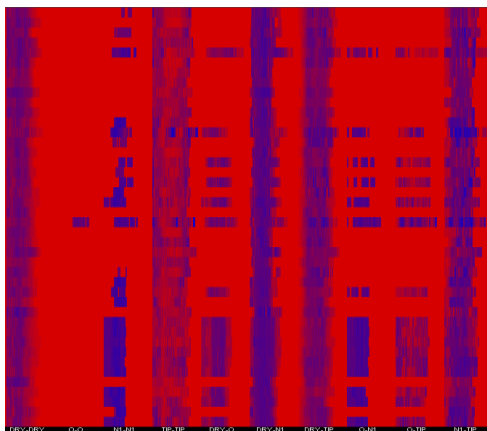
Korelogrami se upotrebljavaju za poređenje intenziteta različitih varijabli koje opisuju jedno jedinjenje. Međutim, da bi se stekao ukupan uvid varijabli za sva jedinjenja u seriji, reprezentacija varijabli „hitmapama“ je korisnija. Hitmape (Slika 4.) su zapravo vrste matrica, gde svaki red predstavlja jedno jedinjenje a svaka kolona odgovarajuću varijablu, pri čemu su varijable obojene od crvene (niske vrednosti) do plave boje (visoke vrednosti).



**Slika 3a.** Korelogram deskriptorskih varijabli za jedno jedinjenje u seriji u programu Pentacle.



**Slika 3b.** Korelogram za sva jedinjenja u seriji u programu ALMOND. Boje tačaka predstavljaju aktivnost jedinjenja, crvena su aktivna a plava neaktivna.



**Slika 4.** Hitmapa- matrica, u kojoj svaki red predstavlja jedno jedinjenje a svaka kolona odgovarajuću varijablu, pri čemu su varijable obojene od crvene (niske vrednosti) do plave boje (visoke vrednosti).



### 2.2.1.5 Trodimenzionalna analiza strukture i aktivnosti (3D QSAR) upotrebom programa ALMOND i Pentacle

Izračunati GRIND deskriptori mogu se direktno koristiti da se dobiju multivarijantni modeli. PCA analiza<sup>129</sup> pokazuje sličnosti i/ili razlike u okviru ispitivane grupe jedinjenja. Ukoliko postoji dodatna informacija o jedinjenjima, npr. biološka aktivnost izražena brojnomo vrednošću ( $K_i$ ,  $IC_{50}$  itd.), ona se koristi kao zavisno promenjiva i PLS regresijom<sup>130,131</sup> se dobija 3D QSAR model.

#### *Analiza glavnih komponentata, PCA*

Nakon izračunavanja GRIND deskriptora generiše se X-matrica deskriptora (varijabli). Ova matrica se prilikom modelovanja može koristiti sirova (bez prethodne transformacije) ili se može skalirati. Npr. može se ukloniti iz nje bazna linija, tj. šum. Često se interakcije na određenim opsezima rastojanja nalaze samo za neka jedinjenja u seriji. Te varijable imaju određene vrednosti za ova jedinjenja, a vrednosti nula za druga. Stoga ove varijable daju veliku varijansu, ali mogu imati veoma loš uticaj na sam kvalitet i verodostojnost modela. Funkcija skaliranja uklanja iz X-matrice sve varijable koje imaju vrednost 0 za jedno ili više jedinjenja.

PCA je tehnika korisna da se organizuju sve informacije koje sadrži X-matrica i da se napravi forma koja je jednostavnija za interpretaciju osobina objekata (molekula). PCA razlaže matricu varijabli na proizvod dve matrice:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP} + \mathbf{E}$$

**P** – matrica doprinosa („loading matrix“), sadrži informaciju o varijablama. Sastoji se iz nekoliko vektora koje zovemo glavnim komponentama i koji su dobijeni kao linearna kombinacija originalnih varijabli.

**T** – matrica skorova („score matrix“), sadrži informaciju o objektima. U ovoj matrici je svaki objekat (molekul) opisan u smislu njegovih projekcija na glavne komponente, umesto originalnih varijabli.

**E** – rezidualna matrica, predstavlja neobjašnjenu X varijansu. Ova matrica ima istu dimenzionalnost kao i originalna X-matrica.

PC imaju dve važne osobine; ekstrahovane su po opadajućem redosledu važnosti i međusobno su ortogonalne, odnosno potpuno nezavisne. Informacije o PCA modelu se dobijaju kao tablica ili kao grafik SSX i VarX. U tablici se nalaze sledeće informacije:

SSX: procenat zbira kvadrata X objašnjen odgovarajućom PC

SSXacc : akumulativni procenat zbira kvadrata X objašnjen odgovarajućom PC

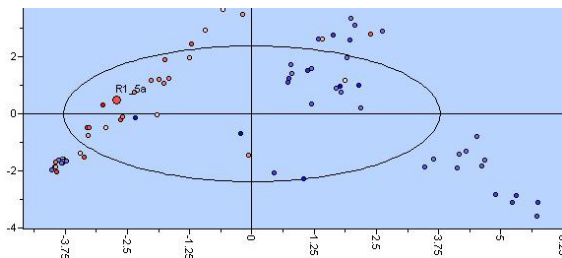
VarX: procenat varijanse X objašnjen odgovarajućom PC

VarXacc: akumulativni procenat varijanse X objašnjen odgovarajućom PC

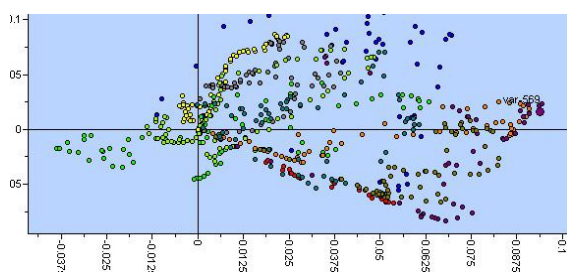
SSX i VarX predstavljaju istu informaciju, odn. koliko je kompletan opis X-matrice sa PC u modelu određene dimenzionalnosti. Po definiciji su SSX vrednosti više od VarX vrednosti jer je VarX dobijena iz SSX, s tim što je podeljena sa stepenima slobode. Obe vrednosti rastu sa dimenzionalnošću modela i približavaju se teorijskoj vrednosti 100.

Za interpretaciju PCA modela koriste se još dva tipa grafika: Grafik PCA skorova („PCA scores plot“, Slika 5) i grafik PCA doprinosa („PCA loadings plot“, Slika 6). Grafik PCA skorova odslikava relativne pozicije objekata u (konfiguracionom) prostoru glavnih komponenta. To je zapravo mapa u kojoj rastojanje između tačaka (molekuli) izražava sličnost, odnosno razlike između jedinjenja. Ovi grafici su korisni da se identifikuju grupe objekata, ili oni objekti (molekuli) čije osobine odstupaju od PCA modela („outliers“). Da bi videli koje se strukturne karakteristike nalaze iza ovih razlika treba videti grafik PCA doprinosa. Ovi grafici predstavljaju originalne varijable u prostoru glavnih komponenta, pri čemu varijable mogu biti predstavljene tačkama ili u obliku histograma. Doprinos varijable, predstavlja udeo određene varijable u PC, tj., ukazuje koliko varijabla doprinosi definisanju PC. Varijable koje malo doprinose PC imaju niske vrednosti i nalaze se oko centra dijagrama. Sa druge strane, varijable koje doprinose najviše PC se nalaze na ivicama dijagrama. Objekti na desnoj (pozitivnoj) strani grafika PCA skorova imaju varijable sa visokim pozitivnim vrednostima udela u PC, a objekti na levoj (negativnoj) strani PCA grafika imaju varijable sa visokim negativnim vrednostima doprinosa u PC („loadings“). Stoga, jednostavan način da razumemo PCA sa strukturne tačke gledišta jeste da odaberemo varijable sa najvećim negativnim intenzitetom i da izaberemo jedinjenja koja se nalaze najviše desno na dijagramu da

bi varijable, kao rastojanja između odgovarajućih nodova, povezali sa molekulima, a zatim to ponovimo za varijable sa najvećim pozitivnim intenzitetom. Tipično prva PC razdvaja jedinjenja prema veličini, druga na hidrofobna i hidrofilna itd.

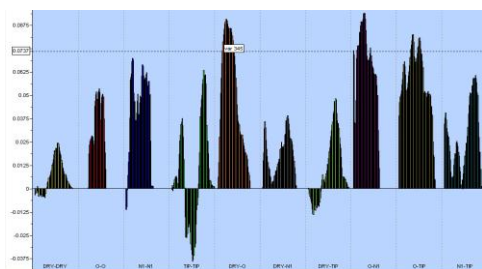


Slika 5. Grafik PCA skorova



Slika 6. PCA doprinosi originalnih varijabli,

a) Tačkasta reprezentacija



b) Histogram

### Regresija delimičnih najmanjih kvadrata

PLS Analiza je regresiona tehnika i njen cilj je da objasni jednu ili više zavisnih varijabli (Y) od prediktora, odnosno nezavisnih varijabli, X.

$$Y = f(X) + E$$

Važno je znati da Y vrednosti, kao i svaki drugi eksperimentalni rezultat sadrži grešku. Kao i u svakoj drugoj regresionoj tehnici model pokušava da pronađe  $f(X)$  tako da su predviđene vrednosti Y što bliže eksperimentalnim (fitovanje).

Prediktivna sposobnost modela pripisana je stvarnoj vezi između X-osobina (varijabli) i Y-merenih osobina. Iako su 3D-QSAR modeli grubi i nisu u mogućnosti u potpunosti da objasne

aktivnost molekula, oni su veoma korisni kada treba da objasne strukturne karakteristike koje najviše doprinose aktivnosti. Kod 3D-QSAR analize, X-matrica često sadrži više varijabli nego što ima objekata (molekula). U ovim slučajevima je klasična višestruka linearna regresija (MLR) potpuno nekorisna. Jedina pogodna regresiona tehnika koja može da da validan rezultat iz X-matrice koje se koriste u 3D-QSAR je PLS. Ova tehnika, kao i PCA razlaže X-matricu kao proizvod matrice doprinosa (**P**) i matrice skorova (**T**). PLS daje LV tako da ispunjavaju dva bitna uslova: one moraju da reprezentuju strukturu X-matrice i Y-matrice i moraju da obezbede maksimalno fitovanje između X i Y. Na kraju procesa PLS zadovoljava:

$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{W} + \mathbf{E}$ , X vrednosti su razložene na X-skorove (T) i doprinose (W) X-a.

$\mathbf{Y} = \mathbf{U}\mathbf{C} + \mathbf{F}$ , Y vrednosti su razložene na Y-skorove (U) i doprinose (C) X-a.

$\mathbf{U} = \mathbf{T} + \mathbf{H}$ , skorovi X korelisan sa Y skorovima (unutrašnja korelacija)

LV imaju dve važne karakteristike: 1) ekstrahovane su po opadajućem redosledu značaja, prva uvek sadrži više informacija od druge itd., i 2) LV su međusobno ortogonalne.

Informacije o dobijenom PLS modelu u programima ALMOND i Pentacle, takođe mogu biti predstavljene tabelarno ili grafički, a dobijaju se i sledeći statistički parametri:

SSX- procenat sume kvadrata X objašnjen sa LV

SSXacc- akumulativni procenat sume kvadrata X objašnjen sa LV

SDEC - standardna devijacija izračunavanja. Indeks fitovanja modela, što je niži to je bolji.

SDEP - standardna devijacija predviđanja. Indeks prediktivne sposobnosti modela, dobijen unakrsnom validacijom. Što je bliže SDEC-u, to je model bolji.

$R^2$  - doprinos LV koeficijentu korelacije modela ( $r^2$ )

$R^2_{acc}$  - akumulativni koeficijent korelacije ( $r^2$ ) modela. Indeks fitovanja modela. Što je bliži 1,00 to je model bolji.

$Q^2_{acc}$  je ekvivalentan sa  $r^2$ , ali je dobijen unakrsnom validacijom. Indeks prediktivne sposobnosti modela. Što je bliže  $r^2$  to je model bolji.

Najčešće su najvažnija dva statistička parametra:  $R^2_{acc}$ , indeks fitovanja modela koji pokazuje deo Y varijanse objašnjen modelom (što je bliže 1,00, to bolje); i  $Q^2_{acc}$ , indeks prediktivne sposobnosti modela, dobijen unakrsnom validacijom (što je bliže  $R^2_{acc}$ , to bolje). Vrednosti  $R^2$  i  $Q^2$  dozvoljavaju da odredimo da li je dobijen model dobrog kvaliteta kao i najbolju dimenzionalnost modela. Po pravilu, prihvatljiv 3D QSAR model treba da ima  $R^2$  iznad 0,8 i  $Q^2$  iznad 0,5. Što se tiče dimenzionalnosti modela odabira se onaj sa višim  $Q^2$ , ali je razumno odbaciti poslednje LV, ukoliko je povećanje  $R^2$  i  $Q^2$  malo (manje od 0,02). Statistički kvalitet modela se često može poboljšati FFD (fractional factorial design) tehnikom selekcije varijabli, ali to ne garantuje da će dobijeni model biti verodostojniji.

#### *Test prediktivne sposobnosti PLS modela*

Procena prediktivne sposobnosti modela je važna zbog broja LV koje treba zadržati u konačnom modelu i procene kvaliteta modela. Prediktivna sposobnost modela se obično procenjuje upotrebom unakrsne validacije (CV, cross-validation). Ova procedura funkcioniše tako što se formiraju redukovani modeli (modeli u kojima su neki od objekata uklonjeni) koji treba da predvide Y vrednosti za objekte koji su uklonjeni iz redukovanog modela. Zatim se predviđene, ( $Y'$ ) vrednosti porede sa eksperimentalnim Y vrednostima i izračunavaju se: SDEP, standardna devijacija greške predviđanja i  $Q^2$ , prediktivni korelacioni koeficijent.

CV tehnikom se dobija unutrašnja validacija, i procena prediktivne sposobnosti modela, bez upotrebe spoljnih setova podataka. Međutim, ne postoji opšta saglasnost oko toga po kom kriterijumu formirati redukovane grupe objekata i koliko objekata zadržati u redukovanom setu. Postoji više načina unakrsne validacije.

LOO (leave one out) redukovani modeli se tako prave da se u svakom ciklusu izostavlja samo po jedan objekat u toku analize i procedura se ponavlja dok svi objekti nisu po jednom izostavljeni.

LTO (leave two out) Modeli se grade tako što se izostavljaju po dva objekta i procedura se ponavlja sve dok svi objekti, u grupama po dva, nisu po jednom izostavljeni.

Nasumične grupe (Random groups), objekti se grupišu na nasumičan način u N grupa od kojih svaka sadrži jednak, ili približno jednak broj objekata, zatim se u svakom ciklusu po jedna

grupa izostavlja iz analize. Koliko će objekata biti u svakoj grupi odlučuje korisnik, a što je grupa izostavljenih objekata veća to je metod CV statistički validniji.

Izbor najpogodnijeg CV metoda, uvek zavisi od osobina setova podataka koji se koriste u QSAR analizi, u kojima su objekti često „klasterizovani“, tj. pripadaju određenom broju grupa sličnih molekula. U takvom slučaju statistički validnija CV će se dobiti ako se grupe formiraju tako da slični molekuli uvek budu u okviru iste grupe. Takođe, ako se koristi LOO i LTO većina informacija koje sadrže objekti ili parovi objekata koji su uklonjeni već se nalaze unutar modela, što daje preterano optimistične rezultate i SDEP se dobija na reproduktivan način. Drugi način da se postigne mnogo bolja procena realne prediktivne sposobnosti modela je upotreba metoda nasumičnih grupa. Drugim rečima dobijene  $Q^2_{acc}$  vrednosti su numerički niže, ali je sama prediktivnost pouzdanija. U ovom pristupu broj grupa treba da bude fiksiran na takav način da postoji realna mogućnost da kompletne grupe sličnih molekula budu uklonjene iz analize u redukovanom modelu. Takođe, proceduru treba ponoviti mnogo puta da bi se dobili stabilni rezultati.

Drugi način da se proceni prediktivnost modela jeste da se upotrebi eksterni set jedinjenja, odnosno set jedinjenja koja se ne nalaze u setu iz kojeg je model izveden.

#### *Problem selekcije varijabli*

Prilikom 3D-QSAR analize, obično se dešava da se veliki broj varijabli od ukupnog broja varijabli u X-matrici ne koreliše sa aktivnošću i doprinosi samo pojavi „šuma“ u opisu odnosa strukture i aktivnosti molekula. Međutim, bilo koja X-varijabla, iako ne doprinosi tome da se objasne Y varijable, sigurno doprinosi strukturi X-matrice. PLS metod nemože da nađe dobar model kada je jedna značajna varijabla sakrivena između mnogih drugih varijabli, čak i ako je značajna varijabla visoko korelisana sa Y. Jedno od mogućih rešenja ovog problema jeste da se ukloni set varijabli koje stvaraju šum, ali nije jednostavno definisati kriterijum niti metodologiju koja razlikuje šum od informacije. Jedna od procedura koja je razvijena da se prevaziđe ovaj problem je FFD („fractional factorial design“).

FFD je procedura za detektovanje varijabli koje povećavaju prediktivnost PLS modela. Ova procedura podrazumeva sledeće korake:

1. Dobijanje početnog PLS modela, pri čemu se izabere dimenzionalnost koja daje najprediktivniji model.
2. Pravljenje 'dizajn' matrice i procena individualanog doprinosa svake varijable prediktivnoj sposobnosti modela.
3. Uklonjanje iz X-matrice varijabli koje ne doprinose prediktivnoj sposobnosti modela.

U drugom koraku FFD stvara veliki broj redukovanih modela, sličnih početnom modelu, ali uklanja neke varijable. Prediktivna sposobnost svakog modela procenjuje se upotrebom CV i iz ovih vrednosti FFD povezuje prediktivnost modela sa prisustvom ili odsustvom svake X-varijable. U ovom koraku jedan od glavnih problema jeste naći najefikasniji način da se proceni individualni efekat svake varijable prediktivnoj sposobnosti modela. Strategija koju koristi FFD jeste da se napravi „dizajn matrica“ sledeći FFD šemu. U ovoj matrici svaka kombinacija varijabli iz koje je napravljen redukovani PLS model i mereni odgovor, daje izračunatu prediktivnost redukovanog modela. Matrica sadrži onoliko kolona koliko ima varijabli u X-matrici koje mogu da imaju vrednost + što znači da se u ovoj kombinaciji određena varijabla koristi, ili –, odnosno određena varijabla se ne koristi. Kada se dobije N redukovanih modela i SDEP izračunato za svaki od njih, moguće je izračunati kako prisustvo ili odsustvo date varijable utiče na SDEP vrednost i stoga prediktivnost krajnjeg modela.

$E = (SDEP_+ - SDEP_-)$ , efekat varijable na prediktivnost modela

$SDEP_+$ , prosek SDEP za sve modele koji uključuju datu varijablu

$SDEP_-$ , prosek SDEP za sve modele koji isključuju datu varijablu

Da bi se mogućnost odabira beznačajnih varijabli kao relevantnih svela na minimum, FFD procedura uvodi u dizajn matricu neke veštačke („dummy“) varijable, kojih nema u X-matrici. Efekat ovih varijabli (V) se poredi sa efektom realnih varijabli na osnovu studentovog  $t$  testa na 95% nivou pouzdanosti. Efekat svake realne varijable (E) se poredi sa prosečnim efektom veštačke varijable, na osnovu čega se varijable označavaju kao nesigurne, fiksirane i isključene.

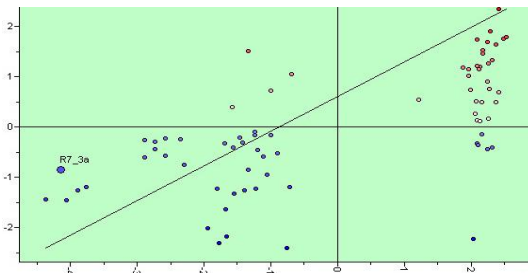
$E < V$ , nesigurna varijabla

$E > V$  i  $E < 0$ , fiksirana varijabla, smanjuje SDEP

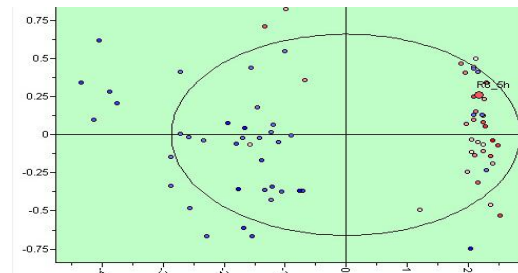
$E < V$  i  $E > 0$ , isključene varijabla, povećava SDEP

### Interpretacija PLS modela

2D TU Grafik (Slika. 7a): Ovaj grafik predstavljaju objekte u prostoru X-skorova (T) nasuprot Y-skorovima (U). Iz ovog dijagrama može se steći jasna ideja o korelaciji između X i Y koju daje model za svaku LV. Grafik za prvu latentnu varijablu daje najviše informacija i pokazuje odnos između aktivnosti i strukturnih deskriptora. Takođe, dijagram je koristan da se identifikuju objekti koji imaju veliki uticaj na model i/ili objekti koji su grupisani. Grafici PLS skorova (Slika. 7b) predstavljaju mapu u prostoru latentnih varijabli kojim su jedinjenja opisana gde njihovo međusobno rastojanje odražava strukturne sličnosti i razlike. Grafik pokazuje i elipsu koja odgovara intervalu 95 % pouzdanosti. Objekti izvan ove elipse odstupaju od pravilnosti dobijene za dve LV za koje je grafik napravljen, odnosno dve upotrebljene LV ne klasifikuju dovoljno pouzdano objekte van elipse.



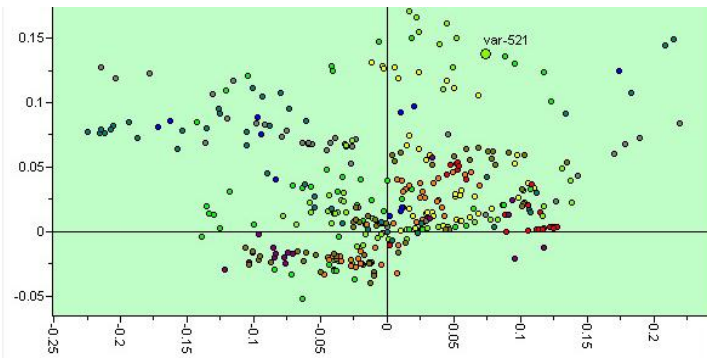
Slika 7. a) PLS grafik (TU garfik)



Slika 7. b) PLS skorovi

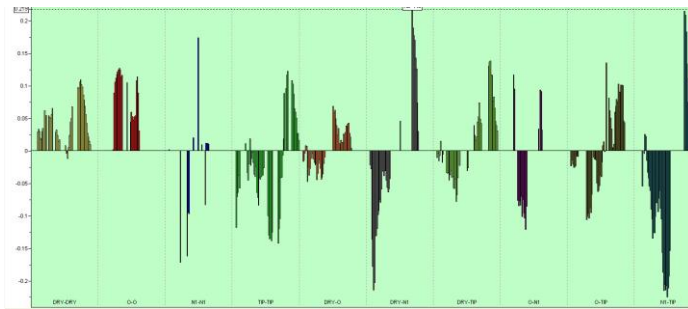
2D grafici doprinosa originalnih varijabli latentnoj varijabli („loading plots“) (Slika 8), predstavljaju originalne varijable u prostoru latentnih varijabli. LV su dobijene kao linearna kombinacija originalnih varijabli. Doprinos svake varijable pokazuje meru „učesća“ te varijable u LV. Varijable koje veoma malo doprinose LV imaju niske vrednosti doprinosa i nalaze se u centru dijagrama. Varijable koje najviše doprinose modelu nalaze se na granicama dijagrama. Kao i kod PCA modela varijable mogu biti predstavljene tačkama ili u obliku histograma.





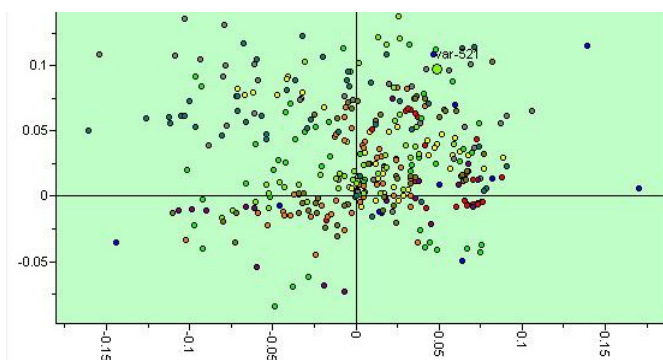
**Slika 8.** Grafik doprinosa originalnih varijabli LV.

a) tačkasta reprezentacija



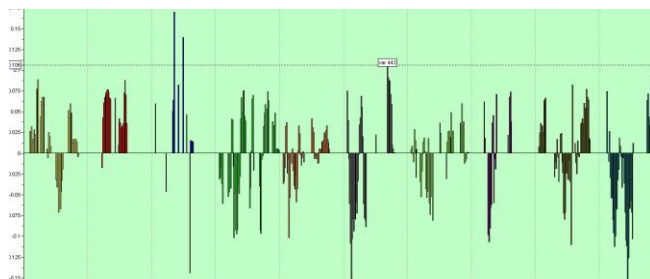
b) histogram

2D grafici udela („weights plots“) (Slika 9), predstavljaju udeo originalnih varijabli PLS modelu. Udeli predstavljaju koeficijente kojima se množe pojedinačne originalne varijable (X) tako da se maksimalno fituju sa Y. Ovi grafici pokazuju zapravo koliko originalne varijable doprinose ukupnom modelu. Varijable sa visokim vrednostima udela imaju veći doprinos, dok varijable sa niskim vrednostima (nalaze se u centru dijagrama) imaju manji i manje značajan doprinos.



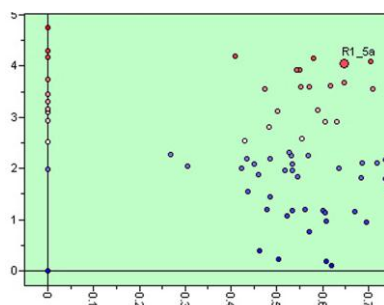
**Slika 9.** Grafik PLS udela.

a) tačkasta reprezentacija



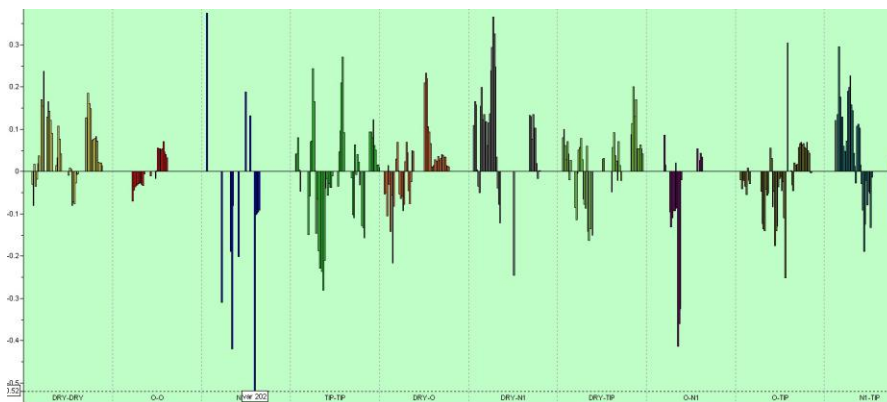
b) histogram

Grafik izabrane varijable X u zavisnosti od Y, („VarX selected-Y“, Slika. 10), prikazuje kako se određena originalna varijabla koreliše sa biološkom aktivnošću jedinjenja, odnosno za koja jedinjenja u ispitivanom setu ima vrednost  $> 0$ , i koliki je intenzitet te varijable za određeno jedinjenje.



**Slika 10.** Grafik koji pokazuje intenzitet izabrane varijable za svako jedinjenja u setu, za izabrani broj LV u PLS modelu.

Grafik PLS koeficijenata (Slika 11), je najinformativniji što se tiče interpretacije rezultata. Korisno je istovremeno posmatrati korelogram i grafik PLS koeficijenata. Varijable sa velikim pozitivnim doprinosom identifikuju strukturne karakteristike koje su prisutne u većini aktivnih jedinjenja. Ove varijable se vide u korelogramu (Sl. 4b) kao trake gde plave i crvene tačke nisu izmešane (slično i u hitmapama programa Pentacle) i gde se crvene tačke nalaze iznad plavih tačaka. Varijable koje imaju visok negativan doprinos, su obično prisutne kod većine neaktivnih jedinjenja.



**Slika 11.** Grafik PLS koeficijenata

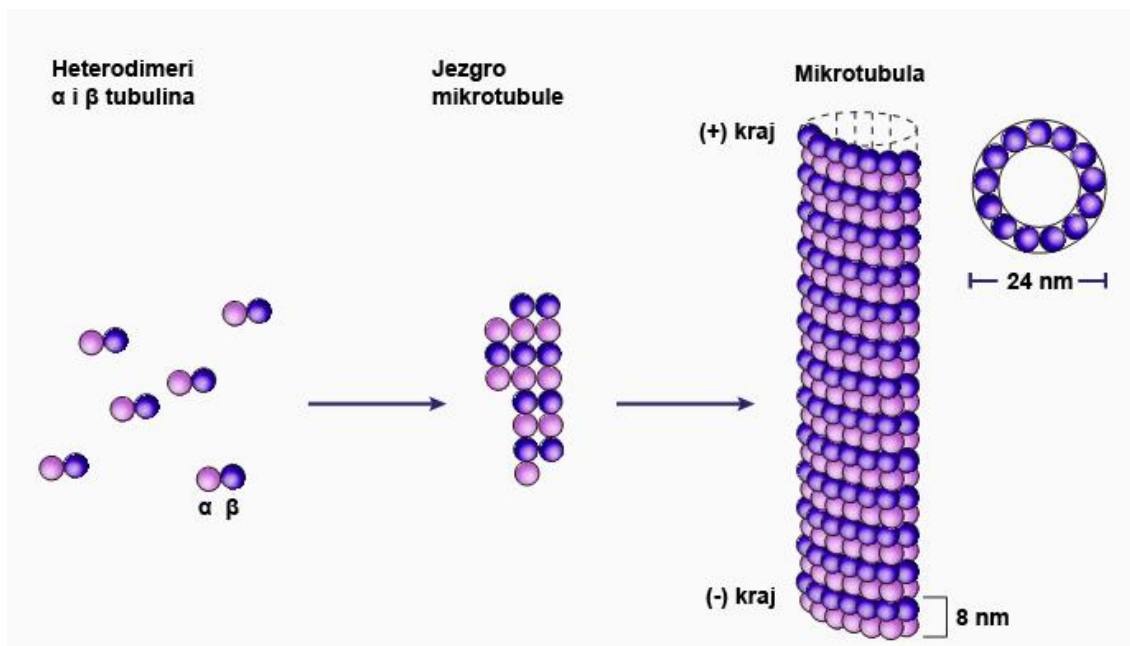
Na kraju procesa 3D-QSAR analize identifikovane značajne varijable predstavljaju parove nodova koji pokazuju kakav je međusobni odnos funkcionalnih grupa molekula u okviru ispitivanog seta povoljan za njihovu biološku aktivnost. Ove informacije se najčešće transformišu u set hipoteza koje mogu biti korisne za dizajn novih jedinjenja ili racionalizaciju rezultata (kao što je opisano u rezultatima i diskusiji).

## 2.3. Biološke mete relevantne za amide aroilakrilnih kiselina i njihove derivate

### 2.3.1. Mikrotubule i tubulin

#### 2.3.1.1. *Struktura i fiziološka uloga mikrotubula*

Mikrotubule su ključne komponente citoskeleta. Imaju suštinski značaj za razvoj i održavanje ćelijskog oblika, transport vezikula, mitohondrija i drugih komponenata unutar ćelije, ćelijsku signalizaciju i proces ćelijske deobe. Mikrotubule se sastoje od heterodimera  $\alpha$  i  $\beta$  tubulina (dimenzija 4 nm x 5 nm x 8 nm i mase od oko 100 000 Da) koji formiraju relativno tanke (prečnika 24 nm) vlaknaste cevčice koje mogu biti duge i do nekoliko mikrometara. Heterodimeri  $\alpha, \beta$ -tubulina se povezuju u orijentaciji glava-rep (tj.  $\beta$  subjedinica jednog heterodimera interaguje sa  $\alpha$ -subjedinicom narednog heterodimera), tako da formiraju protofilamente mikrotubula. Mikrotubule se sastoje od 9 ili 16 paralelno orijentisanih protofilamenata (Slika 12), koji se međusobno povezuju tako da formiraju cevaste strukture. Mikrotubule interaguju sa brojnim proteinima u ćeliji (tzv. MAP – microtubule associated proteins) kao što su motorički proteini dinein i kinezin, regulatorni proteini survivin i statmin, TOG, MCAK, MAP4, EB1, dinaktin-1, RAC1 i FHIT.<sup>132</sup> Neki od ovih proteina ispoljavaju stabilizujuće a neki destabilizujuće dejstvo na mikrotubule, dok neki omogućavaju transport različitih molekula duž mikrotubula. Mikrotubule su naročito važne u procesu ćelijske deobe – mitoze, tokom koje se duplirani hromozomi odvajaju u dva identična seta pre razdvajanja ćelije na dve ćerke-ćelije. Značaj mikrotubula u ćelijskoj deobi čini ih važnom biološkom metom za razvoj lekova za lečenje malignih oboljenja.



Slika 12. Struktura mikrotubula

Biološka uloga mikrotubula u ćeliji je određena i regulisana pre svega njihovom dinamikom polimerizacije.<sup>133</sup> Mikrotubule pokazuju dva tipa neravnotežne dinamike u ćeliji, i u *in vitro* sistemima prečišćenih mikrotubula. Jedan od tipova dinamičkog ponašanja koji je naročito uočljiv u ćelijama jeste „dinamička nestabilnost“. To je proces u kojem krajevi mikrotubula smenjuju faze rasta i skraćivanja, odnosno prolaze kroz faze polimerizacije tubulina i faze njegove depolimerizacije.<sup>134</sup> Dva kraja mikrotubule nisu kinetički ekvivalentni: jedan kraj, koji se naziva „plus kraj“ raste i skraćuje se znatno brže i u većem obimu od drugog – „minus kraja“. Kod plus kraja,  $\beta$ -subjedinica je izložena spoljašnjoj sredini (citosol, rastvarač), dok je kod minus kraja izložena  $\alpha$ -subjedinica. Mikrotubule prolaze kroz relativno duge periode sporog produžavanja, kratke periode brzog skraćivanja, kao i periode pauze, kada ne dolazi do vidljivog skraćivanja ili produžavanja. Dinamička nestabilnost je karakterisana sa četiri varijable: brzinom rasta, brzinom skraćivanja, frekvencijom prelaza iz faze rasta ili faze pauze u fazu skraćivanja (ovaj događaj se naziva „katastrofa“) i frekvencijom prelaza iz faze skraćivanja u fazu pauze ili rasta (ovaj događaj se naziva „spašavanje“).

Drugi tip dinamičkog ponašanja mikrotubula jeste „mrvljenje“ (threadmilling), to je ukupan rast na jednom kraju mikrotubule i izbalansirano ukupno skraćivanje na suprotnom kraju

mikrotubule.<sup>135</sup> Ovaj proces obuhvata unutrašnji protok subjedinica tubulina od plus kraja ka minus kraju mikrotubule, i nastaje usled razlika u kritičnim koncentracijama subjedinica na suprotnim krajevima mikrotubula. Kritične koncentracije subjedinica jesu koncentracije slobodnog tubulina koji se nalazi u ravnoteži sa tubulinom vezanim za (+) ili (-) kraj mikrotubula. Ovo ponašanje može se uočiti u ćeliji ali i *in vitro*, i predpostavlja se da je veoma važno za proces mitoze.<sup>136</sup> Threadmilling i dinamička nestabilnost su kompatibilna ponašanja, i specifična populacija mikrotubula može primarno da ispoljava threadmilling, ili dinamičku nestabilnost, ili neku vrstu kombinacije ova dva dinamička efekta. Mehanizmi koji kontrolišu stepen u kojem određena populacija mikrotubula pokazuje jedan ili drugi tip dinamičkih efekata su malo poznati, ali predpostavlja se da obuhvataju izotipski sastav populacije mikrotubula, stepen posttranslacionih modifikacija tubulina i dejstvo regulatornih proteina.<sup>137</sup>

Dinamika polimerizacije mikrotubula je neuobičajena u poređenju sa većinom polimera u prirodi. Ona se ostvaruje asocijacijom, odnosno, disocijacijom kratkog regiona (verovatno ne većeg od jednog sloja subjedinica tubulina) GTP-tubulin odnosno  $P_i$ -GDP-tubulin-kompleksa na krajevima mikrotubula koji se naziva GTP kapa. Tokom procesa polimerizacije kompleks tubulin-GTP se ugrađuje u protofilament mikrotubula. Nakon vezivanja tubulina za mikrotubulu dolazi do hidrolize GTP-a na GDP i  $P_i$ . Međutim, disocijacija  $P_i$  od tubulina nije trenutna, tako da nakon polimerizacije na mikrotubuli postoji kapa koju čini sloj tubulin-GTP ili tubulin-GDP- $P_i$  kompleksa. Predpostavljeno je da se kompleks GTP-tubulin polimerizuje u protofilamente koji imaju izduženu konformaciju, ali usled hidrolize GTP-a, i disocijacije neorganskog fosfata, konformacija tubulina se menja u blago zakrivljenu, tako da je kompleks GDP-tubulina zaključan u tzv. „napetoj konformaciji“. Kada je na krajevima mikrotubule vezan kompleks GTP-a ili GDP- $P_i$  kapa, jedan kraj mikrotubule je stabilizovan i može da raste.<sup>138</sup> Kada se kapa odvoji od mikrotubule, relativno nestabilno jezgro mikrotubule je izloženo citosolu i ona se veoma brzo skraćuje (depolimerizuje). Precizna priroda i tip interakcija stabilizujuće kape sa ostatkom mikrotubule su malo poznati i predmet su intenzivnih istraživanja.<sup>139</sup> Takođe, izgleda izvesno da najmanje dva seta konstanti brzina asocijacije i disocijacije utiču na vezivanje tubulina za svaki kraj mikrotubule – set konstanti koji se odnosi na procese stabilizovanja mikrotubula u kojima je vezana kapa i set konstanti koji se odnosi na procese destabilizovanja mikrotubule u kojima se ona uklanja. Promena bilo koje od ovih

konstanti brzina, usled vezivanja malih molekula ili regulatornih proteina, ima izražen efekat na dinamiku polimerizacije i na funkciju mikrotubula.<sup>140</sup>

#### *Važnost dinamičkog ponašanja mikrotubula za proces mitoze*

Sa razvojem sofisticiranih metoda za opažanje procesa dinamičkog ponašanja mikrotubula u ćelijama, postalo je moguće pratiti i dinamiku mikrotubula koje čine deobno vreteno u procesu mitoze. Iz ovih eksperimenata postalo je jasno da mikrotubule deobnog vretena ispoljavaju jedinstveno, veoma brzo dinamičko ponašanje, koje je ključno za uspešnu mitozu.<sup>141</sup> Tokom interfaze ćelijskog ciklusa brzina razmene tubulina u mikrotubulama sa pulom rastvornog, slobodnog tubulina u citosolu je relativno spora, sa poluvremenom života u opsegu od nekoliko minuta do nekoliko sati.<sup>142</sup> Mreža mikrotubula u interfazi se razlaže kada započne proces mitoze i zamenjuje se novom populacijom mikrotubula deobnog vretena, čija je dinamika 4 do 100 puta brža od dinamike mikrotubula koje čine citoskelet u interfazi ćelijskog ciklusa.<sup>143</sup> Iako postoje varijacije između različitih populacija mikrotubula deobnog vretena, vreme izmene tubulina vezanog za mikrotubule sa rastvorenim tubulinom, kod mikrotubula deobnog vretena se odvija veoma brzo, sa poluvremenom koje iznosi 10-30 sekundi. Zapaženo je da kod nekih ćelija ubrzanje dinamičkih procesa potiče pre od povećanja frekvencije događaja katastrofe, i smanjenja frekvencije događaja spašavanja, nego od promena inherentnih konstanti brzina polimerizacije i depolimerizacije (tj. produžavanja i skraćanja).

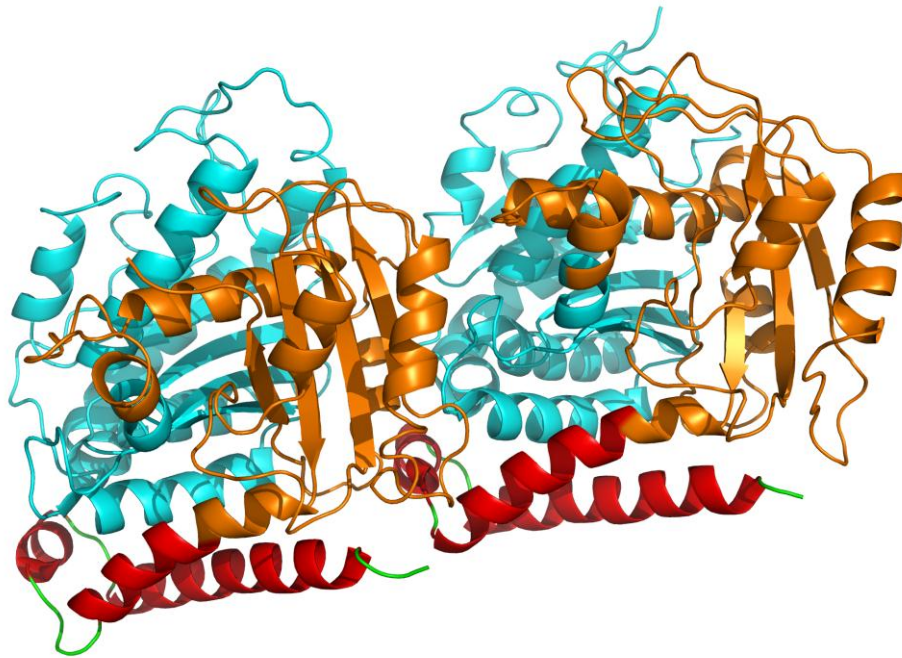
Mitoza se u ćeliji odvija veoma brzo, i veoma dinamične mikrotubule, koje čine deobno vreteno, su neophodne u sledećim fazama ćelijske deobe: (a) za vremenski i prostorno precizno vezivanje hromozoma preko njihovih kinetohora za deobno vreteno, tokom prometafaze, nakon razlaganja jedarne membrane; (b) za kompleksno kretanje hromozoma koje ih dovodi u poseban međusoban raspored na metafaznoj ploči (kongresija); (c) za sinhrono razdvajanje hromozoma u anafazi i telofazi nakon kontrolne tačke posle metafaze/anafaze. Tokom prometafaze, mikrotubule koje potiču od svakog pola deobnog vretena veoma brzo rastu i skraćuju se, "pretražujući" citoplazmu sve dok ne pronađu i ne povežu se sa hromozomima preko njihovih kinetohora.<sup>144</sup> Ovakve mikrotubule moraju da imaju sposobnost da rastu do velikih rastojanja (tipično 5-10  $\mu\text{m}$ ) i da se zatim skrate skoro u potpunosti, te opet polimerizuju, sve dok se uspešno ne povežu sa hromozomima. Prisustvo makar jednog

hromozoma koji nije postigao bipolarno povezivanje za mikrotubule deobnog vretena je dovoljno da spreči prelazak ćelije u anafazu, zbog čega ona ostaje blokirana u prometafazi/metafazi i u krajnjem ishodu dolazi do apoptoze (programirane ćelijske smrti).<sup>145</sup>

### *Struktura heterodimera $\alpha$ i $\beta$ tubulina*

Struktura tubulina je prvobitno određena elektronskom kristalografijom.<sup>146</sup> Kod ovih struktura,  $\alpha$ - i  $\beta$ - tubulin imaju identične osnovne strukturne elemente: svaki monomer se sastoji od jezgra koje ima dve  $\beta$ -nabrane pločice okružene  $\alpha$ -heliksima. Monomeri imaju kompaktnu strukturu kod koje se mogu razlikovati tri funkcionalna domena: amino-terminalni domen koji sadrži vezivno mesto za GTP, intermedijarni domen (za koji se vezuju taksani) i karboksi-terminalni domen koji sadrži vezivno mesto za motorne proteine. Ovaj model, rezolucije 6,5 Å, dobijen na osnovu elektronske kristalografije kasnije je poboljšan upotrebom klasične kristalografije zasnovane na difrakciji X-zraka (Slika 13).<sup>147</sup> Oba monomera tubulina sadrže skoro identične strukturne elemente. N-terminalni domen (aminokiselinski ostaci 1-206), za koji se vezuje GTP, sastoji se iz šest  $\beta$ -nabranih pločica (S1-S6) koje se smenjuju sa šest  $\alpha$ -heliksa (H1-H6). Peptidne petlje koje spajaju  $\beta$ -nabrane pločice i helikse (T1-T6) su direktno uključene u vezivanje GTP-a. Središnji deo obuhvata aminokiselinske ostatke 207-384, i sadrži tri heliksa (H8-H10) i mešovite  $\beta$ -nabrane strukture (S7-S10). Heliks H7 povezuje N-terminalni domen sa intermedijarnim domenom. C-terminalni domen formiraju dva antiparalelna heliksa H11 i H12 koji se ukrštaju sa dva prethodna domena. Vezivno mesto GTP-a u  $\alpha$ -subjedinici se označava kao E-mesto, a u  $\beta$ -subjedinici kao N-mesto. N-vezivno mesto za GTP na  $\alpha$ -tubulinu se nalazi blizu interfejsa dve jedinice, dok se N-mesto nalazi na površini heterodimera. Ovo objašnjava mogućnost razmene GTP-a koji se nalazi u N-mestu, kao i zašto nije moguća razmena GTP-a koji se nalazi u E-mestu.





**Slika 13.** Strukturni elementi tubulina: N-terminalni domen (obojen tirkizno), intermedijerni domen (obojen narandžasto) i C-terminalni domen (obojen crveno).

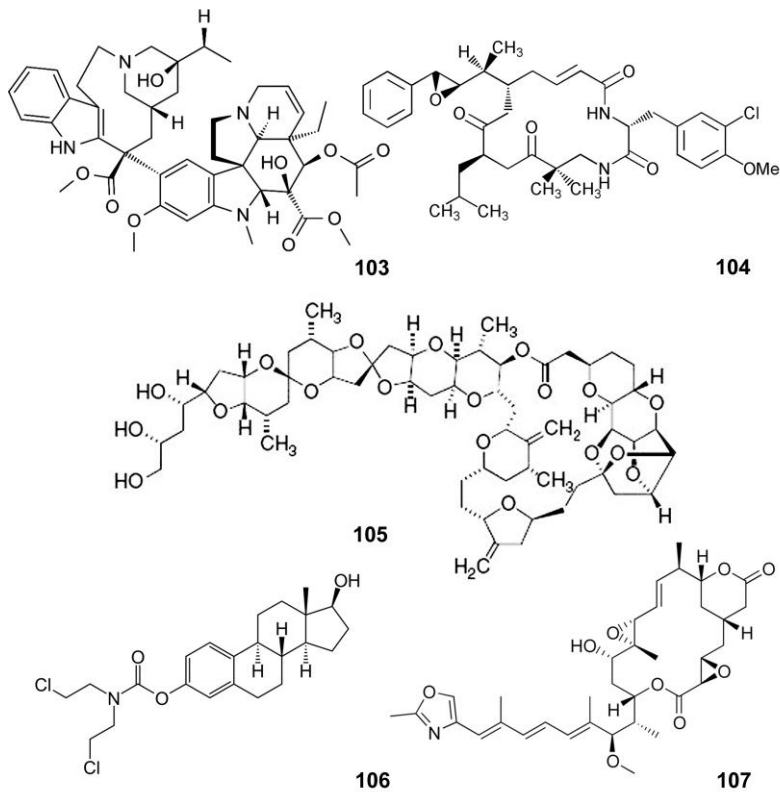
*Longitudinalne i lateralne (uzdužne i bočne) interakcije heterodimera tubulina u mikrotubulama*

Longitudinalne interakcije predstavljaju interakcije između heterodimera tubulina u protofilamentu mikrotubula i obuhvataju interakcije  $\beta$ -tubulina jednog heterodimera sa  $\alpha$ -tubulinom narednog heterodimera. Ovaj model interakcija dobijen je dokingom heterodimera tubulina u kristalnu strukturu mikrotubula.<sup>148</sup> Nađeno je da su intradimerni i interdimerni kontakti topološki veoma slični i uključuju ekvivalentne strukturne elemente na  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulinu. Ukupna površina kontakta obuhvata oko 3000 Å<sup>2</sup>. U interakcijama postoje hidrofobni i polarni kontakti. Mogu se definisati tri glavne zone kontakata. Zona A, bliža je spoljašnjoj površini mikrotubule i uključuje interakciju H10-S9 petlje intermedijarnog domena jednog monomera sa H11 i petljom T5 drugog monomera. H10 takođe interaguje sa H6 i H6-H7 petljom prethodnog monomera. Zona B uključuje interakciju H8 sa petljama T5 i T3 N-terminalnog kraja i petljom H11-H12 sledećeg monomera. Zona C nalazi se blizu lumena (unutrašnjeg zida) mikrotubule i obuhvata interakciju petlje T7 sa GTP-om i elementima T1, H2 i H7 prethodnog monomera.

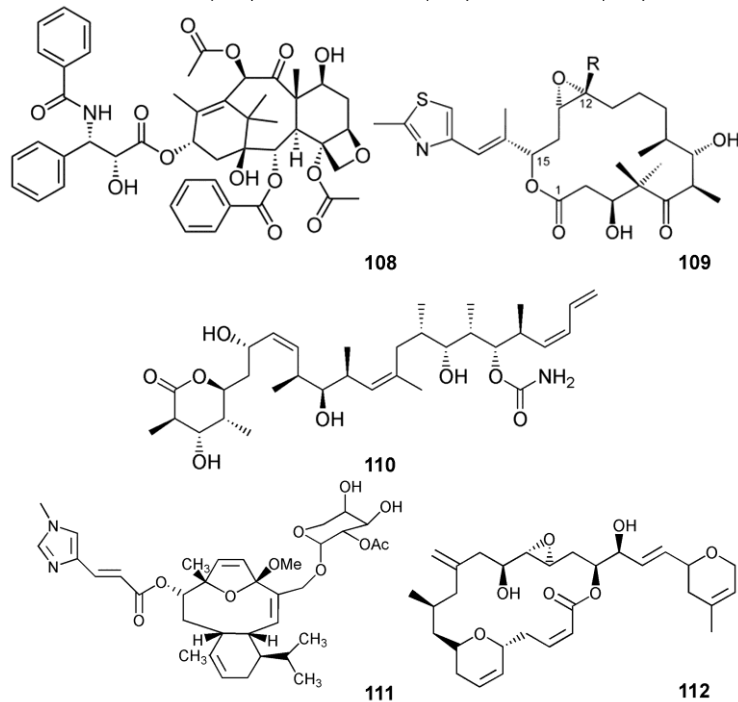
Lateralne interakcije su interakcije između monomera tubulina koji pripadaju različitim protofilamentima, u kojima međusobno interaguju identični monomeri, tj.  $\alpha$ -subjedinica unutar jednog protofilamenta interaguje sa  $\alpha$ -subjedinicom susednog protofilamenta (isto važi i za  $\beta$  subjedinice). Ustanovljeno je da su kontakti između subjedinica  $\alpha$ -tubulina identični onima između subjedinica  $\beta$ -tubulina. Ključne interakcije lateralnih kontakata obuhvataju M-petlju (petlja između S7 i H9) jedne subjedinice sa petljom H1-S2 i helksom H3 susedne subjedinice. Priroda ovih interakcija je prevashodno elektrostatička. Iako elektrostatičke po prirodi, lateralne interakcije su znatno slabije od longitudinalnih.

### 2.3.1.2 Antimitotski agensi

Veliki broj strukturno različitih malih molekula se vezuje za rastvorni tubulin ili za tubulin u mikrotubulama. Većina ovih jedinjenja su antimitotski agensi i inhibiraju proliferaciju ćelija, delujući na dinamiku polimerizacije mikrotubula deobnog vretena. Specifični efekti pojedinih antimitotskih agenasa na veličinu polimera (odn. ukupnu masu) mikrotubula kao i na njihovu stabilnost i dinamiku su kompleksni, ali uobičajena je klasifikacija ovih jedinjenja u dve grupe. U prvu grupu spadaju tzv. destabilizatori mikrotubula, koji u visokim koncentracijama inhibiraju polimerizaciju mikrotubula. U ovu grupu spadaju: Vinka alkaloidi (vinblastin, vinkristin, vinorelbin, vindesin i vinflunin), kriptoficini, halihondrini, estramustini, kolhicin, kombretastatin i njegovi analozi (Shema 39). Neka od ovih jedinjenja se koriste u kliničkoj praksi a neka od njih se nalaze u fazi kliničkih ispitivanja za tretman malignih oboljenja. Ova grupa uključuje i veliki broj jedinjenja koja nisu ušla u kliničku upotrebu: noskapin, majtanzin, rizoksin, spongistatini, podofilotoksini, steganacini i kurasini.<sup>149</sup> Drugoj grupi pripadaju jedinjenja koja se smatraju stabilizatorima mikrotubula. Ova jedinjenja stimulišu polimerizaciju mikrotubula i to su taksani (paklitaksel, docetaksel), epotiloni, diskodermolidi, eleuterobini, laulimalid, neki od steroida i poliizoprenilovani benzofenoni (Shema 40).<sup>150</sup>



**Shema 39.** Jedinjenja koja destabilizuju mikrotubule: Vinblastin (103), Kriptoficin (104), Halihondrin (105), Estramustin (106), Rizoksin (107).



**Shema 40.** Jedinjenja koja stabilizuju mikrotubule: Taksol (108), Epotilon (109), Diskodermolid (110), Eleuterobin (111), Laulimalid (112).

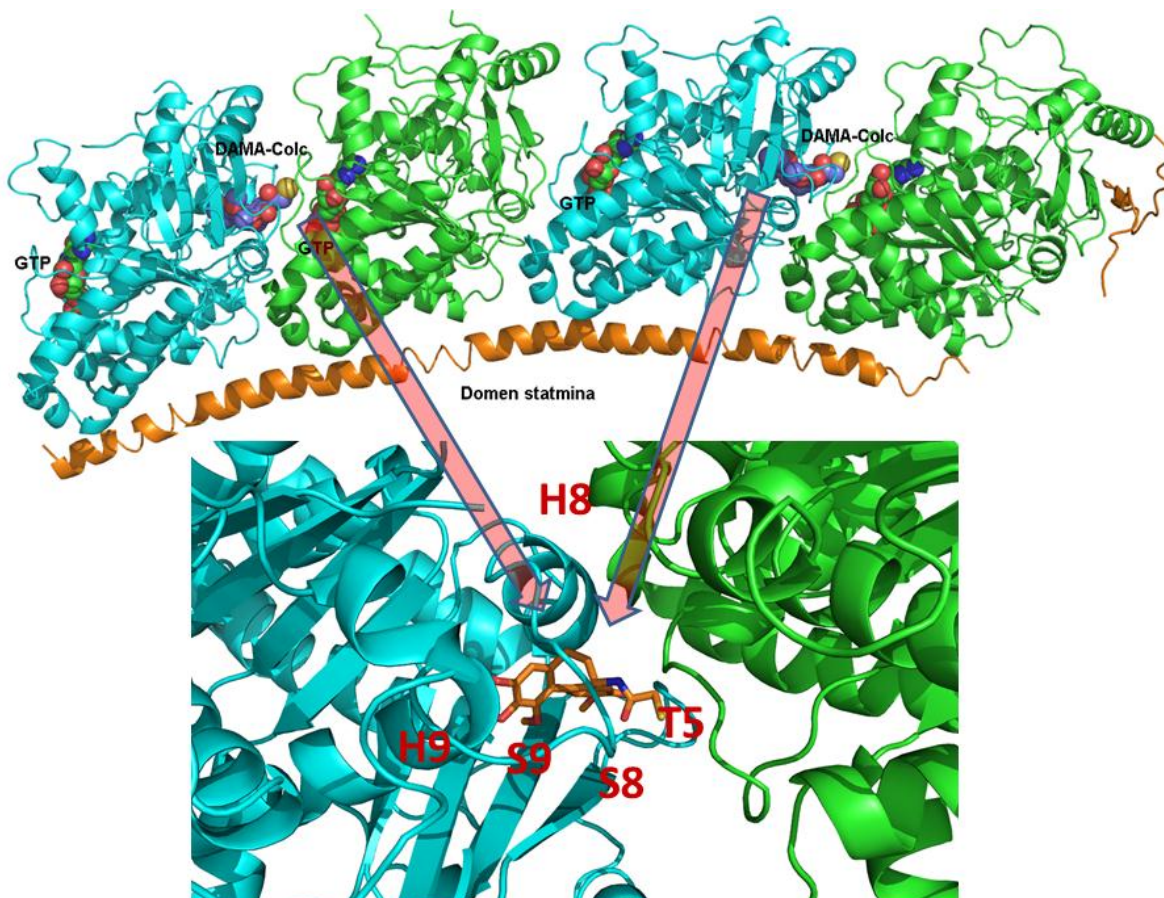
Podela antimitotskih agenasa na stabilizatore i destabilizatore mikrotubula se može smatrati kao preterano pojednostavljena i u nekim slučajevima može dovesti do zabune. Razlog za ovo leži u činjenici da jedinjenja koja nezavisno od toga da li na visokim koncentracijama inhibiraju ili stimulišu polimerizaciju mikrotubula, suzbijaju njihovu dinamiku na 10 do 100 puta nižim koncentracijama i na taj način kinetički stabilizuju mikrotubule bez promene u veličini (odnosno ukupnoj masi) polimera mikrotubula. Drugim rečima, efekti ovih jedinjenja koje ispoljavaju na dinamiku mikrotubula su često mnogo izraženiji od efekata koje ispoljavaju u odnosu na veličinu (ukupnu masu) polimera. Prethodno se smatralo da su efekti jedinjenja kojima utiču na masu samih mikrotubula najvažniji način dejstva, čija je posledica antiproliferativna aktivnost. Sada se pretpostavlja da je najvažniji način dejstva ovih jedinjenja ustvari supresija same dinamike mikrotubula deobnog vretena, što rezultuje usporavanjem ili zaustavljanjem mitoze na prelazu iz metafaze u anafazu i indukcijom apoptoze. Antimitotski agensi mogu uticati na dinamiku mikrotubula na nekoliko različitih načina. Da bi se suzbilo dinamičko ponašanje mikrotubula, jedinjenja se moraju vezivati direktno za tubulin u mikrotubulama. Međutim, mnoga jedinjenja se takođe vezuju i za rastvorni, slobodni tubulin u citosolu. Prema tome, sposobnost jedinjenja da se vezuje za rastvorni tubulin ili direktno za mikrotubule kao i za specifično mesto vezivanja na samom tubulinu ili mikrotubulama, značajno određuje uticaj na ukupno dinamičko ponašanje mikrotubula.

### *2.3.1.3 Mehanizam antimitotskog dejstva kolhicina i njegovih strukturnih analoga*

Kolhicin se koristio u kliničkoj praksi za lečenje gihta i nekih autoimunih oboljenja.<sup>151</sup> Međutim, ni kolhicin ni jedinjenja koja se vezuju za kolhicinsko vezivno mesto na tubulinu nisu ušla u upotrebu za terapiju malignih oboljenja, pre svega zbog njihove toksičnosti. Nekoliko jedinjenja koja se vezuju za kolhicinsko mesto (većina od njih je izvedena iz prirodnih proizvoda, kao što su na primer kombretastatini) su u fazi kliničkih ispitivanja za tretman malignih oboljenja. Kolhicin depolimerizuje mikrotubule na visokim koncentracijama ( $> 0,05 \mu\text{M}$ ) a stabilizuje, tj. supresuje dinamiku mikrotubula na nižim koncentracijama ( $0,02-0,05 \mu\text{M}$ ). Kolhicin depolimerizuje mikrotubule u substehiometrijskim koncentracijama (koncentracije znatno niže od koncentracija slobodnog tubulina u rastvoru) Međutim, pretpostavlja se da se kolhicin ne vezuje direktno za krajeve mikrotubula. Umesto toga, kolhicin se vezuje prvo za slobodan, rastvorni tubulin, indukuje spore konformacione promene u tubulinu i konačno

formira slabo reverzibilan konačni kompleks sa tubulinom (TC-kompleks), koji se zatim vezuje za krajeve mikrotubula zajedno sa velikim brojem neinhibiranih molekula tubulina. Krajevi mikrotubula mogu dalje da rastu, ali je njihova dinamika usporena.<sup>152</sup> Pretpostavlja se da TC-kompleks ima konformaciju koja narušava strukturu mikrotubula na način koji usporava, ali ne sprečava dalje vezivanje molekula tubulina. Takođe, pretpostavlja se i da se TC-kompleks vezuje za susedne molekule tubulina u mikrotubulama nešto snažnije od slobodnog, neinhibiranog tubulina, tako da je brzina disocijacije tubulina nešto sporija. Nađeno je da TC-kompleks snižava frekvenciju događaja katastrofe i povećava frekvenciju događaja spašavanja i na ovaj način moduliše proces vezivanja i disocijacije GTP ili GDP-P<sub>i</sub> kape za mikrotubule.

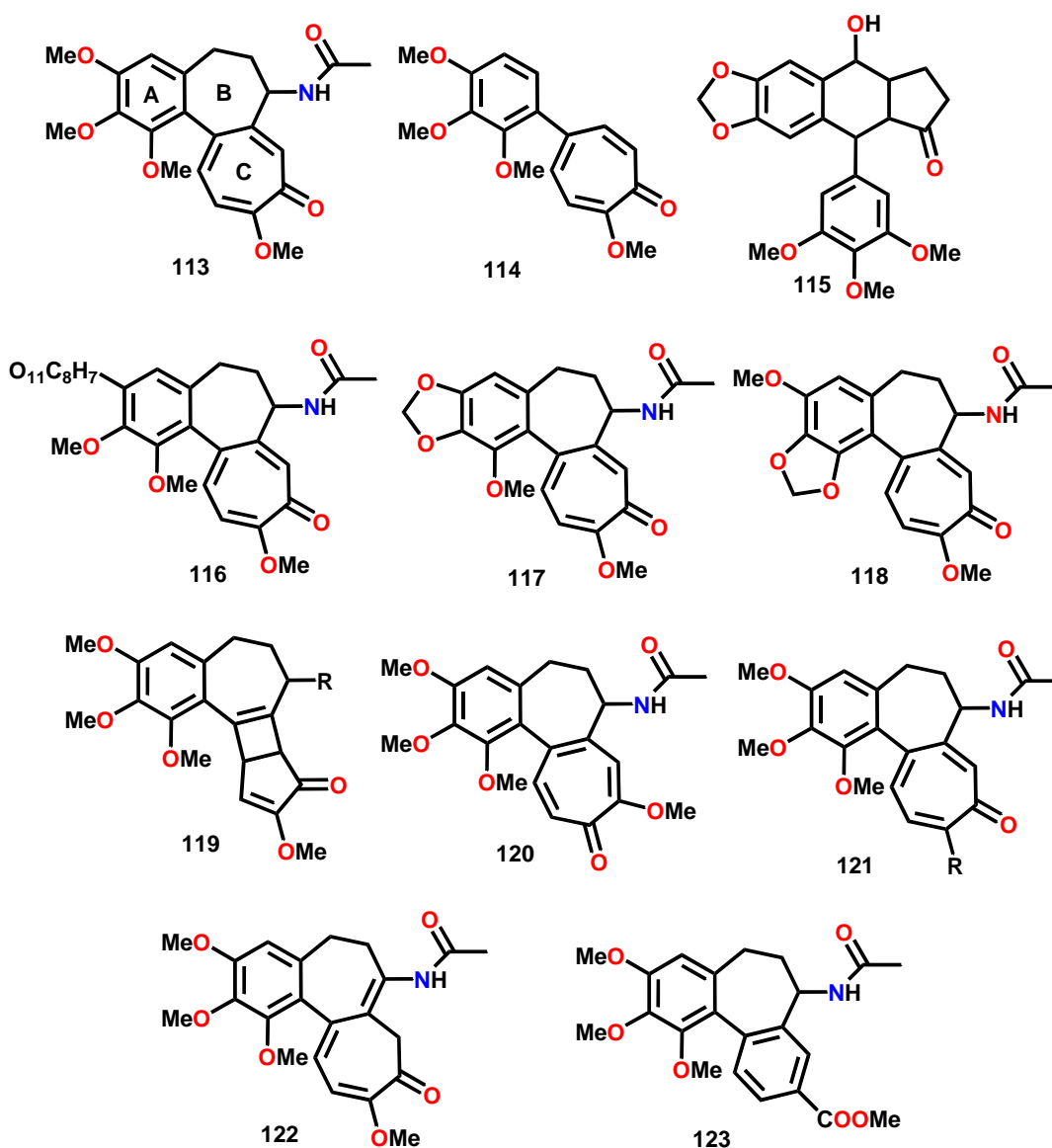
Nedavno je određena kristalna struktura tubulina u kompleksu sa DAMA-kolhicinom.<sup>153</sup> i sa domenom sličnim statminu (SLD, *stathmin like domain*) na rezoluciji od 3,5 Å (Slika 14). Kolhicin u ovoj strukturi sprečava tubulin da zauzme izduženu konformaciju, odnosno tubulin se nalazi u blago zakrivljenoj konformaciji. Kolhicinsko vezivno mesto se nalazi u intermedijernom domenu β-subjedinice. Okruženo je β-nabranim pločicama S8 i S9, petljom T7 i heliksima H7 i H8. A i C prstenovi DAMA-kolhicina interaguju sa strukturnim elementima β-subjedinice, dok prsten B interaguje sa petljom T5 α-subjedinice. Stabilnost mikrotubula zahteva postojanje longitudinalnih i lateralnih interakcija između heterodimera tubulina. Na niskim koncentracijama TC-kompleksa, kolhicin se vezuje za mikrotubule narušavajući lateralne kontakte između krajeva protofilamenata unutar mikrotubule. Tubulin ne može da zauzme izduženu konformaciju, zbog nepovoljnih sternih kontakata između kolhicina i aminokiselinskih ostataka αAsn101, αVal181 i GTP-a. Na niskim koncentracijama TC-kompleksa procenat lateralnih interakcija koje su sprečene vezivanjem kolhicina (tzv. 'izgubljenih') je mali. Mikrotubule ostaju intaktne (ne dolazi do njihove depolimerizacije) sve dok je obim izgubljenih lateralnih interakcija mali. Povećanjem koncentracije kolhicina, a samim tim i koncentracije TC-kompleksa, dolazi do većeg gubitka ovih lateralnih interakcija, što dovodi do depolimerizacije mikrotubula.



**Slika 14.** Kompleks tubulina sa kolhicinom i domenom sličnim statminu (SLD).  $\alpha$ -subjedinice su obojene zeleno, a  $\beta$  tirkizno. Kolhicin (ljubičasto), vezan za  $\beta$ -subjedinicu i GTP predstavljeni su sferama.

#### 2.3.1.4. Odnos strukture i aktivnosti kolhicina i njegovih derivata

Kolhicin (Shema 41a) sadrži tri prstena: trimetoksibenzenski prsten A (TMP), metoksitroponski prsten C i sedmočlani prsten B, za koji je vezana acetamido-grupa u položaju C7 i koji povezuje prstenove A i C. Studije odnosa strukture i aktivnosti kolhicinskih analoga su pokazale da prstenovi A i C predstavljaju minimalnu strukturnu karakteristiku molekula potrebnih za visoki afinitet vezivanja za tubulin.



**Shema 41.** Kolhicin i njegovi analozi: kolhicin (113), 2-metoksi-5-(2', 3', 4'- trimetoksifenil)tropon (114), podofilotoksin (115), kolhikozid (116), 2,3-kornigerin (117), 1,3-kornigerin (118), lumikolhicini (119), izokolhicin (120), 121: R=H, kolhicid; R=-OH, kolhicein, R=-SMe, tiokolhicin, prekolhicin (122), alokolhicin (123).

Jedinjenje 114, Shema 41, je jednostavan bifunkcionalan molekul koji se takođe vezuje za kolhicinsko vezivno mesto sa visokim afinitetom.<sup>154</sup> Studije velikog broja analoga kolhicina pokazale su jasno da analozi kolhicina modifikovani na prstenu B, ili čak lišeni tog prstena zadržavaju antimitotsku aktivnost, i vezuju se za tubulin na kolhicinskom mestu. Međutim, prisustvo prstena B i njegovog bočnog niza u položaju C7 značajno utiče na kinetiku vezivanja kolhicinskih analoga za tubulin i to pre svega na brzinu asocijacije, energiju aktivacije i termodinamiku vezivanja.

Uloga i važnost prstena A za afinitet prema tubulinu je detaljno proučavana kroz različite strukturne modifikacije kolhicina i njegovih analoga. U konjunktiji sa prstenom C, ovaj prsten čini esencijalnu farmakoforu za čvrsto vezivanje za tubulin. Podofilotoksin (**115**, Šema 41) se takođe vezuje za vezivno mesto kolhicina i deluje kao kompetitivni inhibitor vezivanja kolhicina, upravo zahvaljujući prisustvu trimetoksifenil-grupe prstena A.<sup>155</sup> Uvođenje voluminoznih grupa na prsten A kolhicina, kao kod kolhikozida (**116**, Šema 41) prouzrokuje smanjenje jačine dejstva.<sup>156</sup> Voluminoznost alkoksi-grupa na prstenu A takođe ima značajan uticaj na jačinu dejstva kolhicinskih analoga. Supstitucija bilo koje od tri metoksi-grupe voluminoznijim alkoksi-grupama rezultuje značajnim smanjenjem jačine dejstva.<sup>157</sup> Zamena metoksi-grupa prstena A, metilendioksi-grupom, zavisno od položaja ove grupe na prstenu A, ima izražene efekte na jačinu dejstva ovih derivata. 2,3-Izomer kornigerina (**117**, Shema 41) je aktivan skoro kao i sam kolhicin, dok je 1,2-izomer (**118**, Shema 41) potpuno neaktivan.<sup>158</sup>

Troponski prsten C je takođe esencijalan za antitubulinsku aktivnost kolhicina i njegovih analoga. Pokazano je da ovaj prsten podleže fotohemijском razlaganju pri čemu nastaje niz jedinjenja poznatih kao lumikolhicini (**119**, Shema 41) koji se znatno slabije vezuju za tubulin.<sup>159</sup> Promena relativnih položaja metoksi i karbonilne grupe na prstenu C, kao kod izokolhicina (**120**, Shema 41), rezultuje potpunim gubitkom antitubulinske aktivnosti. Kolhacid predstavlja analog kolhicina kod koga je metoksi grupa na položaju C-10 zamenjena atomom vodonika (**121**, Shema 41, R=H). Ovo jedinjenje kompetitivno inhibira vezivanje kolhicina za tubulin i inhibitor je polimerizacije tubulina.<sup>160</sup> Kod kolhiceina (**121**, Shema 41, R=OH) metoksi grupa na prstenu C zamenjena je –OH grupom. Prsten C kolhiceina može da postoji u dva tautomerna oblika, koji odgovaraju konfiguracijama istog prstena kod kolhicina, odnosno, izokolhicina, s tim što je tautomer koji odgovara prstenu C izokolhicina predominantan.<sup>161</sup> Ovo jedinjenje se vezuje za kompleks tubulina i kolhicina, pa se smatra da je njegovo vezivno mesto na tubulinu različito od kolhicinskog vezivnog mesta.<sup>162</sup> Tiokolhicin (**121**, Shema 41, R=SMe), analog kolhicina, kod koga je metoksi-grupa zamenjena tiometil-grupom je takođe vrlo aktivan analog kolhicina. Premeštanje sistema dvostrukih veza kolhicina, kao kod prekolhicina (**122**, Shema 41) rezultuje gubitkom antitubulinskog dejstva. Zamena prstena C aromatičnim šestočlanim analogom, kao kod alokolhicina (**123**, Shema 41) ne menja značajno afinitet vezivanja za tubulin.<sup>163</sup>



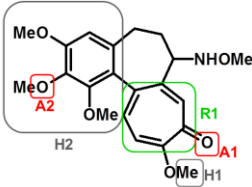
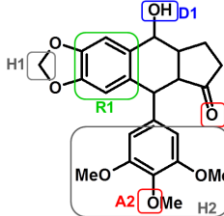
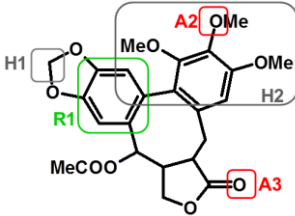
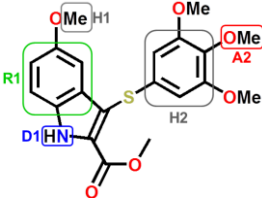
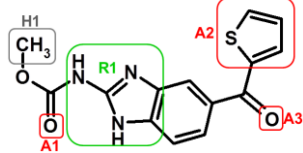
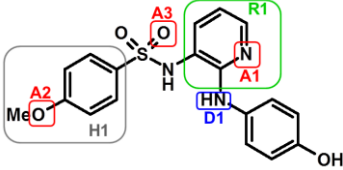
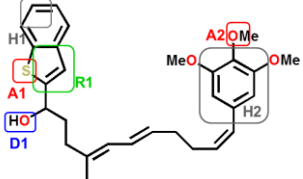
#### 2.3.1.5 Farmakoforna svojstva liganada koji se vezuju za kolhicinsko vezivno mesto

Iako je kolhicin intenzivno korišćen za ispitivanje strukture, dinamičkih i ostalih svojstva mikrotubula, njegova upotreba u terapiji malignih oboljenja nije moguća zbog jake toksičnosti.<sup>164</sup> Međutim, nekoliko analoga kolhicina i jedinjenja dizajniranih da se vezuju za vezivno mesto kolhicina nedavno je povećala interes za ovu klasu anti-mitotskih agenasa, zbog njihove sposobnosti da inhibiraju proliferaciju ćelija tumora rezistentnih na druge lekove. Mnogi od ovih agenasa su u različitim fazama kliničkih ispitivanja, ova grupa spada u tzv. inhibitore kolhicinskog vezivnog mesta. Neka od ovih jedinjenja imaju strukturne sličnosti sa kolhicinom dok druga imaju veoma različite strukturne elemente. Zbog toga je važno naći suštinske strukturne karakteristike neophodne za antitubulinsku aktivnost. Nguyen i saradnici,<sup>165</sup> su koristeći tehnike dokinga i simulacije molekulske dinamike došli do zaključka o zajedničkom farmakofori za neke inhibitore kolhicinskog vezivnog mesta koji su međusobno strukturno različiti. Set od 15 inhibitora kolhicinskog vezivnog mesta dizajniran je tako da jedinjenja sadrže sve farmakoforne karakteristike koje poseduju svi do tada poznati inhibitori kolhicinskog mesta, i da prema tome dobro reprezentuje njihov strukturni diverzitet. Kako nedostaju informacije o orijentacijama molekula unutar kolhicinskog vezivnog mesta, zaključci o najverovatnijim orijentacijama su dobijeni iz rezultata molekuskog dokinga. Mogući načini vezivanja, dobijeni dokingom detaljno su analizirani, uzevši u obzir sterne i elektrostatičke parametre kolhicinskog vezivnog mesta i način vezivanja svakog molekula iz seta.

Pokazalo se da se jedinjenja mogu podeliti u dve grupe: prva grupa uključivala je molekule koji poseduju određenu strukturnu sličnost sa kolhicinom, opisanu sa tri važne strukturne karakteristike: diarilski sistem, trimetoksifenil grupa (TMP) i ograničena konformaciona fleksibilnost. Druga grupa jedinjenja nije imala najmanje jedno od ovih svojstava i stoga je smatrana strukturno više različitom od kolhicina. Na osnovu strukturne sličnosti, model vezivanja molekula koji spadaju u prvu grupu je određen doking metodom, uzevši u obzir mesto vezivanja TMP grupe za tubulin. U slučaju druge grupe jedinjenja, primenjen je sličan metod. Uprkos tome što su ispitivana jedinjenja bila strukturno različita, geometrijski su zauzimala relativno sličan prostor unutar kolhicinskog vezivnog mesta na tubulinu.

Analiza načina vezivanja svih molekula za kolhicinsko vezivno mesto pokazala je da postoji sedam osnovnih farmakofornih tačaka: tri akceptora vodonične veze (A1, A2 i A3), jedan donor vodonične veze (D), dva hidrofobna centra (H1 i H2) i jedna planarna grupa (R1). Minimalni zahtevi za afinitet vezivanja za tubulin bili su: jedan akceptor vodonične veze, dva hidrofobna centra i planarna grupa. Aminokiselinski ostaci na tubulinu koji formiraju vodonične veze sa jedinjenjima su:  $\alpha$ Val179 (peptidna -NH- grupa sa A1),  $\beta$ Cys241 (-SH grupa sa A2) i peptidne -NH- grupe aminokiselinskih ostataka  $\beta$ Ala248,  $\beta$ Asp249 i  $\beta$ Leu250 koje formiraju vodonične veze sa farmakofornim elementom A3. Karbonilni kiseonik  $\alpha$ Thr177 formira vodoničnu vezu sa farmakofornim elementom D. Hidrofobni deo molekula H1 je smešten između ostataka  $\alpha$ Val179 i  $\beta$ Met257. Što je veći broj farmakofornih tačaka koje molekul poseduje, veći je i afinitet vezivanja datog molekula za tubulin. Autori su grupisali jedinjenja prema broju i vrsti farmakofornih tačaka koje poseduju u sedam grupa. Te grupe su prikazane na primeru reprezentativnih jedinjenja, zajedno sa farmakofornim elementima u Tabeli 1.

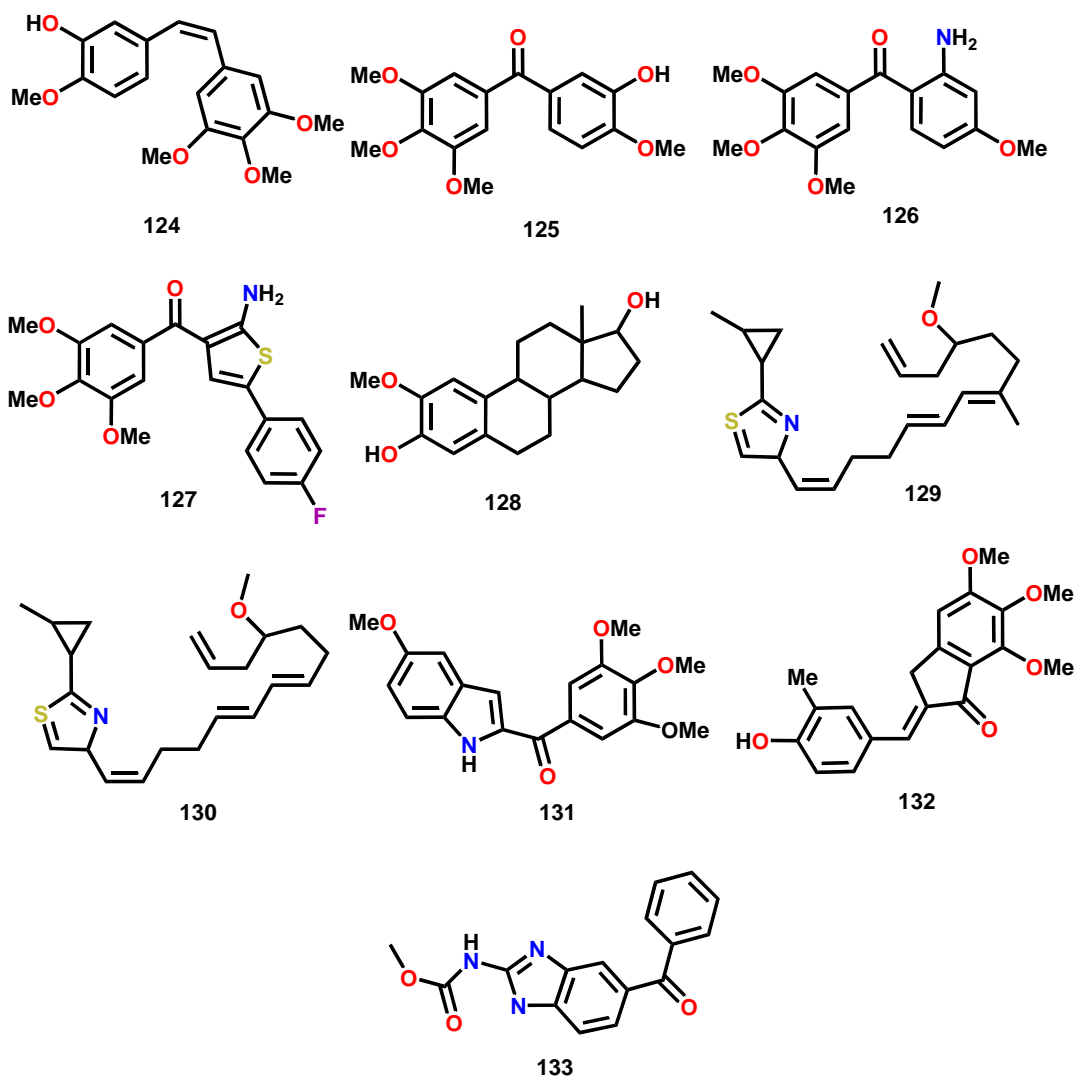
Tabela 1. Farmakoforne tačke tipičnih predstavnika inhibitora kolhicinskog vezivnog mesta

Farmakoforna grupa	Farmakoforne tačke	Naziv jedinjenja	Struktura
I	A1-A2-H1-H2-R1	Kolhicin	
II	A2-A3-D1-H1-H2-R1	Podofilotoksin	
III	A2-A3-H1-H2-R1	Steganacin	
IV	A2-D1-H1-H2-R1	/	
V	A1-A2-A3-H1-H2-R1	Nokodazol	
VI	A1-A2-A3-D1-H1-R1	E7010	
VII	A1-A2-D1-H1-H2-R1	/	

Strukture nekoliko jedinjenja koja se vezuju za kolhicinsko vezivno mesto prikazane su na Shemi 42. U daljem tekstu, ukratko će biti opisana najvažnija svojstva ovih jedinjenja. Kombretastatin A4 (**124**) je vrlo jak inhibitor polimerizacije tubulina i pripada prvoj (I) farmakofornoj grupi. Kombretastatin A-4-fosfat (CA4P) je dinatrijumova so fosfata kombretastatina, napravljena da bi se povećala rastvorljivost; aktivan je prema nekoliko vrsta ćelija zloćudnih tumora, uključujući i one rezistentne na postojeće lekove. Trenutno se nalazi u drugoj fazi kliničkih ispitivanja.<sup>166</sup>

Fenstatin (**125**) je benzofenonski analog kombretastatina, i izveden je zamenom olefinskog mosta kombretastatina A4 karbonilnom grupom, pripada farmakofornoj grupi IV.<sup>167</sup> Iako je fenstatin strukturno veoma sličan kombretastatinu, bolji je inhibitor polimerizacije tubulina. Posедуje šest farmakofornih tačaka (A1, A2, A3, H1, H2 i R1) i u odnosu na kombretastatin poseduje dodatnu farmakofornu tačku A3, odnosno karbonilnu grupu koja formira vodonične veze sa peptidnim NH grupama ostataka  $\beta$ Ala248,  $\beta$ Asp249 i  $\beta$ Leu250. Zamena hidroksilne grupe na položaju C2 fenstatina amino grupom, daje 2-aminobenzofenonski analog (**126**) koji takođe ispoljava značajnu citotoksičnost prema različitim ćelijskim linijama humanih tumora. 2-Aminotiofenski analog (**127**) je sintetisan zamenom etilenske grupe 2-aminobenzofenona atomom sumpora. Kako su benzen i tiofen bioizosteri, dobijena je nova generacija jedinjenja sa antiproliferativnom aktivnošću, supstituisanih u *para*-položaju fluorom, metil i metoksi grupom. Inhibicija polimerizacije tubulina zajedno sa inhibicijom vezivanja kolhicina pokazala je da ova jedinjenja utiču na polimerizaciju tubulina tako što se vezuju za kolhicinsko vezivno mesto.

2-Metoksiestradiol (**128**) predstavlja metabolit estradiola i pokazuje jaku antiproliferativnu aktivnost i selektivnost prema zdravim ćelijama. Pripada, kao i kombretastatin A4 farmakofornoj grupi I. Ovo jedinjenje je kandidat za lečenje raka prostate. Inhibicija ćelijskog rasta koju izaziva 2-metoksiestradiol posledica je različitih mehanizama dejstva kao što su uticaj na polimerizaciju mikrotubula, indukcija apoptoze, inhibicija angiogeneze i povećan oksidativni stres.<sup>168</sup>



**Shema 42.** Tipični predstavnici inhibitora kolhicinskog vezivnog mesta: Kombretastatin A4 (**124**), Fenstatin (**125**), analog 2-aminobenzofenona (**126**), 2-aminotiofenski analog (**127**), 2-metoksiestradiol (**128**), Kurasin A (**129**), analog Kurasina (**130**), 2-aroilindolski analog (**131**), Indanocin (**132**), Mebendazol (**133**).

Kurasin A<sup>169</sup> (**129**) poseduje pet farmakofornih tačaka, takođe pripada farmakofornoj grupi I, ali je potpuno strukturno različit od kolhicina. Kurasin A i njegov analog (**130**) međusobno se razlikuju po prisustvu, odnosno odsustvu metil-grupe na polimetilenskom nizu. Ova metil-grupa kod kuracina A formira hidrofobne interakcije sa bočnim alkil-ostacima  $\beta$ Leu240,  $\beta$ Leu250 i  $\beta$ Leu253. Njegov analog nema metil-grupu na polimetilenskom nizu, te ne interaguje sa ovim ostacima i stoga je manje efikasan inhibitor polimerizacije tubulina od kuracina A.<sup>170</sup> 2-Aroilindolski analog (**131**) i steganacin (Tabela 1) pripadaju farmakofornoj grupi III. Studije molekuskog modelovanja pokazale su da antitubulinska aktivnost 2-aroilindola i steganacina

zavisi od tipa supstitucije fenil-prstena.<sup>171</sup> Indanocin (**132**) pripada farmakofornoj grupi V.<sup>172</sup> Ovo jedinjenje ispoljava citotoksičnost prema rezistentnim ćelijama tumora.<sup>173</sup> Nokodazol<sup>174</sup> je takođe efikasan inhibitor polimerizacije tubulina. Njegove farmakoforne tačke su prikazane u Tabeli 1. Njegov kongener mebendazol<sup>175</sup> (**133**) takođe pripada farmakofornoj grupi V. Nguyen i saradnici pretpostavljaju da  $\pi$  elektroni fenil prstena ovog jedinjenja interaguju sa –SH grupom  $\beta$ Cys239.

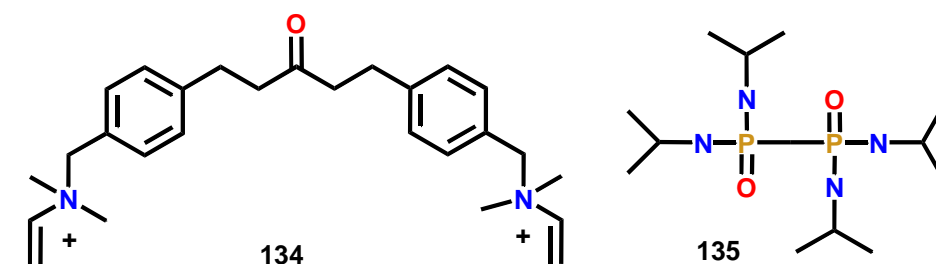
Farmakoforne tačke podofilotoksina (**115**) prikazane su u Tabeli 1. Ovo jedinjenje sadrži šest farmakofornih tačaka i pripada grupi II.<sup>176</sup> Podofilotoksin depolimerizuje mikrotubule na visokim koncentracijama, i utiče na njihovu dinamiku u substehiometrijskim koncentracijama. Međutim, ne primenjuje se u terapiji malignih oboljenja zbog jake toksičnosti. Jedinjenje E7010 (Tabela 1) se vezuje za kolhicinsko mesto i trenutno se nalazi u drugoj fazi kliničkih ispitivanja. Ovo jedinjenje se vezuje reverzibilno za tubulin i ispoljava antiproliferativnu aktivnost prema rezistentnim ćelijama tumora. Ima šest farmakofornih tačaka prikazanih u Tabeli 1 i pripada farmakofornoj grupi VI. Nedavno je sintetisana nova klasa indolskih sulfonamida u kojima je supstituisani piridinski prstem E7010 zamenjen indolom.<sup>177</sup>

## 2.3.2. Holinesteraze

### 2.3.2.1. Fiziološka uloga holinesteraza

Verovatno svi životinjski organizmi imaju neku vrstu enzima koja može da hidrolizuje acetilholin. Kod kičmenjaka dva različita enzima obavljaju ovu funkciju. Acetilholinesteraza (EC 3.1.1.7, AChE) hidrolizuje acetilholin na post-sinaptičkim membranama nervnih i nervno-mišićnih spojeva. Prema tome, metabolička funkcija AChE jeste da prekine ekscitatorno dejstvo acetilholina na holinergičkoj sinapsi. Kao takav, ovaj enzim je kritičan za širok opseg bioloških procesa uključujući normalno funkcionisanje centralnog nervnog sistema, kardiovaskularnih i respiratornih funkcija. To je jedan od retkih enzima koji je postigao katalitičko savršenstvo - brzina hidrolize acetilholina je blizu difuziono kontrolisane granice sa  $k_{cat} = 10^4 \text{ s}^{-1}$ .<sup>178</sup> Drugi enzim, butirilholinesteraza, odn. pseudoholinesteraza, nespecifična holinesteraza ili samo holinesteraza (EC 3.1.1.8 BChE), hidrolizuje acetilholin kao i mnoge druge estre, ali je do sada njegova fiziološka funkcija nepoznata. Drozofila ima samo jednu holinesterazu čija se sekvenca i kinetičke osobine nalaze između AChE i BChE sisara.<sup>179</sup> Prema tome izgleda da su

AChE i BChE divergirale pre evolutivne pojave nižih kičmenjaka. Osobina koja BChE i AChE razlikuje od drugih nespecifičnih esteraza je inhibicija  $10^{-5}$  M eserinom (fizostigminom). Holinesteraze su podeljene u dve grupe na osnovu njihovih supstratnih specifičnosti, ponašanju u prisustvu viška supstrata i inhibicionih karakteristika. Inhibicija AChE u prisustvu viška supstrata je jedna od ključnih karakteristika koja je razlikuje od BChE, kod koje višak BCh ubrzava katalizu. AChE se selektivno inhibira 1,5-bis(4-alildimetilaminopropil)pentan-3-on dibromidom (BW284C51, **134**), a BChE 10-(2-dietilaminopropil)fenotiazidom (etopropazin) i izo-tetramonoizopropilpirofosfat-tetramidom (izo-OMPA, **135**, Shema 43). Tkivna distribucija ova dva enzima takođe se razlikuje: AChE je zastupljena u moždanom tkivu, mišićima i membrani eritrocita, a BChE ima veću aktivnost u jetri, crevima, srcu, bubrezima, plućima i serumu, koji je dominantan izvor BChE. BChE čini oko 0,1 % proteina humane plazme. Fiziološka funkcija AChE koja je locirana van sinapse, duž nervnih vlakana i u neholinergičkim tkivima kao što su eritrociti, nije poznata. Široka supstratna specifičnost BChE i njena rasprostranjenost u jetri i bubrezima ukazuju na najverovatniju fiziološku ulogu kao enzima za detoksifikaciju.



Shema 43. Inhibitori holinesteraza: BW284C51 (**134**), inhibitor AChE i izo-OMPA (**135**), inhibitor BChE

### 2.3.2.2. Molekulski polimorfizam holinesteraza

Za obe holinesteraze postoji samo po jedan gen. Alternativnim cepanjem originalnog transkripta RNK nastaju različite mRNK koje prilikom biosinteze daju različite proteinske proizvode. Ovi različiti proteinski proizvodi sadrže deo koji je zajednički i esencijalan za katalitičku aktivnost, ali imaju različite C-terminalne sekvence,<sup>180</sup> koje utiču na njihovu različitu multimerizaciju, vezivanje za ćelijske membrane, ili na rastvorljivost. Agregati monomera formiraju dve klase molekulskih formi, simetrične globularne forme i asimetrične forme.

Polimerne forme se sastoje iz identičnih monomera, ali monomeri koji formiraju različite molekulske forme se mogu razlikovati u primarnoj strukturi.

a. Hidrofilne u vodi rastvorne forme

Oba enzima postoje u formama koje su rastvorne u vodi i to najviše kao G4 tetrameri, koji predstavlja asocijaciju dva dimera povezana jakim hidrofobnim interakcijama. Dve subjedinice unutar dimera povezane su jednom disulfidnom vezom preko Cys-571.<sup>181</sup> Dimeri i monomeri koji se nalaze u plazmi izgleda da su degradacioni proizvodi tetramera.<sup>182</sup>

b. Asimetrične hidrofobne forme

Ovaj oblik je karakterisan prisustvom repa koji liči na kolagen i služi za vezivanje za membranu. On se formira od trostruke helikoidne strukture tri kolagenske podjedinice, od kojih je svaka povezana sa jednim A<sub>4</sub>, dva A<sub>8</sub> ili tri A<sub>12</sub> tetramera holinesteraza. Ova forma AChE je zastupljena na nervno-mišićnim spojevima. Kolagenska subjedinica asimetrične forme AChE pokazuje veliki afinitet prema heparan-sulfat proteoglikanu, lamininu i tipu V kolagena, što može da objasni njeno vezivanje za membranu.<sup>183</sup>

c. Amfifilne forme

Kod tipa I amfifilnih dimera, preko glikofosfatidil-inozitola dimeri se usidre u plazma membranu u mišićima sisara, eritrocitima i limfocitima. Ovo je više zastupljena forma AChE i može se jedino rastvoriti deterdžentima. Tip II amfifilnih dimera i monomera je lišen glikolipidnog sidra, ne rastvara se u prisustvu deterdženata, i može se rastvoriti u rastvorima soli. Ove forme obe holinesteraze su zastupljene u mozgu sisara, mišićima i crevima.

### 2.3.2.3. Aminokiselinska sekvenca katalitičkih podjedinica

Prva aminokiselinska sekvenca 11S molekulske forme AChE je izvedena iz sekvence cDNK enzima iz električnog organa vrste *Torpedo Californica*,<sup>184</sup> a prva aminokiselinska sekvenca BChE je određena iz humane serumske BChE, Edmanovom degradacionom metodom.<sup>185</sup> Postoji visok stepen sličnosti između *Hu*BChE i *Tc*AChE (iz vrste *Torpedo californica*), uprkos činjenici da su enzimi iz vrsta koje su evolutivno udaljene. *Hu*BChE i *Tc*AChE su 54 % identične, dok *FBS*AChE i *Tc*AChE imaju oko 60 % sličnosti u sekvenci.<sup>186</sup> Disulfidne veze u *Hu*BChE<sup>187</sup> i *Tc*AChE<sup>3</sup> su na istim pozicijama (Cys-67 i Cys-94, Cys-254 i Cys-265, Cys-402 i Cys-521,



prema sekvenci vrste *Torpedo Californica*) i disulfidne petlje sadrže jednak broj aminokiselinskih ostataka. Kod oba enzima Cys se u sekvenci nalazi na četvrtom mestu od C-kraja i služi za povezivanje identičnih katalitičkih podjedinica. Dužine katalitičkih podjedinica su slične kod različitih vrsta: 574 AK *Hu*BChE, 575 AK hidrofilna *Tc*AChE, 537 AK amfifilna *Tc*AChE.

AChE i BChE su glikoproteini. Kod *Tc*AChE postoje četiri oligosaharidna niza povezana za ostatke asparagina, a kod *Hu*BChE su devet oligosaharidnih nizova takođe povezani za aspariginske ostatke na pozicijama: 17, 57, 106, 241, 256, 341, 455, 481, 486. Svi ostaci asparagina su glikozilovani sa izuzetkom Asn 485, koji je susedan glikozilovanom Asn 486.

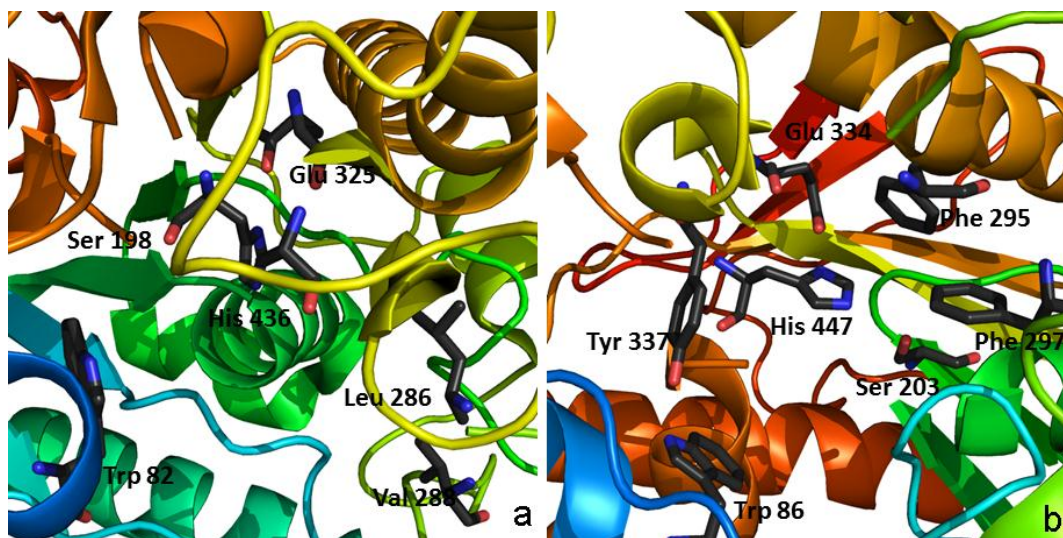
#### 2.3.2.4. Tercijarna struktura enzima, katalitički mehanizam i dinamički efekti

AChE i BChE sadrže 20 Å duboku šupljinu koja je oivičena sa oko 55 aminokiselinskih ostataka. Glavna razlika u šupljinama koje sadrže aktivni centar jeste ta da su 6 od 14 aromatičnih aminokiselinskih ostataka AChE (Tyr 72, Tyr 124, Trp 286, Phe 295, Phe 297 i Tyr 337) zamenjeni alifatičnim kod BChE (Asn 68, Gln 119, Ala 277, Leu 286, Val 288 i Ala 328). Ovo za posledicu ima 200 Å<sup>3</sup> veću šupljinu aktivnog mesta BChE u odnosu na aktivno mesto AChE.<sup>188</sup> Unutar ove šupljine se razlikuju pet regiona prostorno bliskih aminokiselinskih ostataka koji su uključeni u vezivanje supstrata, ireverzibilnih i reverzibilnih inhibitora i u mehanizmu katalize:

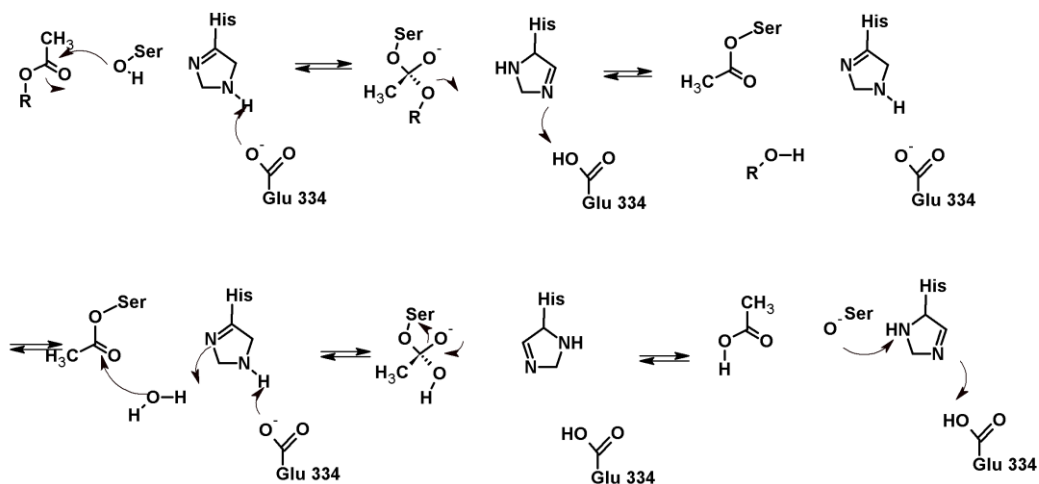
- Katalitička trijada BChE (AChE): Ser 198(203), His 438(440) i Glu 325(334)<sup>189</sup> (Slika 15). Ovi aminokiselinski ostaci direktno učestvuju u katalitičkom ciklusu, mehanizmom kovalentne katalize, kao i kod ostalih serin proteaza.<sup>190,191</sup> Mehanizam hidrolize acetilholina prikazan je na Shemi 44.
- Oksianjonska šupljina; ovaj region formiraju peptidne -NH-grupe aminokiselinskih ostataka Gly 116(121), Gly 117(122) i Ala 199(204),<sup>192,193</sup> koje stabilizuju prelazni tetraedarski enzim-supstrat kompleks, formiranjem vodoničnih veza sa negativno-naelektrisanim karbonilnim kiseonikom.
- Esterazno mesto, Trp 82(86) pripada ovom regionu (Slika 15). Ovaj ostatak je očuvan kod svih holinesteraza i uključen je u orijentaciju i stabilizaciju trimetilamonijum-grupe

ACh, formiranjem katjon- $\pi$  interakcija.<sup>194</sup> Tyr 337 je lociran blizu Trp 86, kod *HuAChE* (Slika 15b) i on stabilizuje vezivanje liganada kao što su hiperzin A, edrofonijum, derivati akridina i jedan strukturni fragment biskvaternernih jedinjenja kao što su BW284C51 i dekametonijum.<sup>195</sup> Međutim, kod *HuBChE* ovaj ostatak je zamenjen manje voluminoznim Ala 328 (Slika 15a), što objašnjava selektivno vezivanje etopropazina, liganda sa voluminoznom egzocikličnom supstitucijom, za BChE.

- Acil-džep, kod *HuAChE*, obuhvata dva fenilalaninska ostatka na pozicijama 295 i 297 (Slika 15a) koji interaguju sa acil-grupom supstrata. Ovi ostaci formiraju klešta oko metil-grupe ACh i ograničavaju pokretljivost ACh unutar šupljine.<sup>196</sup> Voluminozna propil-grupa butirilholina (BCh) ne može da se smesti između ova dva ostatka, što objašnjava nižu katalitičku efikasnost AChE sa BCh kao supstratom. Međutim, u acil-džepu BChE ima mnogo više prostora, zato što su dva fenilalaninska ostatka zamenjena sa Leu 286 i Val 288 (Slika 15b), što objašnjava bržu hidrolizu BCh u odnosu na ACh, povećanu osetljivost na voluminozni specifični inhibitor BChE *izo*-OMPA i niži stepen inhibicije sa BW248C51.<sup>194-196</sup>

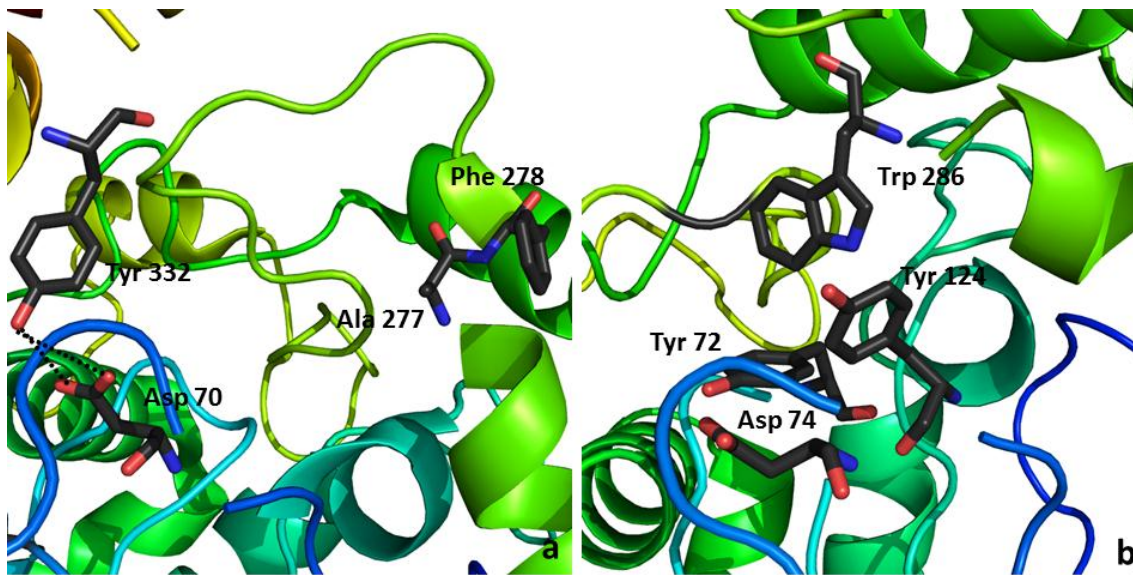


**Slika 15.** Aktivna mesta **a.** *HuBChE* (PDB oznaka 1POI) i **b.** *HuAChE* (PDB oznaka 1F8U), aromatični ostaci acil-džepa *HuAChE* Phe 295 i Phe 297 su zamenjeni alifatičnim ostacima Leu 286 i Val 288 kod *HuBChE* i takođe je Tyr 337 *HuAChE* zamenjen sa Ala328 kod *HuBChE*.



Shema 44. Katalitički mehanizam holinesteraza

- Periferno anjonsko mesto (PAS),<sup>197</sup> obuhvata ostatke koji su locirani na rubu šupljine aktivnog centra. Kod *HuAChE*, to su aminokiselinski ostaci Tyr 72, Asp 74, Tyr 124 i Trp 286 (Slika 16b). Na mestu Trp 286 AChE, se nalazi Ala 277 kod BChE (Slika 16a), što prouzrokuje gubitak osetljivosti prema inhibitorima BW284C51 i propidijumu. Štaviše, BChE je kompetitivno, a AChE nekompetitivno inhibirana propidijumom, što ukazuje na vezivanje propidijuma za aktivno mesto BChE. Ranije se smatralo da BChE ne sadrži PAS i da zbog toga enzim pokazuje niži afinitet prema dualnim inhibitorima. Međutim, prisustvo Phe 278 (Slika 16) koji može da interaguje sa drugim delom dualnih inhibitora, kao i činjenica da neki dualni reverzibilni inhibitori imaju veoma niske  $K_i$  vrednosti u odnosu na monomerne inhibitore, pokazuje da BChE u stvari ima sekundarno vezivno mesto za dualne inhibitore. Asp 70 i Tyr 332 se nalaze na rubu šupljine aktivnog mesta BChE i oni su međusobno povezani vodoničnom vezom u odsustvu supstrata (Slika 16a).



**Slika 16. a.** Moguće periferno mesto interakcije na *HsBChE* (PDB oznaka 1POI); **b.** Periferno anjonsko mesto *HsAChE* (PDB oznaka 1F8U). Trp 286 (sekvenca *HsAChE*) je zamenjen Ala 277 kod *HsBChE*, ali susjedni aminokiselinski ostatak Phe 278 kod *HsBChE* može da ima ulogu PAS.

Na osnovu svega navedenog, pretpostavljeno je da je efikasnost enzima posledica idealnog prostornog rasporeda različitih strukturnih elemenata, gde 1) PAS i Trp 86 privlače i vode trimetilamino-grupu supstrata ka katalitičkom mestu, 2) oksianjonska šupljina i acil-džep usidruju ester u orijentaciju koja je povoljna za nukleofilnu supstituciju, 3) transfer protona između aminokiselinskih ostataka katalitičke trijade indukuje efikasan nukleofilni napad hidroksi-grupe serina na estarsku funkcionalnu grupu, 4) oblik šupljine aktivnog mesta dozvoljava prisustvo molekula vode koji su neophodni za efikasnu deacilaciju Ser 203.

Pretpostavlja se, takođe, da pored opisanih strukturnih karakteristika, neki elektrostaticki i dinamički efekti doprinose izuzetnoj efikasnosti acetilholinesteraze. Ove efekte su detaljno ispitali MekKemon i saradnici<sup>198</sup> metodama molekulske-dinamike (MD). Našli su da je šupljina aktivnog mesta AChE toliko duboka i uska da u rigidnim modelima koji koriste (većinu) dostupnih kristalnih struktura ne postoji dovoljna širina kanala za smeštanje poznatih supstrata i inhibitora aktivnog mesta. Činjenica da AChE ustvari dozvoljava i supstratima i inhibitorima pristup do dna šupljine aktivnog mesta i da je enzim jedan od katalitički najbržih u poznatom proteomu, jasno sugerise da dinamički efekti igraju glavnu ulogu u difuzionoj efikasnosti.

Najvažniji radovi koji se tiču dinamičkih efekata AChE obuhvataju: poređenje statičke AChE iz kristalne strukture i njenog dinamičkog virtuelnog analoga,<sup>199</sup> zatim jednu od najvažnijih studija u kojoj se predviđa prisustvo „zadnjih vrata“, tj. izlaznog kanala blizu glavne šupljine<sup>200</sup> i prva detaljna procena uloge mobilne petlje Cys 69 – Cys 96.<sup>201</sup> Prvi od ovih radova obezbedio je uvid u stepen strukturnih i konformacionih promena u enzimu usled prelaza iz apo-forme\* u formu u kojoj je enzim inhibiran, dok su druga i treća studija otvorile pitanje specifičnih karakteristika, kao što je dinamički nastanak prelaznih kanala kojima molekuli rastvarača i proizvodi katalitičkog ciklusa (AcOH i holin) napuštaju enzim.

Što se tiče radijusa šupljine glavnog kanala, MD simulacija<sup>202</sup> u trajanju od 10 ns na *m*AChE otkrila je kompleksnu prirodu fluktuacije bočnih aminokiselinskih ostataka šupljine. Kretanja aminokiselinskih ostataka doprinose otvaranju šupljine i nađena su dva različita energetska minimuma (stabilna konformaciona stanja), široko i usko. Korelaciona analiza poluprečnika šupljine aktivnog mesta i položaja aminokiselinskih ostataka koji joj pripadaju je pokazala da su kretanja ovih aminokiselinskih ostataka visoko korelisana sa otvaranjem šupljine (odn. promenom njenog poluprečnika). Npr., rastojanje između Phe 338 C<sub>ε2</sub> (jedan od *m*- ugljenika fenil-prstena) i Tyr 124 O<sub>H</sub> (kiseonik hidroksi-grupe bočnog ostatka) i veličina radijusa šupljine su visoko korelisani (korelacioni koeficijent 0,91). MD simulacija *m*AChE inhibirane faskulinom ili hiperzinom A pokazuje da uže stanje šupljine postaje favorizovano u odnosu na apo-formu enzima. Rastojanje između C<sub>α</sub> atoma Tyr 124 i Phe 338 *m*AChE inhibirane faskulinom je za otvoreno (šire) stanje šupljine 12,88 Å, a za zatvoreno 12,81 Å; razlika je samo 7 pm. Kod MD simulacije na apo *m*AChE, otvorena šupljina ima radijus 14,85 Å a zatvorena 14,40 Å, znači da je razlika ovde znatno veća, 45 pm. Nedavno su ispitivane i fluktuacije aromatičnih aminokiselinskih ostataka koji ovičavaju šupljinu AChE. Susman i saradnici<sup>203</sup> su analizirali konformacionu fleksibilnost 14 konzerviranih aromatičnih ostataka *Tc*AChE, 20 ns dugom MD simulacijom zasnovanom na 47 trodimenzionalnih kristalnih struktura dostupnih za nativan enzim ili enzim kompleksiran inhibitorima. Nađeno je da su bočni ostaci Phe 330 i Trp 279 veoma fleksibilni, dok su Phe 120, Trp 233, Trp 432, Tyr 70, Tyr 121, Phe 288, Phe

---

\* Apo-forma enzima predstavlja nemodifikovan tip enzima, u ovom slučaju neinhibiranu AChE.

290 i Phe 331 manje mobilni. Aminokiselinski ostaci locirani na ili blizu  $\Omega$  petlje (Slika 19), Trp 84, Tyr 130 i Tyr 334 pokazivali su različitu fleksibilnost u MD simulacijama.

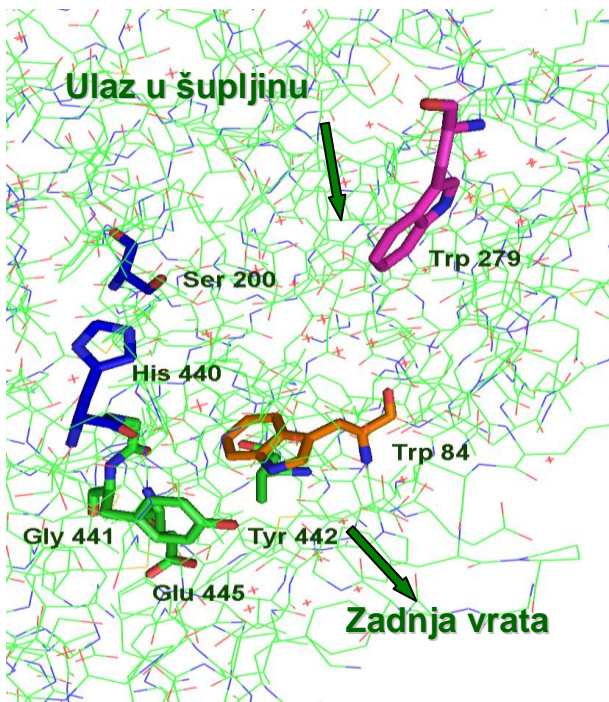
Hipoteza o postojanju zadnjih vrata, kao mogućeg izlaznog kanala za proizvod hidrolize supstrata, holin, postavljena je na osnovu 119 ps duge MD simulacije na *TcAChE*.<sup>200</sup> Otkriveno je prolazno otvaranje kratkog kanala u tankom zidu enzima, kroz koji može da prođe molekuli vode i koje vremenski traje oko 0,3 ps. Početak kanala je blizu  $C_{\beta}$  i  $C_{\alpha 2}$  atoma Trp 84, Gly 441 i aromatičnog prstena Tyr 442, a izlazi na površinu enzima blizu Glu 445 i Val 129. Prosečno pomeranje atoma ovih ostataka u odnosu na konformaciju iz kristalne strukture je 1,3 Å (Slika 17). Ovako mala fluktuacija položaja atoma, koja je potrebna da se zadnja vrata otvore ukazuje da je verovatno da se otvorena konformacija lako postiže. Otvaranje zadnjih vrata proučavano je 1 ns dugim MD simulacijama na *mAChE* u apo-formi i formi kompleksiranoj sa hiperzinom A.<sup>204</sup> Kod apo-forme enzima, prolazno otvaranje kanala zadnjih vrata se dešava u 109. ps simulacije i traje oko 0,2 ps sa dijametrom šupljine oko 2,8 Å. Kanal obuhvata ostatke: Trp 86, Val 132, Glu 202, Gly 448 i Ile 451. Kod enzima inhibiranog hiperzinom A, rezultati pokazuju da se zadnja vrata otvaraju nekoliko puta tokom MD simulacije, između 147. i 340. ps. Kanal ostaje otvoren oko 1 ps a tokom simulacije je ukupno otvoren 7 ps. Hipoteza zadnjih vrata je proveravana i studijama mutageneze. Kronman i saradnici<sup>205</sup> su ispitivali uticaj mutacija Val132Lys,<sup>†</sup> Glu84Gln, Asp131Asn na kinetička svojstva enzima. Prvi mutant je dizajniran tako da Lys može da gradi soni most sa susednim Glu 445 i na taj način permanentno zatvori zadnja vrata, a poslednja dva su dizajnirana tako da se procene efekti modifikovanog negativnog elektrostatickog polja na izlazu iz šupljine. Ferman i saradnici<sup>206</sup> su ispitali i efekat mutacija Val129Arg, Val129Arg/Cys231Ser i Val129Lys/Cys231Ser na katalitička svojstva enzima. Međutim, mutirani enzimi nisu pokazivali promenjene kinetičke parametre ( $K_m$  i  $k_{cat}$ ) u odnosu na nativni tip enzima. Prema tome, studije mutageneze ne pružaju pozitivan eksperimentalni dokaz za funkcionalni značaj zadnjih vrata u procesu katalize, koji je pretpostavljen na osnovu MD simulacija. Sa druge strane, postoje bar tri eksperimentalna rezultata koji podržavaju postojanje alternativnih kanala za ulazak i izlazak supstrata i inhibitora u aktivno mesto. Jedan od njih potiče iz kristalne strukture (PDB oznaka 1OCE)

---

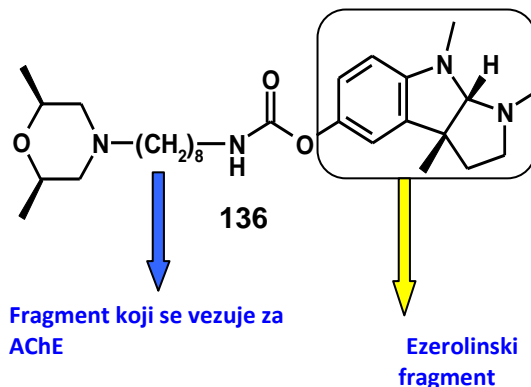
<sup>†</sup> Ova oznaka znači da je Val na poziciji 132 u nativnom enzimu zamenjen Lys u mutiranom enzimu.

karbamoilovane *TcAChE*.<sup>207</sup> Kovalentno vezivanje 2,6-dimetilmorfolinoktilkarbamil grupe pseudoireverzibilnog inhibitora Mf286 (*cis*-2,6-dimetilmorfolinoktil-karbamil-ezerolin, **136**, Slika 17a) za katalitički Ser 200 *TcAChE* prouzrokuje otpuštanje ezerolinskog fragmenta, kao odlazeće grupe koja napušta enzim. Izlazak ezerolinskog fragmenta kroz otvor glavne šupljine je onemogućen prisustvom voluminozne grupe kovalentno vezane za Ser 200 aktivnog mesta. Međutim, kristalna struktura *TcAChE* karbamoilovane jedinjenjem Mf286 pokazuje da ezerolinski fragment napušta enzim uprkos sternoj blokadi glavne šupljine. Takođe, inhibicija AChE faskulinom, uprkos njegovom visokom afinitetu i maloj brzini disocijacije, nije kompletna i rezidualna aktivnost enzima pokazuje da supstrati i dalje mogu da uđu u aktivno mesto, iako faskulin potpuno zatvara ulaz u glavnu šupljinu.<sup>208</sup> Dodatan dokaz u prilog postojanja zadnjih vrata je dala i činjenica da se inhibitorna monoklonska antitela vezuju u regionu zadnjih vrata.<sup>209</sup>

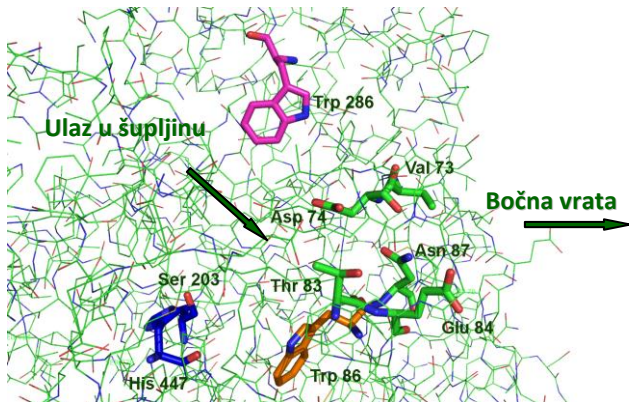
Kasnije studije su takođe postulirale prisustvo bočnih vrata kao alternativnog izlaznog kanala.<sup>202</sup> U 1 ns dugoj MD simulaciji *mAChE* inhibirane hiperzinom A nađeno je da ovaj prelazni kanal formiraju ostaci Val 73, Asp 74, Thr 83, Glu 84 i Asn 87 (Slika 18). Kanal se često otvara tokom simulacije i ukupno vreme za koje je bio otvoren je oko 10 ps. Otvaranje ovog kanala je primećeno i u MD simulaciji *TcAChE* inhibirane takrinom.<sup>210</sup> Međutim, tokom MD simulacije apo-forme *mAChE* nije primećeno otvaranje kanala bočnih vrata. Autori pretpostavljaju da je moguće da hiperzin A indukuje otvaranje bočnih vrata prouzrokujući konformaciono pomeranje Asp 74, koji formira vodoničnu vezu sa hiperzinom A.



Slika 17a. Aminokiselinski ostaci koji pripadaju zadnjim vratima.



Slika 17b. Mf286, pseudoireverzibilni inhibitor AChE



Slika 18. Aminokiselinski ostaci koji pripadaju bočnim vratima.

Detaljna analiza 5 ns MD simulacije *m*AChE inhibirane faskulinom sugeriše da je proces otvaranja i zatvaranja zadnjih i bočnih vrata nije jednostavno lokalizovan fenomen, već obuhvata usklađeno kretanje aminokiselinskih ostataka unutar monomerne jedinice AChE.<sup>211</sup> Dok je Trp 86 kritičan ostatak za zadnja vrata, i formira usta otvorenog kanala,<sup>200</sup> njegovo pomeranje je visoko korelisano sa otvaranjem bočnih vrata i jedan je od bočnih ostataka koji

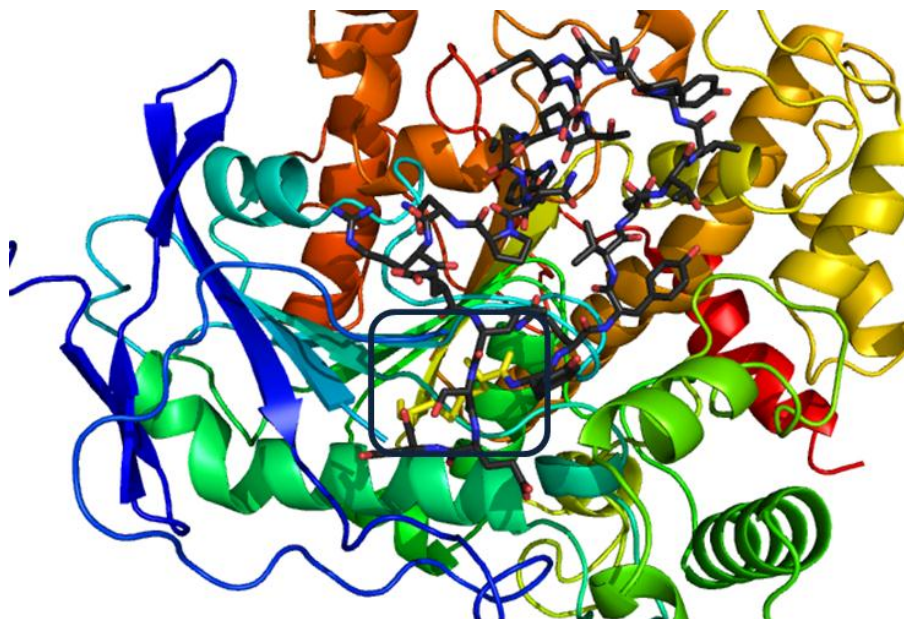


se najviše pomera usled otvaranja i zatvaranja bočnih vrata.<sup>211</sup> Međutim, ne postoji jednostavna korelacija između relativnih stanja (otvoreno u odnosu na zatvoreno stanje) između zadnjih i bočnih vrata. Tokom MD simulacije sa faskulinom vezanim za PAS, oba izlaza koegzistiraju otvorena (OO) oko 8 % vremena, a oba zatvorena (ZZ) otprilike oko 77% vremena i u preostalih 15 % vremenskih koraka jedan od izlaza je zatvoren a jedan otvoren (OZ ili ZO).<sup>211</sup> Uprkos očiglednom odsustvu zavisnosti između dinamike otvaranja i zatvaranja zadnjih i bočnih vrata, i dalje je moguće da oba stanja zavise barem delimično od prirode interakcije liganada sa Trp 86. Različite kontaktne konformacije favorizuju svako od četiri moguća stanja. Budući da je Trp 86 takođe identifikovan kao ostatak koji utiče i na poluprečnik kanala glavne šupljine preko delovanja mobilne Cys 69 – Cys 96 mobilne petlje,<sup>212</sup> rezultati izgleda ukazuju da ovaj hidrofobni i bazni ostatak služi (i pomaže da se koordiniraju) višestruke važne regulatorne funkcije enzima.

Dinamičko modelovanje je igralo i važnu ulogu u prvobitnoj identifikacije mobilne Cys 69 – Cys 96 cisteinske petlje<sup>199</sup> (tzv.  $\Omega$  petlja) i karakterizovanju njenog kretanja i funkcije<sup>213</sup> (Slika 19). Omega petlja je dobila takvo ime zbog toga što je najviše konformaciono pokretni deo AChE. Fleksibilnost ove petlje je primećena prvo u MD simulacijama i postulirano je da ima ulogu analognu onoj koja je zapažena kod lipaza,<sup>214,215</sup> kao privremena kapa na aktivnom mestu, čijim se pomeranjem šupljina otvara i zatvara.<sup>199</sup> Uloga  $\Omega$  petlje je ispitivana i studijama mutageneze.<sup>216</sup> Generisane su i kinetički ispitane *HuAChE* sa sledećim mutacijama: (a) aminokiselinskih ostataka na krajevima petlje blizu dva cisteinska ostatka, (b) ostataka koji verovatno formiraju vodonične veze unutar petlje i između petlje i ostatka proteina, (c) konzerviranih prolinskih ostataka u petlji i (d) uklanjanje konzerviranog segmenta petlje od pet aminokiselinskih ostataka. Sve ove modifikacije su imale ograničen, ili nisu imale nikakav efekat na enzimsku aktivnost. Ovi rezultati ukazuju na to da  $\Omega$  petlja nema ulogu koju ima analogan strukturni fragment kod lipaza. Kada navedene mutacije aminokiselinskih ostataka petlje imaju nekakav efekat na enzimsku aktivnost, on se može pripisati različitim orijentacijama bočnog ostatka Trp 86.

Kovač i saradnici su pretpostavili pokretljivost ove petlje kao mogući razlog za postojanje različitih kanala, sugerišući da kretanje petlje otkriva prelazne aperture između tri glavna

postojana kanala u enzimu: primarne šupljine, bočnog kanala koji je sposoban da smesti katjonske proizvode kao što je holin i šupljine koja smešta nukleofile kao što je odlazeća acetil-grupa.<sup>201</sup> Dalje MD simulacije su podržale ove pretpostavke, sugerišući da vezivanje lipofilnog katjona za Trp 86 indukuje delimično odvijanje petlje u šupljinu, otvarajući pukotinu pogodnu za izlazak katjona.<sup>213</sup> Važnost ove mobilne petlje je potvrđena kinetičkim studijama, kao glavnog učesnika u alosteričnoj modulaciji katalitičke aktivnosti AChE.

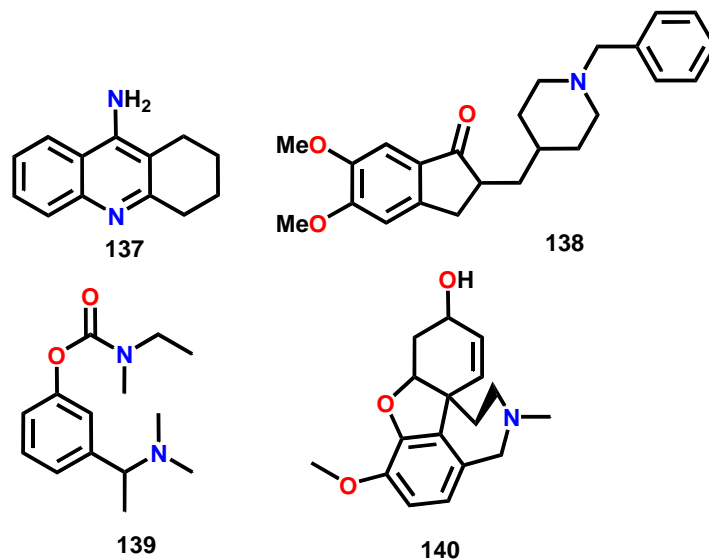


**Slika 19.** Mobilna cisteinska petlja ( $\Omega$  petlja) *HuAChE*. Ostaci Cys 69 i Cys 96 su zaokruženi i obojeni žuto.

#### 2.3.2.5. Važnost AChE i BChE kao bioloških meta za razvoj novih terapijskih sredstava

Senilna demencija Alchajmerovog tipa (AD) je progresivan neurodegenerativan poremećaj praćen opadanjem kognitivnih sposobnosti, kao što su narušena sposobnost memorije i učenja i poremećaji u ponašanju (anksioznost, depresija, halucinacije). Glavni patološki znaci bolesti, koji su povezani sa simptomima obuhvataju ekstracelularno formiranje  $A\beta$ -plakova (izvedeni iz amiloidnog prekursorškog proteina, APP), intracelularno formiranje neurofibrilarnih ugrušaka (NFT, sadrže abnormalno fosforilovan  $\tau$  protein), gubitak holinergičkih neurona i smanjeni nivoi neurotransmitera ACh u korteksu i hipokampusu i enzima koji su uključeni u njegovu sintezu i hidrolizu, holinacetiltransferaze (ChAT) i AChE.

Primarna i jedina odobrena terapijska sredstva za AD zasnovana su na holinergičkoj hipotezi, prema kojoj povećanje nivoa dostupnog ACh u neokorteksu i hipokampusu indukuje kognitivna poboljšanja kod pacijenata sa AD. Jedan od načina da se to postigne jeste inhibicija AChE. Do sada je agencija za lekove i hranu SAD (Food and Drug Administration, FDA) odobrila četiri inhibitora AChE za terapiju AD: Takrin (**137**, Cognex),<sup>217</sup> Donepezil (**138**, Aricept),<sup>218</sup> Rivastigmin (**139**, Exelon),<sup>219</sup> i Galantamin (**140**, Reminyl),<sup>220</sup> (Shema 45).



**Shema 45.** Odobreni lekovi za AD: Takrin (**137**), donepezil (**138**), rivastigmin (**139**), galantamin (**140**).

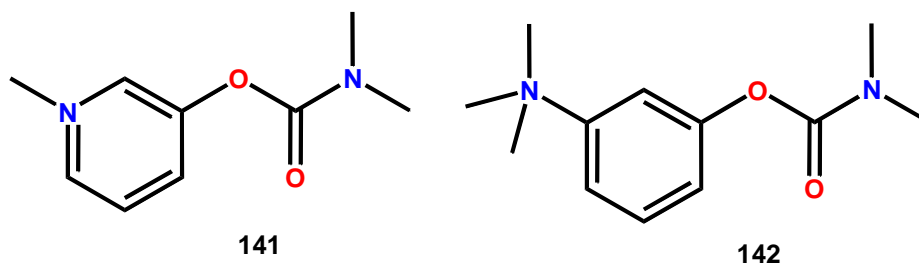
Do nedavno, inhibicija AChE je predstavljala samo simptomatsku terapiju za AD, međutim u prošloj deceniji, otkrivene su druge, nekatalitičke uloge enzima. Tako, inhibitori AChE ne samo da mogu da povećaju nivoe rezidualnog ACh i tako odlože pojavu simptoma bolesti, već ova terapijska sredstva mogu da utiču i na njen tok. Nađeno je da je AChE abnormalno ekspimirana u preamiloidnim difuznim depozitima i u zrelim A $\beta$ -plakovima<sup>221</sup> i dokazano je da enzim, vezujući se za A $\beta$ -peptide preko PAS indukuje konformacionu promenu A $\beta$ -peptida iz neamiloidogene (nepravilni heliks) u amiloidogenu ( $\beta$ -nabrana) konformaciju, koja se lako agregira i otporna je na delovanje proteaza.<sup>222,223</sup> Ovo svojstvo je nezavisno od polimerne forme AChE. Kompleksi AChE i A $\beta$ -peptida su *in vitro* toksičniji od samih A $\beta$ -peptida.<sup>224</sup> Postoje i podaci da poboljšanje holinergičke transmisije favorizuje neamiloidogeno cepanje APP (tj. cepanje  $\alpha$ -sekretazom)<sup>225</sup> i da eksperimentalno ili patološki (u AD) redukovana holinergička neurotransmisija vodi amiloidogenom APP metabolizmu (tj. cepanje APP  $\beta$ - i  $\gamma$ -

sekretazom).<sup>226,227</sup> Osim što pokazuju veću jačinu dejstva, inhibicija A $\beta$ -agregacije predstavlja još jedan razlog zašto dualni inhibitori, koji se simultano vezuju za katalitičko i PAS mesto, imaju prednost nad monomernim inhibitorima koji se vezuju samo za aktivno mesto enzima. Nesinaptička varijanta AChE je abnormalno eksprimirana u slučaju patofiziološkog stresa<sup>228,229</sup> i ekspresija AChE stimuliše ćelijsku ekspresiju i diferencijaciju.<sup>230</sup>

U protekloj deceniji i BChE je dobila značaj kao farmakološka meta za terapiju AD. Prvo je pretpostavljeno da sporedni neželjeni efekti inhibitora AChE potiču od njihove neselektivnosti prouzrokovane i inhibicijom BChE.<sup>231</sup> Međutim, samo antiemetici koji deluju na CNS su sposobni da spreče neželjene efekte, izazvane inhibitorima AChE (mučnina i povraćanje). Tako je zaključeno da su brzina i maksimalna povećanja nivoa ACh u mozgu, kao i mehanizmi njihove kompenzacije (koji povećavaju nivo dopamina), a ne inhibicija BChE, odgovorni za ove sporedne neželjene efekte.<sup>232</sup> Nađeno je da u odnosu na AChE čija se koncentracija (naročito membranske G4 forme) progresivno smanjuje tokom AD, aktivnost G1 forme BChE značajno povećava, za 30-60%.<sup>233,234</sup> Štaviše, BChE je zajedno sa AChE abnormalno eksprimirana u A $\beta$  plakovima i dodatak BChE u kulturi tkiva koje ima A $\beta$ -peptide povećava njihovu neurotoksičnost, iako mehanizam ovih efekata još uvek nije razjašnjen.<sup>235</sup> Primećeno je da selektivni inhibitori BChE, kao što je himserin i njegovi analozi redukuju ukupne nivoe APP u ćelijskoj kulturi neuroblastoma. Ovaj efekat je koncentraciono zavisian, i vodi smanjenju koncentracije A $\beta$ -peptida.<sup>236,237</sup> Iako se BChE nalazi uglavnom u glijalnim ćelijama, ovaj enzim je takođe prisutan i u sinapsi i na nervno-mišićnim spojevima<sup>238</sup> i njegova selektivna inhibicija povećava nivo ACh u sinaptičkoj pukotini. Miševi kod kojih ne dolazi do biosinteze AChE ne samo da su sposobni da prežive, već pokazuju i nepromenjenu centralnu i perifernu holinergičku neurotransmisiju, pokazujući da BChE može da kompenzuje uloge AChE i da ima rezervnu ulogu u holinergičkoj neurotransmisiji.<sup>239</sup> Postoje i podaci koji ukazuju na regulatornu ulogu BChE na ekspresiju AChE.<sup>240,241</sup> BChE ima takođe i peptidaznu aktivnost<sup>242</sup> i pretpostavljeno je da može da cepa APP slično sekretazama.<sup>243</sup> Nađeno je da cerebrospinalna tečnost pacijenata sa AD ima specifičnu formu BChE sa narušenom glikozilacijom; stoga BChE može da posluži kao dijagnostički marker za AD.<sup>244</sup>

Abnormalna ekspresija BChE i AChE i amplifikacija njihovih gena *in vivo* primećena je kod malignih poremećaja kao što je meningiom,<sup>245</sup> gliom<sup>246</sup> i neurinom,<sup>247</sup> kod raka pluća,<sup>248</sup> leukemija<sup>249</sup> i tumora jajnika.<sup>250</sup> Zbog toga se pretpostavlja da inhibitori ova dva enzima mogu da budu važna hemoterapeutska sredstva i kod malignih bolesti.

Inhibitori AChE se koriste i kao profilaktička sredstva protiv trovanja organofosfatnim bojnim otrovima. Smatra se da ova jedinjenja, vezujući se reverzibilno za AChE štite enzim od kovalentne i ireverzibilne inhibicije organofosfatima. Na taj način, nakon detoksikacije organizma reverzibilno inhibirani enzim može brže da povрати svoju funkciju, nego u slučaju da AChE mora da se sintetiše *de novo*. Jedno ovakvo jedinjenje, piridostigmin-bromid (**129**), uvedeno je u upotrebu većine armija zapadnih zemalja, uključujući i Izrael (Shema 46). Sadašnji režimi predtretmana piridostigminom (30 mg tri puta dnevno) reverzibilno inhibiraju 20-40 % enzima, što ne narušava holinergičku neurotransmisiju, zahvaljujući prisustvu dovoljnog viška AChE u telu.<sup>251</sup> Vršena su takođe i ispitivanja donepezila i hiperzina A u ove svrhe. Nađeno je da predtretman donepezilom ublažava simptome prekomerne holinergičke stimulacije,<sup>252</sup> a hiperzin A povećava LD<sub>50</sub> somana kod majmuna i nađeno je da ima neuroprotektivne osobine.<sup>253</sup>

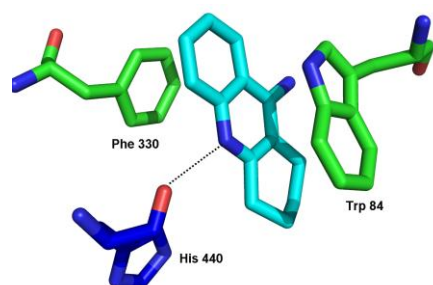


**Shema 46.** Jedinjenja koja se koriste kao profilaktička sredstva za trovanje organofosfatnim bojnim otrovima i u tretmanu mijastenije gravis: Piridostigmin (**129**) i neostigmin (**130**).

Inhibitori AChE se koriste i u tretmanu mijastenije gravis. To je autoimuna mišićna slabost prouzrokovana antitelima koja blokiraju receptore ACh na postsinaptičkom neuronu,<sup>254</sup> tako da je stimulatívni efekat ACh inhibiran. Mijastenija gravis se medicinski tretira neostigminom i piridostigminom, imunosupresantima, i u određenim slučajevima hirurški, uklanjanjem timusa (timektomijom).

### 2.3.2.6. Odabrane kristalne strukture AChE u kompleksu sa poznatim inhibitorima

Takrin (**137**, Shema 45) je prvi inhibitor AChE koji je odobren za tretiranje Alchajmerove bolesti i na tržište je izašao 1993. godine pod komercijalnim nazivom Kogneks. Danas se više ne koristi kao lek zbog hepatotoksičnosti. Harel i saradnici<sup>255</sup> su odredili kristalnu strukturu TcAChE inhibirane takrinom (PDB oznaka 1ACJ, Slika 20). Nađeno je da takrin formira steking interakcije sa bočnim ostacima aminokiselina Trp 84 i Phe 330. Protonovani aromatični azot formira vodoničnu vezu sa peptidnim kiseonikom His 440 (pripada katalitičkoj trijadi), a azot amino-grupe formira vodoničnu vezu sa čvrsto vezanim molekulom vode u aktivnom mestu.



**Slika 20.** Interakcije takrina sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom centru TcAChE, PDB oznaka 1ACJ.

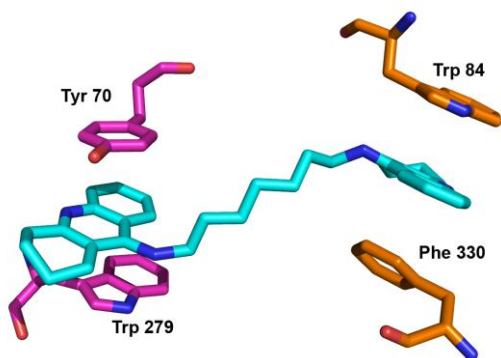
Iako je zbog nepovoljnih toksikoloških svojstava takrin povučen sa tržišta nastavilo se proučavanje derivata takrina sa poboljšanim ADME-Tox<sup>‡</sup> karakteristikama. Ovakvi naponi u protekle dve decenije, rezultovali su sintezom oko 200 različitih homo- i heterodimernih inhibitora koji sadrže takrin. Najzanimljiviji su, kako zbog svojih farmakokinetičkih karakteristika, tako i zbog načina na koji se vezuju za enzim homodimeri *bis*(7)-takrina i *bis*(5)-takrina,<sup>§</sup> pri čemu je *bis*(7)-takrin 15 puta aktivniji od *bis*(5)-takrina. Sussman i saradnici<sup>256</sup> su odredili kristalnu strukturu TcAChE inhibiranu ovim jedinjenjima (Slike 21 i 22, PDB oznake 2CKM i 2CMF). Jedan od policikličnih aromatičnih fragmenata *bis*(7)-takrina se vezuje za aktivno mesto na sličan način kao i sam takrin, između aromatičnih prstenova ostataka Trp 84 i

<sup>‡</sup> ADME (Absorption, distribution, metabolism and excretion) predstavlja akronim u farmakokinetici i farmakologiji za apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju leka. Izraz "Tox" se odnosi na toksičnost jedinjenja.

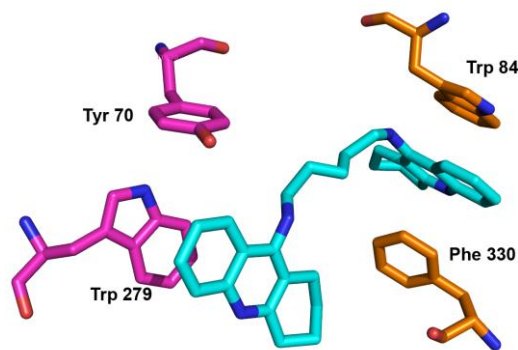
<sup>§</sup> Ovi nazivi jedinjenja se odnose na dimerne inhibitore u kojima su dve takrinske jedinice spojene polimetilenskim linkerom sa 7, odnosno 5 metilenskih jedinica.

Phe 330. Nisu zapažene konformacione promene aminokiselinskih ostataka koji pripadaju katalitičkoj trijadi u odnosu na nativnu strukturu. Heptametilenski linker prolazi kroz šupljinu aktivnog mesta i drugi takrinski prsten formira steking interakcije sa Trp 279 i Tyr 70, aminokiselinskim ostacima koji pripadaju PAS.

Kristalna struktura *TcAChE* inhibirane *bis(5)*-takrinom je posebno zanimljiva, zato što dolazi do veoma velikih konformacionih promena u enzimu usled vezivanja ovog inhibitora. Jedna od takrinskih grupa dimernog inhibitora se na sličan način vezuje za aktivno mesto kao i takrin, s tim što dovodi do međusobnog udaljavanja bočnih ostataka katalitičke trijade His 440 i Ser 200. Stoga je trijada u ovoj strukturi narušena. Takođe, atomi koji pripadaju peptidnom nizu Phe 331 se pomeraju za oko 1Å prema otvoru šupljine, što proizvodi nepovoljan sterni kontakt sa bočnim nizom Phe 288. Najveće strukturne promene usled vezivanja *bis(5)*-takrina su zapažene u oblasti Trp 279 – Ser 291 petlje koja sadrži aminokiselinske ostatke koji pripadaju acil-džepu i PAS. Atomi peptidnog niza u ovom regionu se pomeraju čak i za 4,7 Å u odnosu na njihove pozicije u nativnoj strukturi. Bočni ostaci Phe 284, Phe 288 i Phe 290 su dramatično reorijentisani, što proizvodi povećanje zapremine vezivnog acil-džepa i formiranje hidrofobne interakcije između Phe 290 i Trp 279. Druga takrinska grupa formira steking interakciju samo sa Trp 279. Premeštanje pomenute petlje indukuje i pomeranje delova molekula enzima koji se nalaze dalje od šupljine aktivnog mesta. Stoga su atomi polipeptidnog niza između Lys 325 i Phe 339 i Ile347 i Asn383 (koji se nalaze u dva heliksa) i između Leu 516 i Thr 535 (C-terminus) značajno pomereni od njihovih pozicija u nativnoj strukturi. Uprkos drastičnim konformacionim promenama koje izaziva vezujući se za enzim, *bis(5)*takrin ima 8 puta jače dejstvo prema AChE od samog takrina. Verovatno je da je jačina steking interakcija inhibitora sa Trp 279 i novoformirana interakcija između Trp 279 i Phe 290 dovoljna da se prevaziđe energetska barijera potrebna za konformacione promene koje nastaju usled vezivanja ovog inhibitora.



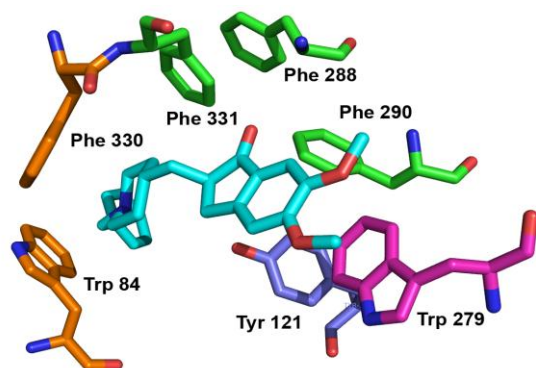
**Slika 21.** Interakcije *bis(7)*-takrina sa aminokiselinskim ostacima *TcAChE*.



**Slika 22.** Interakcije *bis(5)*-takrina sa aminokiselinskim ostacima *TcAChE*.

Donepezil (**138**, Shema 45,  $IC_{50} = 5,7 \text{ nM}$ , AChE iz mozga pacova) je najviše korišćen lek za tretiranje AD, na tržište je izašao kao Aricept. Ovo jedinjenje pokazuje odličan farmakokinetički profil. Dobro se toleriše i pokazuje značajna poboljšanja u pamćenju, globalnim fiziološkim funkcijama i aktivnostima dnevnog života. Kristalna struktura sa *TcAChE*<sup>257</sup> (1EVE, Slika 23) pokazuje da *N*-benzil-prsten donepezila formira steking interakciju sa Trp 84 i aromatičnu vodoničnu vezu sa molekulom vode 1160, koji je vezan za molekul vode 1161, a koji formira vodonične veze sa ostacima u oksianjonskoj šupljini enzima. Naelektrisani azot piperidinskog prstena formira katjon- $\pi$  interakcije sa Phe 330 i molekulom vode (1159), premošćenu vodoničnu vezu sa Tyr 121. Indanonski prsten formira steking interakciju sa Trp 279. Molekul vode 1249 se nalazi u ravni indanonskog prstena i formira vodoničnu vezu sa metoksi-grupom. Interesantno je da karbonilna grupa indanonskog fragmenta formira samo van der Waalove kontakte sa aromatičnim prstenovima Phe 331 i Phe 290 i vodom premošćen kontakt sa peptidnim azotom Phe 288. Kryger i saradnici su sugerisali da ovi van der Waalovi kontakti karbonil-grupe usmeravaju indanonski prsten tako da on može da formira steking interakciju sa Trp 279.



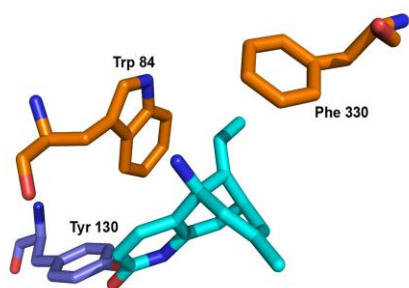


**Slika 23.** Interakcije donepezila sa aminokiselinskim ostacima TcAChE (PDB oznaka EVE).

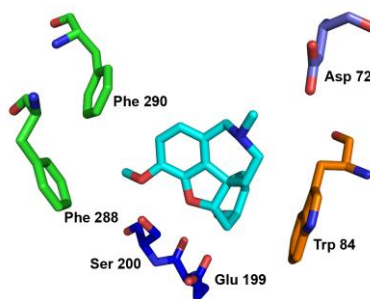
Hiperzin A je alkaloid iz biljke *Huperzia serrata* i dugo je korišćen u kineskoj tradicionalnoj medicini za tretiranje demencije kod starije populacije. Ovo jedinjenje je mešoviti tip inhibitora AChE (FBSAChE,  $K_i = 6$  nM) i 1000 puta je slabiji inhibitor BChE. Hiperzin A je trenutno ušao u III fazu kliničkih ispitivanja u Kini<sup>258</sup> i izašao je na tržište u SAD kao nutritivni dodatak za poboljšanje memorije. Ovaj lek ispoljava odličan farmakološki profil i selektivnu i dugotrajnu inhibiciju AChE sa neuroprotektivnim osobinama. Ovakve osobine hiperzina A podstakle su sintezu velikog broja strukturno sličnih analoga, koji su, međutim, u velikom broju slučajeva bili manje aktivni od vodećeg jedinjenja ili su čak bili lišeni biološke aktivnosti.<sup>259,260</sup> Kristalna struktura TcAChE kokristalisana sa hiperzinom A (1VOT, Slika 24)<sup>261</sup> pokazuje da  $\alpha$ -piridonska grupa formira dve kratke vodonične veze, jednu sa –OH grupom Tyr 130 i drugu sa očuvanim molekulom vode u aktivnom mestu enzima. Hiperzin A formira steking interakcije sa Trp 84 i Phe 330.

Galantamin (**140**, Shema 45) je četvrti inhibitor AChE u komercijalnoj upotrebi za lečenje AD. Ovo jedinjenje je alkaloid iz biljke *Galanthus Nivalis* i 53 puta je jačeg inhibicionog dejstva prema HuAChE nego prema HuBChE.<sup>262</sup> Određena kristalna struktura TcAChE kokristalisane sa galantaminom (Slika 25)<sup>263</sup> pokazuje da jedinjenje formira dve vodonične veze sa enzimom. Jedna se formira između –OH grupe galantamina i karboksilnog kiseonika Glu 199 i druga između –OH grupe Ser 200 i metoksi-kiseonika galantamina. Metoksi-grupa je smeštena u acil-džep, gde interaguje sa bočnim ostacima Phe 288 i Phe 290. Neklasična vodonična veza se formira između N-metil-grupe i karboksilnog kiseonika Asp 72. Galantamin je redak primer jedinjenja koji ne formira katjon- $\pi$  interakcije između protonovanog azota i nekog od

aromatičnih aminokiselinskih ostataka. Umesto toga dvostruka veza cikloheksenskog prstena formira steking interakciju sa Trp 84.



**Slika 24.** Interakcije hiperzina sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mestu *TcAChE* (PDB oznaka 1VOT).



**Slika 25.** Interakcije galantamina sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mestu *TcAChE* (PDB oznaka 1W6R).

### 3. NAŠI RADOVI

#### 3.1. Amidi aroilakrilnih kiselina (1a-29a) i njihova antiproliferativna i antitubulinska aktivnost

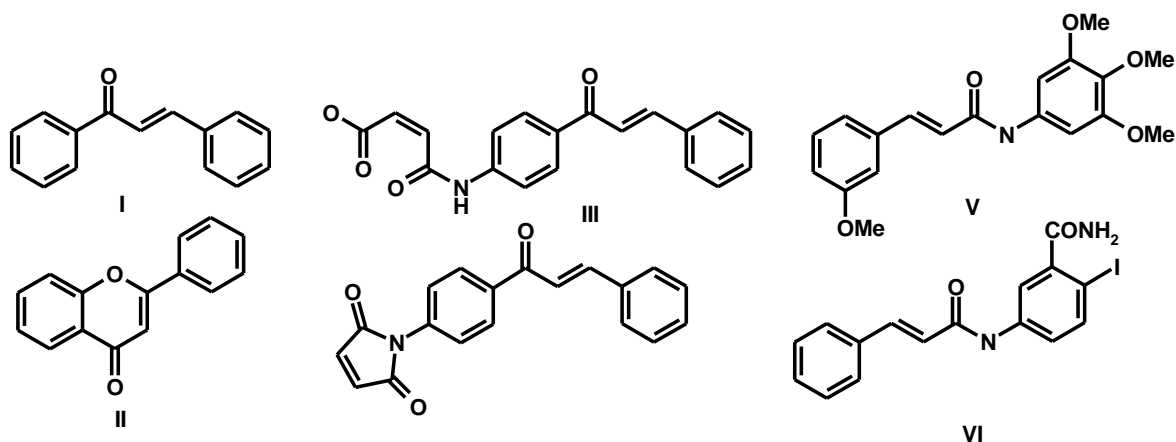
##### 3.1.1. Racionalni dizajn amida aroilakrilnih kiselina kao jedinjenja sa antiproliferativnim dejstvom

Halkoni, odnosno 1,3-diaril-2-propen-1-oni (Shema 47, **I**) predstavljaju intermedijerne prekursore kod biosinteze flavonoida (**II**). Halkonima su pripisane različite biološke aktivnosti uključujući antioksidativno,<sup>264</sup> antimalarijsko,<sup>265</sup> antileišmanijsko,<sup>266</sup> antiinflamatorno<sup>267</sup> i antitumorsko<sup>268</sup> dejstvo. Objavljene su brojne studije odnosa strukture i aktivnosti antitumorskog dejstva prirodnih i sintetičkih halkona.<sup>269</sup> Halkoni koji spadaju u biljne prirodne proizvode su obično supstituisani hidroksilnim i metoksi-grupama na prstenovima A i B, zahvaljujući biosintetičkim putevima.<sup>270</sup> Blagotvorno dejstvo prirodnih halkona se može pripisati njihovim redoks-svojstvima kao i mogućnošću da reaguju sa slobodno-radikalnim vrstama.<sup>271</sup> Osim toga, biološka aktivnost halkona se može pripisati i njihovom svojstvu da deluju kao Majklovi akceptori, reagujući sa nukleofilnim funkcionalnim grupama (pre svega –SH grupama) potencijalnih bioloških meta. Sintetički halkoni, koji ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost, uglavnom imaju –OH i –OMe supstituente na prstenovima A i B, dok je alkil supstitucija u literaturi opisana veoma retko.<sup>272</sup>

Halkoni i strukturno srodna jedinjenja ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost različitim mehanizmima dejstva. Na primer, nedavno opisani derivati halkona, inhibitori proteazoma, ispoljavaju svoje dejstvo verovatno tako što se kovalentno vezuju za biološku metu preko ketovinilne grupe.<sup>273</sup> Nedavno je pokazano da prisustvo amino-grupe u položaju 4 na prstenu A halkona, koja je protonovana na fiziološkom pH, povećava njihovu reaktivnost, a stoga i antiproliferativnu aktivnost.<sup>274</sup> Takođe je potvrđeno da *N*-alkilmaleimidi ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost inhibicijom enzima topoizomerase I.<sup>275</sup> Na osnovu ovih rezultata dizajnirane su 4'-aminohalkonmaleinske kiseline ((*Z*)-3-{4-[(*E*)-(3-fenilakriloil)]-fenilkarbamoil}-akrilna kiselina, **III**) odnosno imidi (**IV**).<sup>276</sup> Većina ovih derivata ispoljava antiproliferativnu aktivnost u niskom mikromolarnom opsegu koncentracija. Pokazano je da se

strukturno slična jedinjenja, fenilcinamidi (**V**) i cinamoil-antranilati (**VI**) interaguju sa tubulinom, narušavajući njegovu polimerizaciju, kao i ravnotežu između rastvornog tubulina i mikrotubula.<sup>277</sup> Osim halkona i njima strukturno sličnih jedinjenja, još jedan tip molekula koji sadrži ketovinilnu funkcionalnu grupu, aroilakrilne kiseline (**C**, Shema 48) ispoljava antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskim linijama humanih tumora.<sup>278</sup>

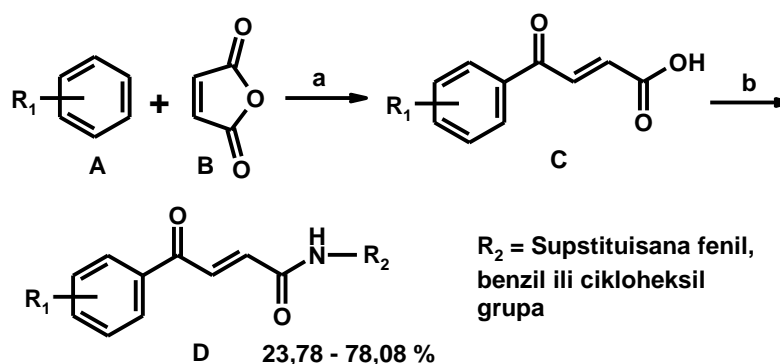
Na osnovu svega gore navedenog, odlučili smo da dizajniramo i sintetizujemo seriju hibridnih molekula koji sadrže strukturne elemente aroilakrilnih kiselina i halkona i to uvođenjem amidne grupe između  $\alpha,\beta$ -nezasićene karbonilne grupe i prstena B halkona. Sintetizovano je dvadeset i devet amida aroilakrilnih kiselina, različito supstituisanih na aroil-fenil-prstenu i amidnom delu molekula.



**Shema 47.** Strukture jedinjenja koja sadrže ketovinilnu grupu i ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost: (**I**) halkoni, (**II**) flavoni, (**III**) 4'-aminohalkon-maleinska kiselina, (**IV**) 4'-aminohalkon-maleimidi, (**V**) fenilcinamidi, (**VI**) cinamoil-antranilati.

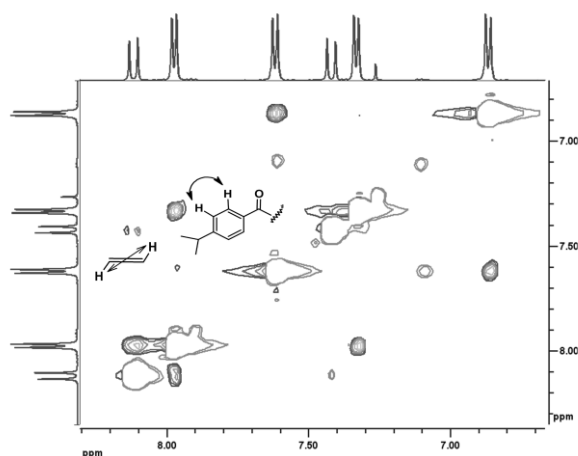
### 3.1.2. Sinteza jedinjenja 1a-29a i strukturna karakterizacija

Sintetički put do **1a-29a** je prikazan na Shemi 48. Fridel-Kraftsovo acilovanje komercijalno dostupnih supstituisanih benzena (**A**) anhidridom maleinske kiseline (**B**) dalo je aroilakrilne kiseline (**C**).<sup>279</sup> Kiseline su zatim prevedene u hloride, u suvom THF-u pomoću fosforoksihlorida, koji su *in situ* reagovali sa ekvimolarnim količinama aromatičnih ili alicikličnih amina tako da daju odgovarajuće amide **1a-29a** (**D**).

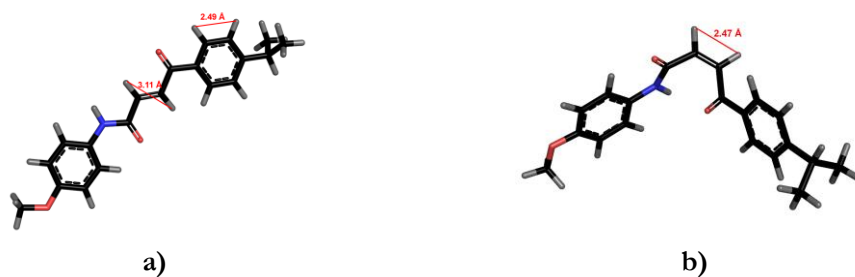


**Shema 48.** Sintetički postupak za **1a-29a**. Reagensi: (a)  $\text{AlCl}_3$  u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; (b)  $\text{POCl}_3$ , suvi THF. Za dobijanje jedinjenja **8a** i **17a**, korišćen je cikloheksilamin (**D**). Benzilamin je korišćen za dobijanje derivata **9a**, **10a**, **15a** i **17a**. Za sva ostala jedinjenja korišćen je anilin ili odgovarajuće supstituisani anilini.

Jedinjenja **1a-29a** su okarakterisana  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom visoke rezolucije sa elektrosprej jonizacijom. Vrednosti konstanti kuplovanja za vinilne protone za sve derivate iznose oko 15 Hz, što predstavlja dokaz *E* konfiguracije dvostruke veze, kod svih jedinjenja (videti Prilog 1). Takođe, NOESY spektar, snimljen za jedinjenje **11a** je pružio dodatni dokaz za *E* konfiguraciju dvostruke veze. Rastojanje između *ortho*- i *meta*-protona na aroil-prstenu je korišćeno kao referentno. Integral u NOESY spektru za  $-\text{CH}=\text{CH}-$  vinilne protone je manji od 1% izabrane referentne vrednosti (Slika 26). Isto jedinjenje sa *Z* geometrijom dvostruke veze, čija je konformacija dobijena računskim putem, na semiempirijskom nivou teorije, dalo je značajno kraće rastojanje između  $-\text{CH}=\text{CH}-$  vinilnih protona, što je i očekivano (Slika 27).



**Slika 26.** NOESY signali između  $-\text{CH}=\text{CH}-$  protona i između *ortho*- i *meta*- protona na aroil-prstenu derivata **11a**.



Slika 27. Optimizovane geometrije derivata **11a** u a) (*E*)- i b) (*Z*)-konformaciji.

### 3.1.2.1. <sup>1</sup>H NMR spektri jedinjenja **1a-29a**

<sup>1</sup>H NMR spektri derivata **1a-29a** (Tabela 2.) su dati u Prilogu 1. Signali protona metil grupa u *m*- i *o*- položaju kod 2,5-dimetil-supstituisanih jedinjenja **2a** i **9a** se nalaze u oblasti od oko 2,30 *ppm* za metil-grupu u *m*- položaju, odnosno od 2,38 do 2,50 *ppm* za metil-grupe u *o*- položaju aroil fragmenta molekula. Kod jedinjenja **22a** (tetrametil supstituisan derivat), signali protona dve metil-grupe u *m*- položaju se nalaze na nešto nižim  $\delta$  vrednostima od oko 2,03 *ppm*. Kod jedinjenja **29a** (3,5-diMe-4-OMe supstituisan derivat) signali protona dve metil-grupe u *m*- položaju se nalaze na 2,19 i 2,54 *ppm*. Kod 3,4-dimetil-supstituisanih jedinjenja **3a**, **4a** i **5a** signali protona dve metil-grupe u *m*- i *p*- položajima na aroil-fenil-delu molekula su međusobno veoma bliski (u nekim slučajevima i preklapljeni) i nalaze se u oblasti  $\delta$  od 2,29 do 2,33 *ppm*. Kod spektara 4-*i*-Pr (**5a**, **14a** i **18a** – na fenilamidnom i **6a-8a**, **10a** i **11a** na aroil-fenil-prstenu molekula) i 2,4-di-*i*-Pr (**12a-15a**) supstituisanih jedinjenja, karakterističan je dublet koji potiče od metil-grupa izopropil-supstituenta molekula. Ovi signali se nalaze u oblasti  $\delta$  od 1,17 do 1,29 *ppm*, sa konstantama kuplovanja u opsegu vrednosti 6,50 – 7,30 Hz. Proton koji pripada metinskoj grupi izopropil-supstituenta daje karakterističan heptet na vrednostima od 2,84 do 3,42 *ppm*. Kod tetralinil-supstituisanih derivata (**16a-20a**) karakteristična su dva šira signala koji potiču od dva tipa hemijski neekvivalentnih metilenskih protona tetralinil-grupe. Signali ovih protona se nalaze u oblastima  $\delta$  1,79-1,83 *ppm* i 2,79-2,82 *ppm*. U <sup>1</sup>H NMR spektru derivata **21a** su prisutna četiri signala, karakterističnog multipliciteta, koji odgovaraju protonima *n*-butil-grupe na aroil-fenil-delu molekula i nalaze se na 0,91, 1,32, 1,59 i 2,68 *ppm*. Signali protona metoksi-grupa u *p*-položaju na aroil-fenil prstenu derivata **27a-29a** imaju oblik singleta i nalaze se u oblasti 3,80-3,90 *ppm*. Singlet metoksi-grupa kod 3,5-di-OMe-supstituisanih derivata (**4a**, **7a**, **11a**, **13a**, **16a** i **22a**) se nalazi u oblasti 3,67 - 3,78 *ppm*. Signali koji potiču od protona cikloheksil-grupa (jedinjenja **8a** i **17a**) daju šest grupa multiplleta koji se nalaze u oblasti od 1,16

do 3,93 ppm. Kod derivata sa benzil-grupom na amidnom delu molekula (**9a**, **10a**, **15a**, **19a**) karakterističan je dublet koji potiče od protona metilenske grupe i koji se nalazi na oko 4,50 ppm sa konstantama kuplovanja oko 5,90 Hz.

U spektrima jedinjenja koja imaju nesupstituisanu fenilamidnu grupu (**1a-3a**, **6a**, **12a**, **20a**, **21a**, **23a-27a**) karakterističan je triplet koji potiče od aromatičnih protona u *p*- položaju fenilamidne grupe. Ovaj signal se nalazi u oblasti  $\delta$  7,10-7,15 ppm, sa konstantama kuplovanja od 6,97 do 7,63 Hz. Signali protona fenilamidnog prstena u *o*- i *m*- položajima su obično preklopljeni sa signalima drugih aromatičnih protona. U spektrima 3,4-dimetilsupstituisanih jedinjenja (**3a**, **4a** i **5a**) se nalaze tri karakteristična signala koja potiču od aromatičnih protona aroil-fragmenta molekula. Dubleti koji potiču od protona u *m*- položaju se nalaze na 7,25 ppm sa konstantama kuplovanja od oko 7,75 Hz. Protoni u *o*- položajima daju dublet u oblasti 7,80-7,88 ppm, sa konstantama kuplovanja od 7,88 do 8,32 Hz i singlet u oblasti  $\delta$  od 7,83 do 7,85 Hz. Kod 2,4-di-*i*-Pr supstituisanih derivata (**12a-15a**) aromatični *m*-proton, koji se nalazi između dve izopropil-grupe daje singlet u oblasti  $\delta$  7,09-7,28 ppm; drugi *m*-proton daje dublet u oblasti  $\delta$  7,30-7,37 ppm sa  $J = 7,67-8,06$  Hz a *o*-proton daje dublet u oblasti  $\delta$  7,38-7,43 ppm, sa  $J = 7,65-8,06$  Hz. U spektrima derivata koji imaju 4-*i*-Pr grupu na aroil-fenil prstenu (**6a-8a**, **10a** i **11a**) se nalaze dva karakteristična dubleta koji pripadaju *o*- i *m*- protonima aroil-fragmenta; signali *m*- protona se nalaze na  $\delta$  vrednostima 7,33-7,38 ppm, sa konstantama kuplovanja u opsegu  $J = 8,12 - 8,50$  Hz, signali *o*- protona u oblasti  $\delta$  7,83-8,00 ppm, sa  $J = 6,74-8,50$  Hz. U spektrima derivata koji imaju 4-*i*-Pr-grupu na fenilamidnom delu molekula (**5a**, **14a**, i **18a**) signali aromatičnih *o*- i *m*- protona se nalaze na nešto nižim  $\delta$  vrednostima u odnosu na signale odgovarajućih protona na aroil-fenil prstenu; signali *m*- protona se nalaze na  $\delta$  vrednostima 7,15-7,20 ppm, sa konstantama kuplovanja oko 8,50 Hz, signali *o*- protona u oblasti  $\delta$  7,59-8,00 ppm, sa  $J = 7,27-8,58$  Hz. Takođe, ostala jedinjenja sa *para*-supstituisanim aroil-prstenom (**11a**, **21a**, **23a**, **24a**, **26a** i **27a**) daju dva karakteristična dubleta koji potiču od protona na aroil-fragmentu molekula; signali *m*- protona se nalaze u oblasti 6,86-7,82 ppm sa  $J = 7,87-9,06$  Hz, a signali *o*- protona u oblasti 7,62-8,17 ppm sa  $J = 8,26-9,03$  Hz. Kod tetralinil-supstituisanih derivata (**16a-20a**) *m*-proton na aroil fenil prstenu daje dublet na vrednostima  $\delta$  u oblasti 7,13-7,19 ppm, sa vrednostima konstanti kuplovanja u opsegu  $J = 8,06-8,56$  Hz. Signali preostala dva *o*- protona na aroil-prstenu su preklopljeni i nalaze se u oblasti 7,65-7,78 ppm.

Kod 3,5-dimetoksi-supstituisanih derivata (**4a**, **7a**, **13a**, **16a**, **22a** i **28a**) *p*-proton na fenilamidnom prstenu daje signal sličan tripletu na vrednosti  $\delta$  oko 6,25 *ppm*, a dva *o*-protona daju dva veoma bliska singleta na vrednostima  $\delta$  6,80 i 7,00 *ppm*. Signal koji potiče od amidnog -NH- protona se nalazi na najvišim  $\delta$  vrednostima u oblasti 8,11-10,61 *ppm*. Osim u slučaju cikloheksil- i benzilamidnih derivata, gde se signal protona amidne grupe nalazi između 6,50 i 6,80 *ppm*.

#### 3.1.2.2. <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja **1a-29a**

<sup>13</sup>C NMR spektri su dati u Prilogu 2. U <sup>13</sup>C NMR spektrima **1a-29a** signali ugljenika aroil-karbonilne grupe se nalaze na najvišem hemijskom pomeranju, i to u oblasti 187,85 - 201,92 *ppm*. Na nešto nižim  $\delta$  vrednostima nalaze se signali ugljenika amidne karbonilne grupe, u oblasti 161,46 - 164,40 *ppm*. Signali alifatičnih atoma ugljenika, koji potiču od supstituenata na aroil- i fenilamidnom prstenu, se nalaze u oblasti  $\delta$  16,19 – 55,60 *ppm*.

#### 3.1.3. Biološka aktivnost jedinjenja **1a-29a**

##### 3.1.3.1. Antiproliferativna aktivnost jedinjenja **1a-29a**

Prethodno je pokazano da aroilakrilne kiseline ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskim linijama humanih tumora u mikromolarnom opsegu koncentracija.<sup>278</sup> Cilj ove studije bio je da se ispita uticaj zamene karboksilne grupe aroilakrilnih kiselina cikloalkilamidnom ili arilamidnom funkcionalnom grupom na antiproliferativnu aktivnost.<sup>280</sup> Prisustvo dva pogodno supstituisana aromatična prstena vezana direktno ili preko linkera koji sadrži najviše do 4 metilenske jedinice, i to na takav način da su ovi prstenovi prostorno bliski, ali ne i koplanarni, jeste ključna strukturna karakteristika brojnih antitumorskih agenasa, a naročito onih koji ispoljavaju antitubulinsku aktivnost.<sup>281</sup>

Antiproliferativna aktivnost jedinjenja **1a-29a** je testirana prema tri ćelijske linije humanih tumora: HeLa (humani cervikalni karcinom), FemX (humani melanom) i K562 (hronična mijeloidna leukemija). Rezultati su prikazani u Tabeli 2. Većina jedinjenja ispoljava antiproliferativnu aktivnost pri nižim koncentracijama u poređenju sa aroilakrilnim kiselinama koje imaju isti tip supstitucije na aroil-delu molekula.



HeLa ćelije su najmanje osjetljive na dejstvo jedinjenja **1a-29a**, sa  $IC_{50}$  vrednostima u niskom mikromolarnom opsegu koncentracija za većinu derivata. Jedinjenja koja imaju alikl-supstituente u položajima 2 i 5 ili 2 i 4 na aroil-fenil-prstenu (**2a**, **12a**, **13a**, **14a** i **22a**) ispoljavaju jačinu antiproliferativnog dejstva u submikromolarnim koncentracijama prema HeLa ćelijama. Sličan odnos između načina supstitucije na aroil-fenil-prstenu i antiproliferativne aktivnosti zapažen je i kod aroilakrilnih kiselina.<sup>278</sup> Uticaj strukturnih varijacija amidnog dela molekula na antiproliferativnu aktivnost, ne može se interpretirati na jednoznačan način, budući da kod nekih jedinjenja isti tip supstitucije prouzrokuje neznatno smanjenje, a kod nekih neznatno povećanje jačine dejstva, u odnosu na nesupstituisane derivate. Međutim, zapaženo je da ovalniji molekuli, koji imaju veću nepolarnu površinu (*apolar surface area*, ASA) ispoljavaju nešto veću jačinu dejstva (odjeljak 3.1.4, Tabela 5).

Većina aroil-alkil-supstituisanih derivata sa nesupstituisanim fenil-grupama na amidnom delu molekula, je aktivno u submikromolarnim koncentracijama prema FemX ćelijama. Derivat sa najmanjom jačinom dejstva je nesupstituisano jedinjenje **1a**, kao i jedinjenja koja imaju halogen ili metoksi-supstituent na aroil-fenil-prstenu (**23a-27a**), sa  $IC_{50}$  vrednostima većim od 2  $\mu$ M. Prisustvo 4-*i*-Pr supstituenta na fenilamidnom prstenu molekula (**5a**, **14a**, **18a**) neznatno smanjuje jačinu antiproliferativnog dejstva u poređenju sa nesupstituisanim derivatima na fenilamidnom prstenu. 3,5-di-MeO Supstitucija na fenilamidnom prstenu ima nepovoljan uticaj na antiproliferativnu aktivnost, u poređenju sa drugim jedinjenjima. Druge specifične strukturne karakteristike od izarazitog uticaja na antiproliferativnu aktivnost derivata **1a-29a** prema FemX ćelijama nisu zapažene.

K562 ćelije su najosetljivije prema dejstvu jedinjenja **1a-29a**. Većina jedinjenja ima  $IC_{50}$  vrednosti u uskom submikromolarnom opsegu koncentracija od 0,34 do 0,82  $\mu$ M. Izuzetak predstavljaju nesupstituisan derivat **1a** i jedinjenja **5a** i **27a**.

Većina jedinjenja iz seta sadrži fenilamidnu ili 3,5-dimetoksi-supstituisanu fenilamidnu grupu. Zapaženo je da kod fenilamidnih derivata (**1a-3a**, **6a**, **12a**, **20a**, **21a**, **23a**, **24a-27a**) jedinjenja koja imaju lipofilniju aroil-fenil-grupu ispoljavaju antiproliferativno dejstvo sa nešto nižim  $IC_{50}$  vrednostima. Isti trend je zapažen i za jačinu dejstva 3,5-dimetoksifenilamidnih derivata (**4a**, **7a**, **13a**, **16a**, **22a**, **28a**, **29a**) prema HeLa ćelijama. Sa druge strane, manje lipofilni

3,5-dimetoksi-supstituisani fenilamidni derivati ispoljavaju nešto veću jačinu dejstva prema FemX i K562 ćelijama (uporediti npr. **28a** i **13a**). Nekoliko jedinjenja ispoljava aktivnost prema svim ćelijskim linijama u submikromolarnim koncentracijama. To su derivati **2a**, **12a**, **13a**, **14a** i **22a**.

**Tabela 2.** Antiproliferativna aktivnost amida aroilakrilnih kiselina (**1a-29a**) prema ćelijskim linijama humanih tumora.

Jedinjenje	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)*		
			HeLa	FemX	K562
<b>1a</b>	H	Ph-	4,91 ± 0,99	2,20 ± 0,50	5,30 ± 0,08
<b>2a</b>	2,5-di-Me	Ph-	0,74 ± 0,13	0,62 ± 0,13	0,34 ± 0,08
<b>3a</b>	3,4-di-Me	Ph-	2,95 ± 0,27	1,84 ± 0,65	0,72 ± 0,19
<b>4a</b>	3,4-di-Me	3,5-di-OMe-Ph-	2,89 ± 0,24	1,17 ± 0,22	0,45 ± 0,01
<b>5a</b>	3,4-di-Me	4- <i>i</i> -Pr-Ph-	2,84 ± 0,15	1,79 ± 0,01	1,12 ± 0,15
<b>6a</b>	4- <i>i</i> -Pr	Ph-	3,09 ± 1,78	0,64 ± 0,13	0,48 ± 0,02
<b>7a</b>	4- <i>i</i> -Pr	3,5-di-OMe-Ph-	1,98 ± 0,24	0,75 ± 0,21	0,45 ± 0,08
<b>8a</b>	4- <i>i</i> -Pr	Ch-	1,38 ± 0,65	0,81 ± 0,03	0,55 ± 0,08
<b>9a</b>	2,5-di-Me	Bn-	2,24 ± 0,79	1,48 ± 0,54	1,19 ± 0,42
<b>10a</b>	4- <i>i</i> -Pr	Bn-	1,37 ± 0,11	0,49 ± 0,21	0,34 ± 0,01
<b>11a</b>	4- <i>i</i> -Pr	4-OMe-Ph-	2,92 ± 0,04	1,06 ± 0,07	0,68 ± 0,16
<b>12a</b>	2,4-di- <i>i</i> -Pr	Ph-	0,68 ± 0,13	0,59 ± 0,15	0,38 ± 0,10
<b>13a</b>	2,4-di- <i>i</i> -Pr	3,5-di-OMe-Ph-	0,83 ± 0,61	0,95 ± 0,06	0,71 ± 0,18
<b>14a</b>	2,4-di- <i>i</i> -Pr	4- <i>i</i> -Pr-Ph	0,75 ± 0,29	0,78 ± 0,06	0,39 ± 0,06
<b>15a</b>	2,4-di- <i>i</i> -Pr	Bn-	1,52 ± 0,39	1,01 ± 0,09	0,73 ± 0,07
<b>16a</b>	β-tetralinil	3,5-di-OMe-Ph-	2,67 ± 0,82	1,26 ± 0,29	0,70 ± 0,11
<b>17a</b>	β-tetralinil	Ch-	2,14 ± 0,30	0,99 ± 0,05	0,52 ± 0,13
<b>18a</b>	β-tetralinil	4- <i>i</i> -Pr-Ph-	1,80 ± 0,17	1,02 ± 0,09	0,41 ± 0,04
<b>19a</b>	β-tetralinil	Bn-	1,63 ± 0,44	0,80 ± 0,15	0,36 ± 0,01
<b>20a</b>	β-tetralinil	Ph-	2,11 ± 0,09	0,73 ± 0,16	0,52 ± 0,06
<b>21a</b>	4- <i>n</i> -Bu	Ph-	1,06 ± 0,30	0,62 ± 0,06	0,45 ± 0,02
<b>22a</b>	2,3,5,6-tetra-Me	3,5-di-OMe-Ph-	0,86 ± 0,53	0,65 ± 0,15	0,55 ± 0,05
<b>23a</b>	4-F	Ph-	2,99 ± 0,65	0,63 ± 0,32	0,55 ± 0,07
<b>24a</b>	4-Cl	Ph-	2,91 ± 0,29	2,84 ± 0,37	0,61 ± 0,07
<b>25a</b>	3,4-di-Cl	Ph-	2,80 ± 0,07	2,30 ± 0,28	0,51 ± 0,10
<b>26a</b>	4-Br	Ph-	2,29 ± 0,98	2,30 ± 0,33	0,40 ± 0,12
<b>27a</b>	4-OMe	Ph-	3,50 ± 0,54	2,34 ± 0,48	1,31 ± 0,25
<b>28a</b>	4-OMe	3,5-di-OMe-Ph-	2,55 ± 0,35	0,52 ± 0,09	0,38 ± 0,03
<b>29a</b>	3,5-di-Me-4-OMe	3,5-di-OMe-Ph-	1,36 ± 0,38	0,76 ± 0,33	0,82 ± 0,35
<b>Kolhicin</b>	/	/	4,4 ± 0,30	4,7 ± 0,30	5,7 ± 0,30

\*Koncentracija jedinjenja koja 50% inhibira proliferaciju ćelija.

### 3.1.3.2. Antitubulinska aktivnost jedinjenja **1a-29a**

Razmatrajući mogući mehanizam kojim jedinjenja **1a-29a** ispoljavaju antiproliferativno dejstvo, prepostavili smo da tubulin može da bude jedna od bioloških meta jedinjenja. Ova prepostavka je zasnovana na strukturnoj sličnosti naših jedinjenja sa fenilcinamidima (**V**) i cinamoil-antranilatima (**VI**), Shema 47. Ispitano je da li jedinjenja inhibiraju polimerizaciju tubulina, odn. mikrotubula. Kombretastatin A4 je korišćen kao referentno jedinjenje.

Rezultati ispitivanja inhibicije polimerizacije tubulina su prikazani u Tabeli 3. Četrnaest derivata inhibira polimerizaciju tubulina sa  $IC_{50}$  vrednostima ispod  $20 \mu\text{M}$ . Derivat sa najvećom jačinom dejstva je nesupstituisano jedinjenje **1a**, ( $IC_{50} = 2,9 \mu\text{M}$ ). Sva ostala aktivna jedinjenja su supstituisana malim supstituentima na aroil-fenil-prstenu i imaju nesupstituisan fenilamidni prsten. Jedinjenja supstituisana 4-*i*-Pr ili 3,5-diOMe supstituentima na fenilamidnom prstenu, ispoljavaju veoma slabu jačinu dejstva ili su potpuno neaktivna. Halogen ili metoksi-supstituisani derivati (**23a-27a**) koji pokazuju slabu antiproliferativnu aktivnost u poređenju sa ostalim jedinjenjima su vrlo aktivni kao inhibitori polimerizacije tubulina. Četiri jedinjenja (**12a**, **13a**, **14a** i **22a**) od pet koji imaju najveću jačinu antiproliferativnog dejstva su potpuno neaktivna u testu inhibicije polimerizacije tubulina. Prema tome, odnos strukture i aktivnosti za inhibiciju polimerizacije tubulina jedinjenja **1a-29a** je potpuno različit od odnosa strukture i antiproliferativne aktivnosti.

Da bi ispitali mesto vezivanja jedinjenja za tubulin, testirano je trinaest jedinjenja u odnosu na inhibiciju vezivanja kolhicina za tubulin. Rezultati ovih ispitivanja su dati u Tabeli 3. Jedinjenja su testirana u koncentracijama od 5 i  $50 \mu\text{M}$ . Sva ispitivana jedinjenja su pokazala skromnu inhibiciju vezivanja kolhicina za tubulin. Najaktivniji inhibitori vezivanja kolhicina za tubulin su jedinjenja **1a**, **2a**, **23a**, koja su takođe i najbolji inhibitori polimerizacije tubulina. Prema tome, najaktivniji inhibitori polimerizacije tubulina iz ispitivanog seta jedinjenja (**1a-29a**) se verovatno vezuju za kolhicinsko vezivno mesto. U literaturi je sličan odnos strukture i aktivnosti opisan kod halkona, strukturno srodnih našim jedinjenjima, koji ispoljavaju antitubulinsko dejstvo.<sup>282</sup>

**Tabela 3.** Inhibicija polimerizacije tubulina i inhibicija vezivanja kolhicina jedinjenjima **1a-29a**

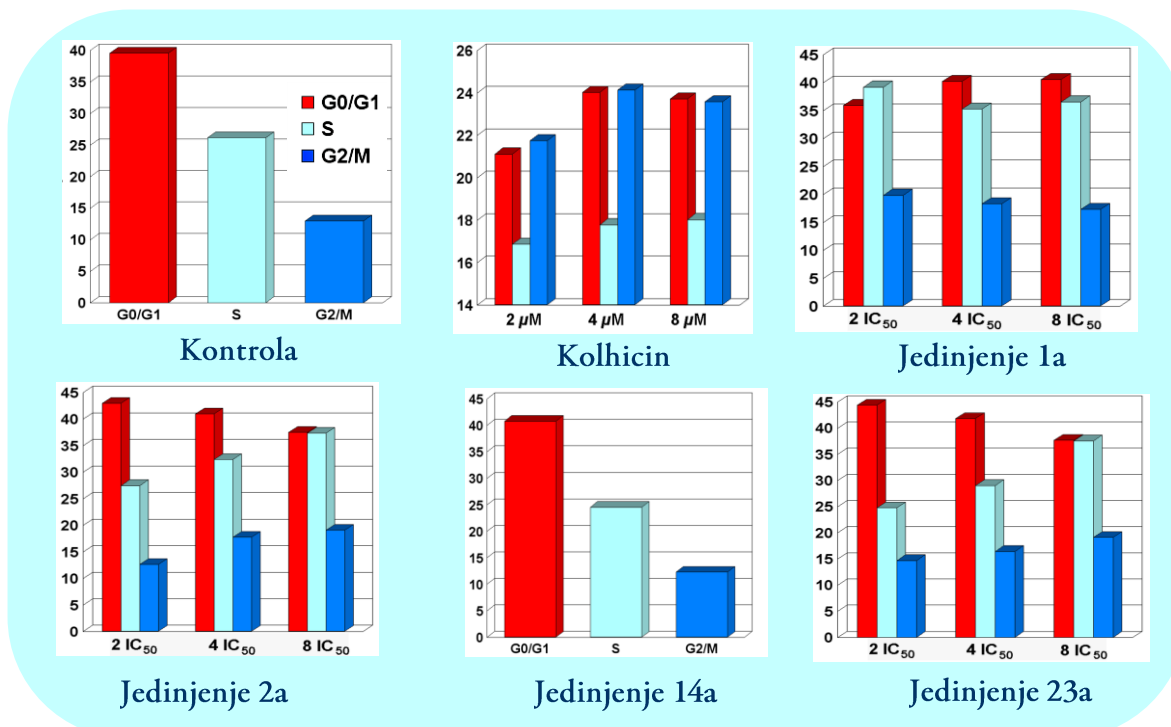
R. Br. Jed.	Inhibicija polimerizacije tubulina	Inhibicija vezivanja kolhicina za tubulin (% $\pm$ SD)	
	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M $\pm$ SD)	50 $\mu$ M	5 $\mu$ M
<b>1a</b>	2,9 $\pm$ 0,3	39 $\pm$ 5	24 $\pm$ 0,8
<b>2a</b>	5,2 $\pm$ 0,2	38 $\pm$ 1	9,3 $\pm$ 3
<b>3a</b>	6,5 $\pm$ 0,08	14 $\pm$ 5	7,0 $\pm$ 4
<b>4a</b>	> 20	/	/
<b>5a</b>	> 20	/	/
<b>6a</b>	9,7 $\pm$ 1	25 $\pm$ 2	3,1 $\pm$ 3
<b>7a</b>	> 20	/	/
<b>8a</b>	11 $\pm$ 2	14 $\pm$ 0,8	9,6 $\pm$ 5
<b>9a</b>	8 $\pm$ 0,08	19 $\pm$ 4	12 $\pm$ 0,01
<b>10a</b>	> 20	/	/
<b>11a</b>	> 20	/	/
<b>12a</b>	> 20	/	/
<b>13a</b>	> 20	/	/
<b>14a</b>	> 20	/	/
<b>15a</b>	> 20	/	/
<b>16a</b>	> 20	/	/
<b>17a</b>	11 $\pm$ 0,07	13 $\pm$ 2	8,9 $\pm$ 2
<b>18a</b>	> 20	/	/
<b>19a</b>	> 20	/	/
<b>20a</b>	18 $\pm$ 0,9	/	/
<b>21a</b>	11 $\pm$ 0,1	20 $\pm$ 5	2,7 $\pm$ 4
<b>22a</b>	> 20	/	/
<b>23a</b>	3,5 $\pm$ 0,3	31 $\pm$ 4	11 $\pm$ 3
<b>24a</b>	11 $\pm$ 0,6	19 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 1
<b>25a</b>	10 $\pm$ 2	20 $\pm$ 5	0,3 $\pm$ 2
<b>26a</b>	8,6 $\pm$ 0,5	28 $\pm$ 4	6,2 $\pm$ 3
<b>27a</b>	7,8 $\pm$ 1	24 $\pm$ 2	5,9 $\pm$ 5
<b>28a</b>	> 20	/	/
<b>29a</b>	> 20	/	/
<b>Kombretastatin A-4</b>	1,2 $\pm$ 0,007	/	99 $\pm$ 0,7

Jedinjenja koja se vezuju za tubulin, narušavaju njegovu polimerizaciju i utiču na dinamičko ponašanje mikrotubula, ispoljavaju i karakteristične efekte na raspodelu ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa, izazivajući porast broja ćelija u G2/M fazi. Zbog toga je ispitan uticaj četiri jedinjenja (**1a**, **2a**, **14a** i **23a**) na ćelijski ciklus. Jedinjenja **1a**, **2a** i **23a** inhibiraju polimerizaciju tubulina u koncentracijama ispod 10  $\mu$ M i u određenom obimu sprečavaju vezivanje kolhicina za tubulin. Ovi derivati imaju nešto nižu jačinu dejstva u testu antiproliferativne aktivnosti, u poređenju sa ostalim jedinjenjima iz seta. Za razliku od njih, jedinjenje **14a** ne inhibira polimerizaciju tubulina, ali ispoljava antiproliferativnu aktivnost u submikromolarnim koncentracijama. Analiza uticaja jedinjenja na ćelijski ciklus je urađena

citofluorimetrijskom metodom, DNK K562 ćelija je obeležena propidijum-jodidom, a kolhicin je korišćen kao referentno jedinjenje. Rezultati ovih ispitivanja su dati u Tabeli 4 i na Slici 28. Jedinjenje **1a** prouzrokuje povećanje broja (odn. procentualnog udela) ćelija u G2/M fazi, ali bez koncentracione zavisnosti. Za razliku od toga, jedinjenja **2a** i **23a** prouzrokuju porast broja ćelija u G2/M fazi na koncentraciono zavistan način. Jedinjenje **14a** ne izaziva porast broja ćelija u G2/M fazi čak i na koncentracijama osam puta većim od IC<sub>50</sub> vrednosti. Međutim, povećanje udela ćelija u G2/M fazi izazvano jedinjenjima **1a**, **2a** i **23a** je značajno skromnije od efekata kolhicina i strukturno srodnih jedinjenja. Stoga se čini verovatnim da postoji najmanje još jedan molekularni mehanizam kojim ova jedinjenja ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost. Jedinjenja **1a-29a** su jaki Majklovi akseptori, pa mogu delovati kao alkilujuć agensi koji se kovalentno vezuju za tiolne ili amino grupe brojnih makromolekula (potencijalnim biološkim metama) unutar ćelije.

**Tabela 4.** Analiza ćelijskog ciklusa

R. Br. Jed.	Koncentracija	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Kontrola	/	39,55	26,17	12,95
<b>1a</b>	2 x IC <sub>50</sub>	35,93	39,18	19,84
	4 x IC <sub>50</sub>	40,24	35,26	18,32
	8 x IC <sub>50</sub>	40,56	36,54	17,30
<b>2a</b>	2 x IC <sub>50</sub>	42,92	27,44	12,57
	4 x IC <sub>50</sub>	40,94	32,37	17,72
	8 x IC <sub>50</sub>	37,48	37,32	19,04
<b>23a</b>	2 x IC <sub>50</sub>	44,38	24,74	14,67
	4 x IC <sub>50</sub>	41,80	29,01	16,41
	8 x IC <sub>50</sub>	37,70	37,56	19,13
<b>14a</b>	8 x IC <sub>50</sub>	40,76	24,52	12,30
<b>Kolhicin</b>	2 μM	21,12	16,86	21,75
	4 μM	24,03	17,78	24,14
	8 μM	23,71	18,02	23,58



Slika 28. Analiza ćelijskog ciklusa K562 ćelija 24 h posle izlaganja ćelija jedinjenjima **1a**, **2a**, **14a** i **23a** u koncentraciji 2-8 IC<sub>50</sub> vrednosti.

### 3.1.3.3 Akutna toksičnost in vivo jedinjenja **23a**

Jedinjenje **23a** je izabrano za test akutne toksičnosti. Ovo jedinjenje ispoljava značajnu antiproliferativnu aktivnost prema sve tri ispitivane ćelijske linije humanih tumora, a takođe ima izražen efekat inhibicije polimerizacije tubulina. Predstavlja takođe jedini fluoro-supstituisani derivat u setu, što ga verovatno čini stabilnijim prema metaboličkoj degradaciji citohromima<sup>283</sup> u odnosu na ostala jedinjenja. Zbog nedovoljne rastvorljivosti u vodi, kao i odsustva jonizabilnih grupa na molekulu, koje bi omogućile da se naprave odgovarajuće soli i tako poboljša rastvorljivost u vodi, jedinjenje je rastvoreno u dimetilsulfoksidu i dato miševima oralno. Određena LD<sub>50</sub> vrednost za jedinjenje **23a** iznosi 45 mg/kg, pa tako ovo jedinjenje spada u red toksičnih supstanci. Neophodne su dalje strukturne modifikacije amida aroilakrilnih kiselina (**1a-29a**) kako bi se smanjila njihova toksičnost *in vivo*.

### 3.1.4. Molekulsko modelovanje

Svi sintetizovani derivati (**1a-29a**) ispoljavaju značajnu antiproliferativnu aktivnost, ali u relativno uskom opsegu IC<sub>50</sub> vrednosti, što ne dozvoljava da se izvedu statistički značajne

kvantitativne korelacije između odgovarajućih molekulskih deskriptora kojim je opisana struktura jedinjenja i njihove biološke aktivnosti. Zbog toga nije urađena klasična kvantitativna analiza odnosa strukture i aktivnosti (QSAR). Međutim, zapaženo je da su jedinjenja koja imaju površinu dostupnu rastvaraču (tzv. *solvent accesable area*) manju od 620 Å<sup>2</sup> i zapreminu manju od 305 Å<sup>3</sup>, aktivna u testu inhibicije polimerizacije tubulina, odnosno inhibiraju polimerizaciju tubulina sa IC<sub>50</sub> vrednostima manjim od 20 μM. Kvantitativne vrednosti izračunatih molekulskih deskriptora izvedenih iz 3D struktura jedinjenja su prikazane u Tabeli 5.

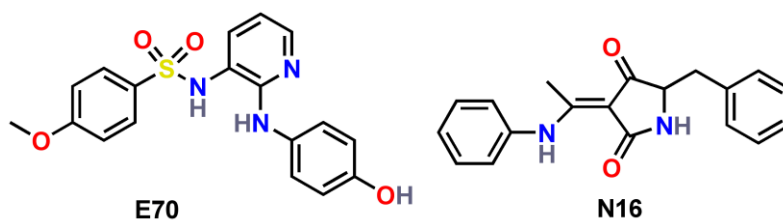
**Tabela 5.** Molekulski deskriptori izvedeni iz 3D struktura jedinjenja **1a-29a**, na osnovu konformacija dobijenih programom OMEGA uz upotrebu MMFF94s polja sila.

R. br. jed.	R <sub>1</sub> -	R <sub>2</sub> -	Površina dostupna rastvaraču, (Å <sup>2</sup> )	Nepolarna površina, (Å <sup>2</sup> )	Zapremina, (Å <sup>3</sup> )	Ovalnost	VlogP
1a*	H	Ph-	509,9	428,9	235,5	1,5535	2,1945
2a*	2,5-di-Me	Ph-	569,9	489,7	263,0	1,6393	3,0778
3a*	3,4-di-Me	Ph-	554,8	475,2	267,1	1,6063	2,9708
4a	3,4-di-Me	3,5-di-OMe-Ph-	633,3	518,6	316,4	1,6909	3,1674
5a	3,4-di-Me	4- <i>i</i> -Pr-Ph-	637,9	558,2	315,2	1,7245	4,0284
6a*	4- <i>i</i> -Pr	Ph-	591,7	513,6	288,1	1,6694	3,2755
7a	4- <i>i</i> -Pr	3,5-di-OMe-Ph-	676,1	561,4	332,6	1,7442	3,5008
8a	4- <i>i</i> -Pr	Ch-	621,6	548,6	303,5	1,7289	3,4775
9a*	2,5-di-Me	Bn-	621,6	548,6	303,5	1,7289	3,4775
10a#	4- <i>i</i> -Pr	Bn-	623,6	537,2	301,6	1,7127	2,9966
11a	4- <i>i</i> -Pr	4-OMe-Ph-	640,6	541,8	309,4	1,7034	3,4143
12a	2,4-di- <i>i</i> -Pr	Ph-	653,4	580,2	333,1	1,7575	4,2303
13a	2,4-di- <i>i</i> -Pr	3,5-di-OMe-Ph-	733,3	626,9	385,3	1,8311	4,5257
14a	2,4-di- <i>i</i> -Pr	4- <i>i</i> -Pr	754,1	683,7	383,7	1,8449	5,3879
15a	2,4-di- <i>i</i> -Pr	Bn-	702,7	627,8	346,4	1,8059	4,1541
16a	$\beta$ -tetralinoyl	3,5-di-OMe-Ph-	660,9	550,1	339,6	1,7192	3,7478
17a*	$\beta$ -tetralinoyl	Ch-	603,5	535,7	305,0	1,7055	3,7381
18a	$\beta$ -tetralinoyl	4- <i>i</i> -Pr-Ph-	658,8	581,7	341,6	1,7261	4,4992
19a#	$\beta$ -tetralinoyl	Bn-	618,6	536,2	307,8	1,6875	3,4062
20a*	$\beta$ -tetralinoyl	Ph-	595,2	511,2	287,9	1,6254	3,4416
21a*	4- <i>n</i> -Bu	Ph-	609,3	531,4	301,3	1,6875	3,1340
22a	2,3,5,6-tetra-Me	3,5-di-OMe-Ph-	678,6	567,8	348,6	1,7637	4,0446
23a*	4-F	Ph-	514,2	434,5	239,0	1,5584	2,4130
24a*	4-Cl	Ph-	529,7	450,1	247,0	1,5793	2,8163
25a*	3,4-di-Cl	Ph-	544,8	465,2	260,2	1,6003	3,3713
26a*	4-Br	Ph-	535,5	455,9	252,1	1,5792	3,0228
27a*	4-OMe	Ph-	547,1	447,6	259,1	1,5912	2,3008
28a	4-OMe	3,5-di-OMe-Ph-	620,3	485,8	308,1	1,6789	2,4709
29a	3,5-di-Me-4-OMe	3,5-di-OMe-Ph-	675,7	549,4	335,2	1,7503	3,3902

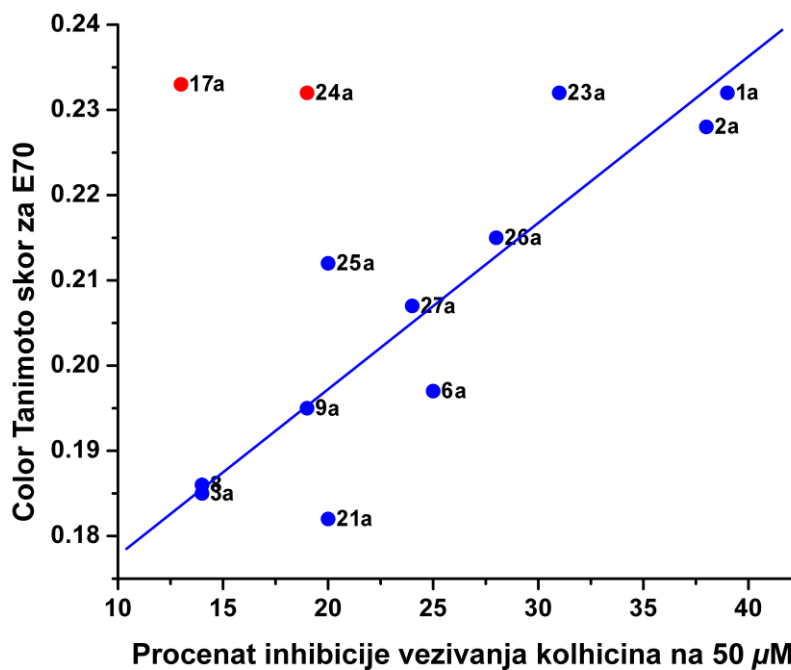
\*Inhibiraju polimerizaciju tubulina u koncentracijama ispod 20 μM; # **19** ima površinu dostupnu rastvaraču, a **10** ima zapreminu nešto ispod 'cut-off' vrednosti navedenih u tekstu, ali ne inhibiraju polimerizaciju tubulina.

Većina jedinjenja opisanih u literaturi koja se vezuju za kolhicinsko vezivno mesto na tubulinu i utiču na njegovu polimerizaciju, imaju strukturne sličnosti sa kombrestatinom A-4 ili kolhicinom. Takva jedinjenja obično sadrže dva ili tri –OH ili –OMe supstituenta na aromatičnim prstenovima koji su povezani linkerom koji se sastoji od dva do četiri ugljenikova atoma. Od amida aroilakrilnih kiselina, **1a-29a**, nesupstituisano jedinjenje, ili jedinjenja supstituisana malim supstuentima na aroil-fenil-prstenu i nesupstituisanim fenilamidnim prstenom, su se pokazala kao najbolji inhibitori polimerizacije tubulina i u određenoj meri sprečavaju vezivanje kolhicina za tubulin. Zbog toga su za studiju molekulskog modelovanja, odnosno strukturno poređenje sa našim jedinjenjima, odabrana dva jedinjenja E70 (iz PDB strukture 3HKC) i N16 (iz PDB strukture 3HKD), Shema 49,<sup>284</sup> kokristalisana sa tubulinom. Strukture i konformacije jedinjenja su preuzete iz Protein Data Bank. Jedinjenja su izabrana na osnovu toga što imaju samo jedan –OH i –OMe (E70) supstituent, ili nemaju nijedan (N16, slično kao i naši aktivni derivati). Pored toga, jedinjenja imaju izduženiji oblik u poređenju sa kolhicinom ili kombretastatinom A4 i imaju sistem konjugovanih dvostrukih veza sličan sintetizovanim anilidima aroilakrilnih kiselina. Oblik i farmakoforne karakteristike ova dva jedinjenja poređena su sa sintetizovanim jedinjenjima iz seta (**1a-3a, 6a, 8a, 9a, 17a, 20a, 21a i 23a-27a**) koristeći program ROCS.<sup>285</sup> Nađen je kvantitativni trend između farmakoforne sličnosti naših jedinjenja sa ligandom E70 (OpenEye Color polje sila, eksplicitni Meals-Dean,<sup>286</sup> Tanimoto scoring) i procenta inhibicije vezivanja kolhicina na 50  $\mu$ M ( $r = 0,89$ , Slika 29). Dva jedinjenja, **17a** i **24a** se nisu uklapala u ovu korelaciju. Treba napomenuti da su jedinjenja iz našeg seta mnogo sličnija po obliku sa jedinjenjima E70 i N16 nego po farmakofornim osobinama. Farmakoforna sličnost procenjena upotrebom Tanimoto funkcije, nije prelazila skor od 0,23 za E70; odnosno 0,35 za N16. Jedinjenja **1a, 2a** i **23a** su uvek bila više rangirana upotrebom kombinovanih scoring funkcija koje uključuju i oblik jedinjenja i farmakofornu sličnost (Tanimoto kombo). Tanimoto šejp skor je bio veći od 0,80 kada su jedinjenja poređena sa jedinjenjem E70, odnosno veći od 1,00 za jedinjenje N16 (Slika 30). Tanimoto kombo skor za sva jedinjenja iz seta je prelazio je 0,62 za jedinjenje E70, odnosno 0,95 za jedinjenje N16. Druge statistički značajne korelacije nisu zapažene.

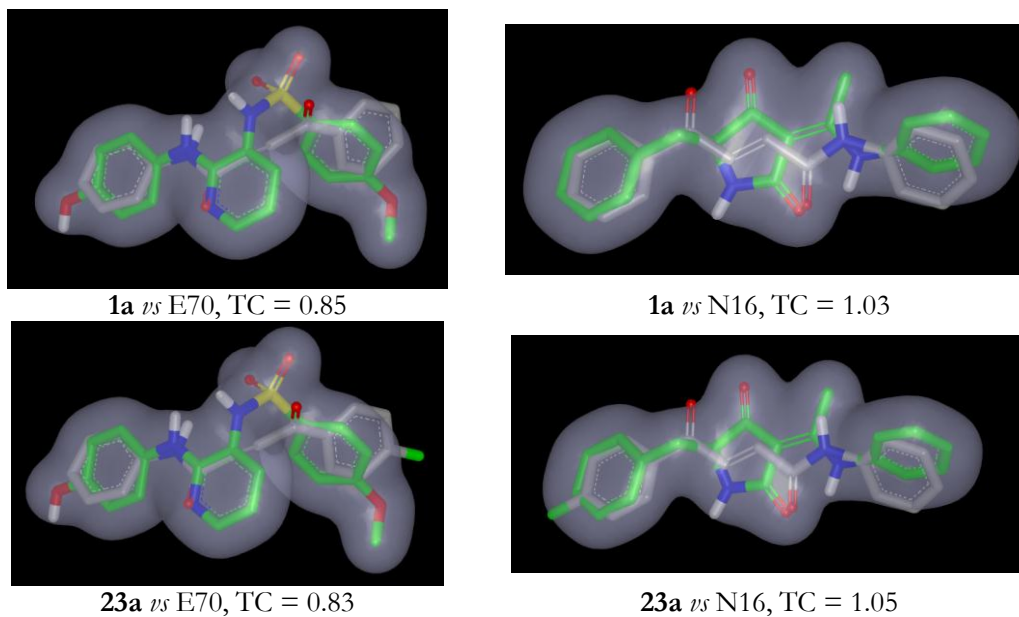




Shema 49. Strukture jedinjenja E70 i N16.



Slika 29. Korelacija između procenta inhibicije vezivanja kolhicina za tubulin na (na koncentraciji jedinjenja 50  $\mu\text{M}$ ) i farmakoforne sličnosti jedinjenja sa jedinjenjem E70.



**Slika 30.** Strukture jedinjenja **1a** i **23a** preklapljene sa konformacijama E70 i N16 preuzetim iz kristalnih struktura tubulina kokristalisanih sa jedinjenjima. E70 i N16 su obojeni sivom bojom. Sličnost liganda je dobijena Tanimoto kombo skoring funkcijom.

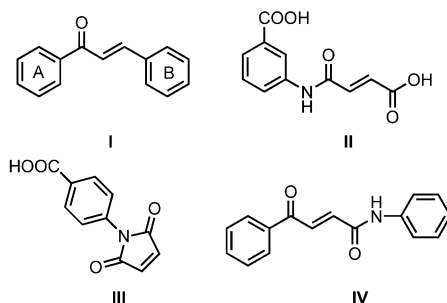
Prema tome, (*E*)-4-aril-4-okso-2-butenamidi ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost prema tri ćelijske linije humanih tumora (HeLa, FemX i K562) u niskom mikromolarnom ili submikromolarnom opsegu. Jačina dejstva svih sintetizovanih derivata (**1a-29a**) je značajno veća od odgovarajuće supstituisanih aroilakrilnih kiselina. Zamena karboksilne grupe cikloheksilamidnom, odnosno nesupstituisanom ili pogodno supstituisanom fenilamidnom grupom značajno povećava jačinu antiproliferativnog dejstva. Derivati supstituisani alkilgrupama na aroil-fenil-delu molekula ispoljavaju najjače antiproliferativno dejstvo. Četrnaest derivata inhibira polimerizaciju tubulina, pri čemu ovi derivati ispoljavaju i skroman efekat inhibicije vezivanja kolhicina za tubulin. Analiza ćelijskog ciklusa K562 ćelija izloženih dejstvu derivata **1a**, **2a**, **14a** i **23a** pokazala je da samo jedinjenja **2a** i **23a** dovode do povećanja broja ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa na koncentraciono zavisani način. Prema tome, postoji najmanje još jedan mehanizam dejstva kompetitivan inhibiciji polimerizacije tubulina. Najaktivniji inhibitor polimerizacije tubulina je derivat **1a**, nesupstituisan na aroil-fenil- i fenilamidnom prstenu sa  $IC_{50}=2,9 \mu M$ . Sintetizovani derivati (**1a-29a**) predstavljaju dobre vodeće strukture za dizajn nove klase antitubulinskih agenasa. Daljim strukturnim modifikacijama je potrebno povećati jačinu dejstva i sniziti akutnu toksičnost.

## 3.2. Antiholinesterazna aktivnost Majklovih adukata sekundarnih amina na amide aroilakrilnih kiselina (1b-38b)

### 3.2.1. Racionalni dizajn inhibitora holinesteraza zasnovan na strukturnom skeletu Majklovih adukata na amide aroilakrilnih kiselina

Interes za inhibitore AChE je značajno porastao u poslednjoj deceniji prošlog i početkom ovog veka, zahvaljujući otkriću različitih neholinergičkih uloga ovog enzima. Kao posledica toga, značajni napori su posvećeni razvoju novih inhibitora AChE sa poboljšanim farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima.

Nedavno je pokazano da neka jedinjenja koja sadrže aktiviranu dvostruku vezu inhibiraju AChE i BChE. To su halkoni<sup>287</sup> (**I**), koji su aktivni u mikromolarnom opsegu koncentracija i maleamidi (**II**) i maleimidi (**III**) *m*- i *p*-aminobenzojeve kiseline (Shema 50), aktivni u nanomolarnim koncentracijama.<sup>288</sup> Neka od ovih jedinjenja se ponašaju kao ireverzibilni inhibitori, verovatno usled Majklove adicije nukleofilnih grupa aminokiselinskih ostataka enzima na aktiviranu dvostruku vezu inhibitora. Sa farmakokinetičke tačke gledišta, prisustvo Majklovog akceptora u strukturi potencijalnog leka se obično smatra nepoželjnim, zbog visoke reaktivnosti i neselektivnosti ovakvih jedinjenja. Međutim, zasićeni analozi maleamida *m*-aminobenzojeve kiseline pokazuju čak i veću jačinu inhibicionog dejstva prema AChE u poređenju sa nezasićenim analogima, što ukazuje da prisustvo aktivirane dvostruke veze nije neophodno za antiholinesteraznu aktivnost.<sup>126</sup> Stoga se prisustvo aktivirane dvostruke veze može koristiti za dalju funkcionalizaciju inhibitora - adiciju pogodno izabranih nukleofila, koji poseduju grupe koje mogu povoljno da interaguju sa aminokiselinskim ostacima unutar šupljine aktivnog mesta AChE i BChE.



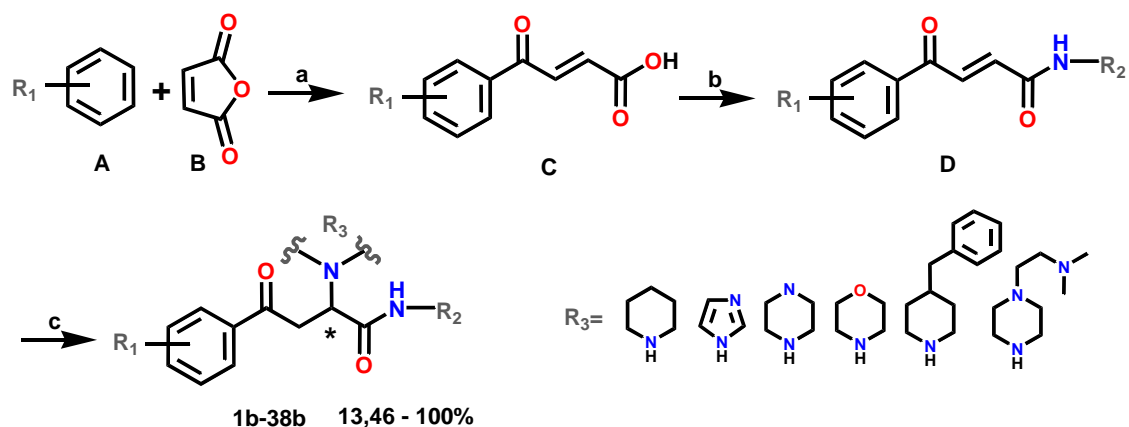
**Shema 50.** Halkoni (**I**), amidi *p*- i *m*-aminobenzojeve kiseline (**II**), imidi *p*- i *m*-aminobenzojeve kiseline (**III**), anilidi aroilakrilnih kiselina (**IV**).

U nastavku rada sa aroilakrilnim kiselinama i njihovim fenilamidima, odlučili smo da iskoristimo reaktivnost ketovinilne grupe anilida aroilakrilnih kiselina prema uobičajenim nukleofilima. Anilidi aroilakrilnih kiselina su izabrani kao Majklovi akseptori, zato što sadrže strukturne motive  $\alpha,\beta$ -nezasićenog amida, kao kod maleamida aminobenzoeve kiseline i aroil-grupu kao halkoni. Kao nukleofili izabrani su uobičajeni strukturni fragmenti inhibitora AChE,<sup>289</sup> piperidin, morfolin i imidazol. Sintetizovana je kongenerna serija od dvadeset 4-aril-4-okso-2-aminil-butanamida.<sup>290</sup> Strukturne modifikacije su obuhvatile različito supstituisanu aroil-fenilnu-grupu molekula dok je fenilamidni prsten bio nesupstituisan kod svih derivata. Alikil-supstituisani kongeneri inhibirali su AChE i BChE u niskom mikromolarnom opsegu, dok su hloro- i metoksi-supstituisani derivati bili neaktivni. Priroda cikloalkilamino-grupe na položaju 2 butanskog fragmenta uticala je na selektivnost prema jednom odnosno drugom enzimu. Piperidinski i imidazolski derivati bili su aktivni prema AChE, dok su morfolinski derivati ispoljavali aktivnost prema BChE.

U ovom radu smo odlučili da ispitamo uticaj varijacije amidnog dela molekula na jačinu inhibicionog dejstva prema AChE i BChE. Sistematski je menjan ciklični amin koji je korišćen da se dobiju amidi benzoilakrilnih kiselina (3,5-dimetokisanilin, 4-izopropilanilin i cikloheksilamin), uz zadržavanje supstituenata na aroil-fenil-prstenu za koje je prethodno utvrđeno da povoljno utiču na antiholinesteraznu aktivnost (4-*i*-Pr, 2,4-di-*i*-Pr i  $\beta$ -tetralinil). Za Majklovu adiciju na aktiviranu dvostruku vezu su korišćena četiri amina: piperidin, imidazol, morfolin i *N*-metilpiperazin. Sintetizovana su i dva dodatna jedinjenja. Da bi se ispitao efekat prisustva veoma voluminoznih fragmenata na položaju 2 butanskog niza na antiholinesteraznu aktivnost, sintetizovan je adicioni proizvod 4-benzilpiperidina na fenilamid 4-(4-*i*-Pr-fenil)-4-okso-2-butenske kiseline i *N,N*-dimetil-2-(piperazinil)etanamina na 3,5-dimetoksifenilamid 4-(4-*i*-Pr-fenil)-4-okso-2-butenske kiseline. Drugo jedinjenje sadrži dimetilamino-grupu koja je protonovana na fiziološkom pH, kao i trimetilaminoetil-grupa acetil-holina. Sintetizovano je ukupno 38 jedinjenja i određena je jačina njihovog inhibicionog dejstva prema AChE i BChE.

### 3.2.2. Sinteza i strukturna karakterizacija 4-aril-4-okso-2-aminilbutanamida (1b-38b)

Sinteza amida benzoilakrilnih kiselina je opisana u poglavlju 3.1.2. Majklova adicija cikličkih amina na amide benzoilakrilnih kiselina odvijala se lako, bez katalizatora na sobnoj temperaturi i dala je ciljana jedinjenja (1b-38b, Shema 51).



**Shema 51.** Sinteza jedinjenja **1b-38b**. Reagensi: (a)  $\text{AlCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; (b)  $\text{POCl}_3$ , suvi THF.  $\text{R}_2$  = 3,5-dimetoksianilin, 4-izopropilanilin ili cikloheksilamin; (c) toluen,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i  $\text{R}_3$  = piperidin, imidazol, morfolin, *N*-metilpiperazin, 4-benzilpiperidin i 4-(2-*N,N*-di-Me-aminoetil)-1-piperazin.

#### 3.2.2.1. $^1\text{H}$ NMR spektri jedinjenja **1b-38b**

$^1\text{H}$  NMR spektri jedinjenja **1b-38b** (Tabela 6) su prikazani u Prilogu 2. Kod svih jedinjenja karakterističan je takozvani ABX multiplet, koji je dokaz adicije amina na dvostruku vezu odgovarajućeg amida aroilakrilne kiseline; njemu pripadaju tri dubleta dubleta, koji izgledaju kao kvarteti, i potiču od tri hemijski neekvivalentna protona; jednog koji je vezan za stereogeni ugljenikov atom (X deo multiplleta) i druga dva vodonika vezana za susedan (prohiralan) ugljenikov atom butanskog fragmenta molekula (AB deo multiplleta). Kod svih jedinjenja (osim imidazolskih derivata), položaj kvarteta X dela multiplleta se nalazi u oblasti  $\delta$  od 4,03 do 4,33 ppm sa odgovarajućim konstantama kuplovanja  $J_{1,2} = 3,89\text{-}5,72$  Hz i  $J_{1,3} = 6,30\text{-}17,91$  Hz. Položaji signala druga dva kvarteta (AB deo multiplleta) se nalaze u oblasti  $\delta$  3,60-4,10 ppm ( $J_{1,2} = 6,15\text{-}7,94$  Hz i  $J_{1,3} = 9,40\text{-}18,84$  Hz) odnosno 2,87-3,50 ppm ( $J_{1,2} = 4,65\text{-}5,65$  Hz i  $J_{1,3} = 16,26\text{-}19,07$  Hz). U spektrima imidazolskih derivata (**2b**, **6b**, **10b**, **14b**, **18b**, **22b**, **26b**, **30b**, **34b**) položaji ABX signala su pomereni ka nešto većim  $\delta$  vrednostima, u poređenju sa položajima signala kod adicionih proizvoda alicikličkih amina. Signali koji pripadaju X delu multiplleta se nalaze u oblasti  $\delta$  od 5,40-5,69 ppm. U ovom slučaju dublet dubleta nije dovoljno razložen (osim kod jedinjenja **30**) jer su unutrašnji signali spojeni u jedan, nešto širi signal; kao rezultat

toga dobija se signal koji liči triplet sa konstantom kuplovanja  $J = 5,65-7,19$  Hz. Signali preostala dva kvarteta ABX dela multiplleta imidazolskih derivata se nalaze u oblasti  $\delta$  3,98-4,10 *ppm* ( $J_{1,2} = 6,15-8,21$  Hz i  $J_{1,3} = 17,24-18,84$  Hz) odnosno u oblasti 3,25-3,50 *ppm* ( $J_{1,2} = 5,25-6,68$  Hz i  $J_{1,3} = 17,44-18,12$  Hz). Kod spektara 4-*i*-Pr i 2,4-di-*i*-Pr supstituisanih jedinjenja (**1b-24b**, na aroil-fenil-delu i **29b-32b**, na fenilamidnom delu molekula), karakterističan je dublet koji potiče od metil-grupa izopropil-supstituenta molekula. Ovi signali se nalaze u oblasti  $\delta$  od 1,11 do 1,30 *ppm* sa konstantama kuplovanja u opsegu vrednosti 6,52 – 7,59 Hz. Proton koji pripada metinskoj grupi izopropil supstituenta daje karakterističan heptet na vrednostima  $\delta$  koji se najčešće preklapa sa signalima koji pripadaju ABX delu spektra. Zbog toga nije bilo moguće odrediti konstante kuplovanja ovog multiplleta za najveći broj jedinjenja. Kod tetralinoil- supstituisanih derivata (**25b-36b**) karakteristična su dva relativno široka signala koji potiču od dva tipa hemijski neekvivalentnih metilenskih protona tetralinil-grupe. Signali ovih protona se nalaze u oblastima  $\delta$  1,78-1,81 *ppm* i 2,78-2,82 *ppm*. Protoni metoksi grupa 3,5-dimetoksi supstituisanih derivata (**1b-4b**, **13b-16b**, **25b-28b** i **38**) daju singlete u oblasti 3,64-3,78 *ppm*. Protoni cikloheksil-prstenova derivata **9b-12b**, **21b-24b** i **33b-36b** daju četiri grupe nedovoljno razloženih multiplleta na vrednostima  $\delta$  od 1,14-1,45 (prva grupa), 1,54-1,66 (druga), 1,78-3,77 (treća) i 3,77 (četvrta grupa).

Piperidinski prstenovi jedinjenja **1b**, **5b**, **9b**, **13b**, **17b**, **21b**, **25b**, **29b** i **33b** daju tri tipa multiplleta koji potiču od tri grupe hemijski neekvivalentnih metilenskih protona. Ovi signali se nalaze  $\delta$  vrednostima oko: 1,50, 1,60 i 2,60 *ppm*. Slično, morfolinski prstenovi derivata **3b**, **7b**, **11b**, **15b**, **19b**, **23b**, **27b**, **31b** i **35b** daju dva tipa signala sličnih dubletu koji potiču od protona metilenskih grupa i nalaze se na oko  $\delta$  2,60 *ppm* i 3,70 *ppm*. Signali metilenskih protona derivata sa *N*-metilpiperazinskim prstenom (**4b**, **8b**, **12b**, **16b**, **20b**, **24b**, **28b**, **32b** i **36b**) se nalaze na vrednosti  $\delta \sim 2,5$  i 2,6 *ppm*. Singlet koji potiče od protona *N*-Me grupe ovih derivata nalazi se na 2,3 *ppm*. Aromatični protoni imidazolovog prstena derivata **2b**, **6b**, **10b**, **14b**, **18b**, **22b**, **26b**, **30b** i **34b** daju tri signala koji potiču od tri hemijski neekvivalentna protona na vrednostima  $\delta$  7,1, 7,2 i 7,6 *ppm*.

U spektrima derivata supstituisanih 4-*i*-Pr grupom na aroil-fenil-prstenu (**1b-12b**) se nalaze dva karakteristična dubleta koji pripadaju *o*- i *m*- protonima aroil fragmenta; signali *m*- protona se nalaze na  $\delta$  vrednostima 7,26-7,33 *ppm*, sa konstantama kuplovanja u opsegu  $J = 8,00 - 8,50$

Hz, signali *o*-protona u oblasti  $\delta$  7,84-7,94 *ppm*, sa  $J = 7,86-8,50$  Hz. U spektrima derivata supstituisanih 4-*i*-Pr grupom na fenilamidnom delu molekula (**5b-8b**, **17b-20b** i **29b-32b**) signali aromatičnih *o*- i *m*-protona se nalaze na nešto nižim vrednostima  $\delta$  u odnosu na signale odgovarajućih protona na aroil-fenil-prstenu; signali *m*-protona se nalaze na  $\delta$  vrednostima 7,08-7,18 *ppm*, sa konstantama kuplovanja u opsegu  $J = 7,68 - 8,83$  Hz, signali *o*-protona u oblasti  $\delta$  7,44-7,46 *ppm*, sa  $J = 7,49-8,96$  Hz. Kod 2,4-di-*i*-Pr supstituisanih derivata (**13b-24b**) aromatični *m*-proton, koji se nalazi između dve izopropil-grupe daje singlet u oblasti  $\delta$  7,24-7,28 *ppm*; drugi *m*-proton daje dublet u oblasti  $\delta$  7,09-7,28 *ppm* sa  $J = 7,83-8,95$  Hz a *o*-proton daje dublet u oblasti  $\delta$  7,46-7,66 *ppm*, sa  $J = 7,48-8,96$  Hz. Kod tetralinil-supstituisanih derivata (**25b-36b**) *m*-proton na aroil-fenil-prstenu daje dublet na vrednostima  $\delta$  u oblasti 7,09-7,20 *ppm* sa vrednostima konstanti kuplovanja u opsegu  $J = 7,20-9,00$  Hz. Signali preostala dva *o*-protona na aroil-prstenu su preklapljeni i nalaze se u oblasti 7,58-7,74 *ppm*. Kod 3,5-dimetoksi-supstituisanih derivata (**1b-4b**, **13b-16b** i **25b-28b**) *p*-proton na fenilamidnom prstenu daje signal sličan tripletu na vrednosti  $\delta$  oko 6,20 *ppm*, a dva *o*-protona daju dva veoma bliska singleta na vrednostima  $\delta$  od oko 6,80 i 6,81 *ppm*. Signal koji potiče od amidnog -NH- protona se nalazi na najvišim  $\delta$  vrednostima u oblasti 9,16-10,30 *ppm*, osim u slučaju cikloheksilamidnih derivata (**9b-12b**, **21b-24b** i **33b-36b**) gde amidni proton daje karakterističan dublet (potiče od kuplovanja sa susednim metinskim protonom cikloheksil-grupe) na vrednostima  $\delta$  6,32-7,28 *ppm* sa konstantama kuplovanja u opsegu  $J = 7,84-13,78$  Hz.

#### 3.2.2.2. <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja **1b-38b**

<sup>13</sup>C NMR spektri su dati u Prilogu 2. U <sup>13</sup>C NMR spektrima jedinjenja **1b-38b** signali ugljenika aroil karbonilne grupe se nalaze na najvišem hemijskom pomeranju, i to u oblasti 195,81-203,83 *ppm*. Na nešto nižim vrednostima  $\delta$  se nalaze signali ugljenika amidne karbonilne grupe, u oblasti 154,14-171,08 *ppm*. Signali aromatičnih ugljenika, kao i ugljenika imidazolovog prstena se nalaze u oblasti  $\delta$  95,70-161,08 *ppm*, a signali alifatičnih ugljenikovih atoma se nalaze u oblasti  $\delta$  od 22,31 do 67,35 *ppm*.

#### 3.2.3 Antiholinesterazna aktivnost 4-aril-4-okso-2-aminilbutanamida (**1b-38b**)

Antiholinesterazna aktivnost derivata **1b-38b** određena je Elmanovom spektrofotometrijskom metodom, i rezultati su prikazani u Tabeli 6, zajedno sa IC<sub>50</sub>

vrednostima jedinjenja iz prethodnog seta (**39b-47b**).<sup>289</sup> Dvadeset jedinjenja inhibira AChE u određenom stepenu, a dvanaest jedinjenja inhibira enzim u niskom mikromolarnom opsegu koncentracija. Većina piperidinskih i imidazolskih derivata inhibira AChE u niskim mikromolarnim koncentracijama, dok su morfolinski i *N*-metilpiperazinski derivati neaktivni sve do koncentracija od 15-20  $\mu$ M. Dakle, prisustvo voluminoznijih grupa na položaju C2 butanskog niza molekula smanjuje jačinu inhibicionog dejstva prema AChE. Ovaj trend je zapažen i kod prethodno sintetizovane kongenerne serije.<sup>289</sup>

3,5-Dimetoksi supstitucija na fenilamidnom prstenu piperidinskih i imidazolskih derivata u nekim slučajevima (uporediti **2b** sa **40b**, i **26b** sa **46b**) neznatno poboljšava inhibiciju, dok u drugim slučajevima (uporediti **13b** sa **42b**, **14b** sa **43b** i **25b** sa **45b**) neznatno smanjuje inhibiciono dejstvo derivata prema AChE. 4-*i*-Pr Supstitucija na fenilamidnom prstenu piperidinskih i imidazolskih derivata u većini slučajeva (**6b**, **17b**, **18b** i **30b**) poboljšava antiholinesteraznu aktivnost u poređenju sa aktivnosti derivata nesupstituisanih na fenilamidnom prstenu (**40b**, **42b**, **43b** i **46b**). U nekim slučajevima, 4-*i*-Pr supstitucija ima veoma izražen povoljan uticaj na antiacetilholinesteraznu aktivnost. Ovo je uočljivo kod derivata **19b** i **20b**, kod kojih ovaj tip supstitucije pretvara inače neaktivne morfolinske i *N*-metilpiperazinske derivate u aktivna jedinjenja, sa  $IC_{50}$  vrednostima blizu 6,5  $\mu$ M.

Zamena fenil-grupe cikloheksil-grupom na amidnom delu molekula kod piperidinskih i imidazolskih derivata (**9b**, **10b**, **33b**, **34b**) smanjuje jačinu inhibicionog dejstva prema AChE najmanje za jedan red veličine. Ovo ukazuje na to da amidna grupa molekula verovatno interaguje sa aminokiselinskim ostacima aktivnog mesta AChE uključujući  $\pi$  elektrone fenil prstena. Smanjenje u jačini inhibicionog dejstva, usled prisustva cikloheksil-grupe je skromno samo za 2,4-di-*i*-Pr supstituisane piperidinske i imidazolske derivate **21b** i **22b**, koji imaju  $IC_{50}$  vrednosti 5,44 odnosno, 5,94  $\mu$ M.

Devetnaest derivata inhibira BChE, a za najveći broj jedinjenja, jačina inhibicionog dejstva izražena je kao rezidualna enzimaska aktivnost na najvišoj testiranoj koncentraciji jedinjenja, Tabela 6), a samo tri jedinjenja imaju  $IC_{50}$  vrednosti u niskom mikromolarnom (**16b** i **24b**) odnosno submikromolarnom (**20b**) opsegu. Sva tri jedinjenja sadrže 2,4-di-*i*-Pr supstituisanu aroil-fenil-grupu i *N*-metilpiperazin na položaju C2 butanskog dela molekula. Morfolinski



derivati (**15b** i **19b**) supstituisani 2,4-di-*i*-Pr grupama na aroil, i 3,5-dimetoksi ili 4-izopropil grupama na fenilamidnom delu molekula nemaju veću jačinu inhibicionog dejstva od derivata koji ima nesupstituisan fenilamidni prsten, **44b** ( $IC_{50}=2,48 \mu M$ ).  $\beta$ -Tetralinski derivati sa *N*-metilpiperazinskim prstenom na položaju C2 butanskog dela molekula, pokazuju umerenu jačinu dejstva prema BChE, u koncentracijama od oko 10-20  $\mu M$ . Svi ostali ispitivani derivati ne ispoljavaju izraženo inhibiciono dejstvo prema BChE.

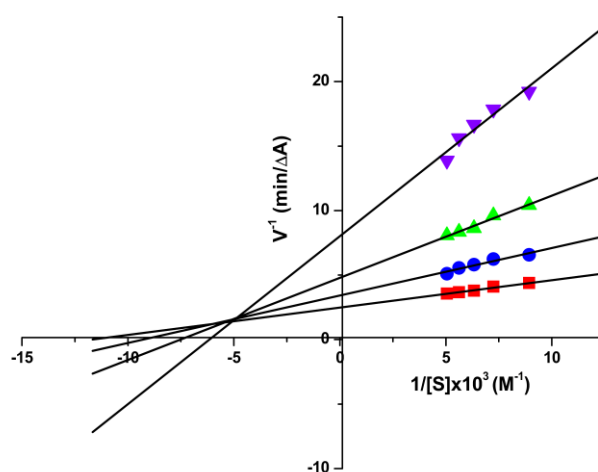
Da bi se ispitaio uticaj prisustva voluminoznih molekulskih grupa (fragmenata) na položaju C2 butanskog niza na inhibiciju AChE i BChE, sintetizovan je derivat **37b**, adicijom 4-benzilpiperidina na fenilamid (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline. Cilj je bio da se ispita da li će, u poređenju sa drugim derivatima, ova grupa izazvati značajan porast inhibicije AChE ili BChE i da li će ovako dizajnirano jedinjenje pokazivati različiti tip inhibicije enzima u poređenju sa drugima jedinjenjima. Kod jedinjenja **38b**, u molekul je uvedena dimetilamino-grupa (adicijom *N,N*-dimetil-2-(piperazinil)etanamina na položaj C2 butanskog niza) koja je protonovana na fiziološkom pH, slično kao trimetilamino-grupa acetilholina. Međutim oba derivata nisu bila aktivna ni prema jednoj esterazi na najvišoj testiranoj koncentraciji (20  $\mu M$ ).

**Tabela 6.** IC<sub>50</sub> vrednosti za inhibiciju AChE i BChE za jedinjenja **1b–47b**.

<b>IC<sub>50</sub> ± SEM ( μM)<sup>a</sup></b>						
<b>R. Br.</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>AChE</b>	<b>BChE</b>	
<b>Jed.</b>						
1b			piperidin	Nestabilan <sup>b</sup>	Nestabilan	
2b		3,5-di-OMe-	imidazol	4,49 ± 0,18	> 20	
3b		Ph-	morfolin	> 20	> 20	
4b			N-Me-piperazin	76,65 @ 20 <sup>c</sup>	> 20	
5b			piperidin	Nestabilan	Nestabilan	
6b	4- <i>i</i> -Pr	4- <i>i</i> -Pr-Ph-	imidazol	2,33 ± 0,40	> 20	
7b			morfolin	> 20	> 20	
8b			N-Me-piperazin	> 20	72,41 @ 15	
9b			piperidin	63,10 @ 15	64,96 @ 20	
10b		Ch-	imidazol	65,31 @ 15	76,01 @ 20	
11b			morfolin	85,13 @ 25	46,82 @ 10	
12b			N-Me-piperazin	86,24 @ 25	66,18 @ 20	
13b			piperidin	> 7,5	> 7,5	
14b		3,5-di-OMe-	imidazol	3,30 ± 0,35	78,37 @ 20	
15b		Ph-	morfolin	> 20	62,37 @ 10	
16b			N-Me-piperazin	> 20	5,26 ± 0,24	
17b			piperidin	1,96 ± 0,22	Nerastvoran	
18b	2,4-di- <i>i</i> -Pr	4- <i>i</i> -Pr-Ph-	imidazol	2,05 ± 0,06	> 20	
19b			morfolin	44,36 @ 6,5	73,56 @ 10	
20b			N-Me-piperazin	43,64 @ 6,5	0,74 ± 0,16	
21b			piperidin	5,44 ± 0,61	72,73 @ 20	
22b		Ch-	imidazol	5,94 ± 0,02	65,83 @ 20	
23b			morfolin	> 15	> 20	
24b			N-Me-piperazin	> 15	2,25 ± 0,23	
25b			piperidin	6,37 ± 1,02	> 20	
26b		3,5-di-OMe-	imidazol	3,23 ± 0,15	> 20	
27b		Ph-	morfolin	Nerastvoran	Nerastvoran	
28b			N-Me-piperazin	> 15	56,68 @ 20	
29b			piperidin	Nerastvoran	Nerastvoran	
30b	β-tetralinil	4- <i>i</i> -Pr-Ph-	imidazol	2,36 ± 0,20	> 20	
31b			morfolin	> 15	> 15	
32b			N-Me-piperazin	86,48 @ 8,5	10,75 ± 1,39	
33b			piperidin	> 20	61,46 @ 20	
34b		Ch-	imidazol	19,99 ± 2,00	52,23 @ 20	
35b			morfolin	> 15	75,22 @ 20	
36b			N-Me-piperazin	> 20	39,10 @ 20	
37b	4- <i>i</i> -Pr	-Ph	4-benzilpiperidin	> 20	> 20	
38b	4- <i>i</i> -Pr	3,5-di-OMe- Ph-	N,N-dimetil-2-(piperazin-1- il)etanamin	> 20	> 20	
39b			piperidin	3,47 ± 0,04	7,06 ± 0,04	
40b	4- <i>i</i> -Pr	-Ph	imidazol	8,22 ± 0,04	90,00 @ 30	
41b			morfolin	>100	72,78 @ 40	
42b			piperidin	4,86 ± 0,03	60,07 @15	
43b	2,4-di- <i>i</i> -Pr	-Ph	imidazol	1,55 ± 0,01	>20	
44b			morfolin	>10	2,48 ± 0,01	
45b			piperidin	5,64 ± 0,02	78,50 @ 15	
46b	β-tetralinil	-Ph	imidazol	6,34 ± 0,01	83,00 @ 40	
47b			morfolin	>30	87,00 @ 40	
<b>Takrin</b>	/	/	/	42,95 ± 0,01 nM	6,95 ± 0,01 nM	

<sup>a</sup> Koncentracija koja inhibira 50% AChE (električna jegulja) ili BChE (konjski serum). IC<sub>50</sub> vrednosti su date kao srednja vrednost tri nezavisna određivanja. <sup>b</sup> Zapaženo je razlaganje jedinjenja u enzimskom testu. <sup>c</sup> Jačina inhibicionog dejstva je izražena kao procenat rezidualne enzimske aktivnosti na datoj koncentraciji.

Za jedno od najaktivnijih jedinjenja u setu prema AChE, derivatu **17b**, određen je tip inhibicije, takođe Elmanovom spektrofotometrijskom metodom. Grafik zavisnosti recipročne vrednosti brzine enzimske reakcije od recipročne vrednosti koncentracije supstrata (na različitim koncentracijama inhibitora) prikazan je na Slici 31. Jedinjenje pokazuje mešoviti tip inhibicije, na šta ukazuje presek pravih u gornjem levom kvadrantu grafika. Ovakav tip inhibicije ukazuje na vezivanje inhibitora za slobodan enzim, ali i za enzim-supstrat kompleks. Dobijene  $K_i$  vrednosti iznose  $0,52 \mu\text{M}$  za slobodan enzim, odnosno  $1,93 \mu\text{M}$ , za enzim-supstrat kompleks.



**Slika 31.** Lajnvider-Barkov grafik brzine reakcije katalizovane AChE (0.02 U) određene sa supstratom ASCh, u odsustvu i prisustvu različitih koncentracija derivata **17b**. (■) Bez inhibitora; (●)  $2 \mu\text{M}$ ; (▲)  $4 \mu\text{M}$ ; (▼)  $5 \mu\text{M}$ .

### 3.2.4. Molekulsko modelovanje

#### 3.2.4.1. Analiza odnosa 3D strukture i aktivnosti derivata **1b-47b**

3D-QSAR model izveden za prethodno sintetizovan kongenerni set 4-aril-4-okso-2-aminilbutanamida kao i za set inhibitora AChE preuzetih iz literature, opisan ranije,<sup>289</sup> korišćen je da se predvidi jačina dejstva inhibitora AChE prikazanih u ovoj disertaciji. Dobijena je zadovoljavajuća prediktivnost za jedinjenja **2b**, **6b**, **14b**, **17b**, **18b**, **21b**, **22b**, **25b**, **26b** i **30b** ( $r^2 = 0,60$ ,  $sd=0,118$ ), dok je jačina dejstva derivata **34b** u određenom obimu procenjena. Rezultati su dati u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Predviđena jačina dejstva 4-aril-4-okso-2-aminilbutanamida na osnovu modela opisanog u referenci 289.

R. Br. Jed.	Eksp. p(IC <sub>50</sub> )	Izr. p(IC <sub>50</sub> )
<b>2b</b>	5.348	5.478
<b>6b</b>	5.633	5.634
<b>14b</b>	5.481	5.433
<b>17b</b>	5.708	5.555
<b>18b</b>	5.688	5.503
<b>21b</b>	5.264	5.088
<b>22b</b>	5.226	5.329
<b>25b</b>	5.196	5.197
<b>26b</b>	5.491	5.544
<b>30b</b>	5.627	5.759
<b>34b</b>	4.699	5.224

Nezavisno od predviđene aktivnosti molekula **2b**, **6b**, **14b**, **17b**, **18b**, **21b**, **22b**, **25b**, **26b**, **30b** i **34b** na osnovu modela opisanog u predhodnom radu, izveden je novi 3D-QSAR model zasnovan na GRIND-2 deskriptorima za derivate za koje su dobijene definisane IC<sub>50</sub> vrednosti u ovom i prethodno sintetizovanom setu molekula. U ovaj model su uključena i jedinjenja za koja smo uspeali da odredimo samo procenat rezidualne enzimske aktivnosti na najvišoj testiranoj koncentraciji (**4b**, **9b-12b**, **19b**, **20b** i **32b**). Za ta jedinjenja IC<sub>50</sub> vrednosti su aproksimirane. Za izračunavanje MIF-ova i izvođenje deskriptora su korišćene sve GRID probe dostupne u programu Pentacle: DRY (hidrofobna), N1 (donor vodonične veze), O (akceptor vodonične veze) i TIP (opisuje oblik molekula). PCA model objašnjava otprilike 55 % varijabilnosti seta (Tabela 8). Statistički parametri modela su dati u Tabeli 9, prikazane  $r^2$  i  $q^2$  vrednosti dobijene su posle jednog ciklusa selekcije varijabli FFD metodom. Grafik PLS koeficijenata, dobijen za 3 latentne varijable (3LV) je prikazan na Slici 32.

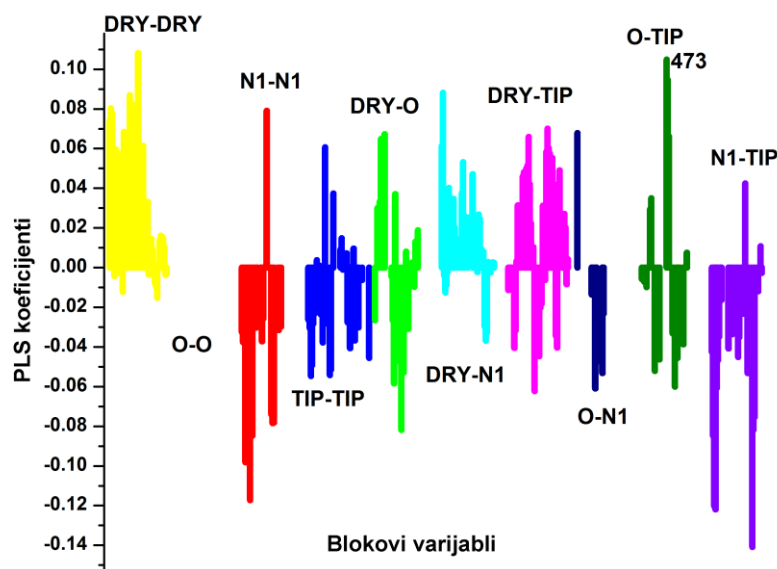
**Tabela 8.** Statistički parametri PCA modela\*\*

<b>Komponenta</b>	<b>SSX</b>	<b>SSX<sub>acc</sub></b>	<b>VarX</b>	<b>VarX<sub>acc</sub></b>
1	24.47	24.47	21.04	21.04
2	16.33	40.8	14.15	35.19
3	9.80	50.60	8.05	43.24
4	7.75	58.35	6.42	49.66
5	5.33	63.68	4.05	53.71

**Tabela 9.** Eksperimentalne i izračunate  $p(IC_{50})$  vrednosti dobijene iz PLS modela sa 3LV.

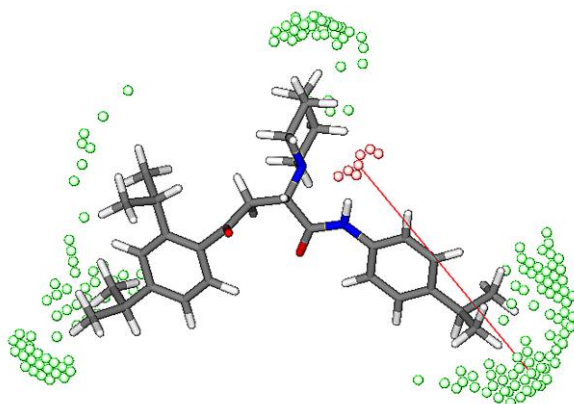
<b>R. Br. Jed.</b>	<b>Eksp. <math>p(IC_{50})</math></b>	<b>Izr. <math>p(IC_{50})</math></b>
2b	5.348	5.451
4b	4.553	4.589
6b	5.633	5.561
9b	4.638	4.657
10b	4.602	4.646
11b	4.398	4.401
12b	4.398	4.400
14b	5.481	5.506
17b	5.708	5.794
18b	5.688	5.660
19b	5.131	5.302
20b	5.143	5.218
21b	5.264	5.185
22b	5.226	5.126
25b	5.196	5.204
26b	5.491	5.401
30b	5.627	5.619
32b	4.921	5.019
34b	4.699	4.634
39b	5.460	5.203
40b	5.085	5.031
42b	5.313	5.372
43b	5.810	5.716
45b	5.249	5.365
46b	5.198	5.199

\*\* SSX - procenat zbira kvadrata X objašnjen odgovarajućom PC, SSXacc - akumulativni procenat zbira kvadrata X objašnjen odgovarajućom PC, VarX - procenat varijanse X objašnjen odgovarajućom PC, VarXacc - akumulativni procenat varijanse X objašnjen odgovarajućom PC.



**Slika 32.** Grafik PLS koeficijenata, dobijen sa 3LV.

DRY-DRY blok je bogat varijablama koje su pozitivno korelisane sa jačinom dejstva derivata, što ukazuje na pozitivan doprinos hidrofobnih grupa molekula na inhibicionu aktivnost prema AChE. U N1-N1 bloku većina varijabli je negativno korelisana sa jačinom dejstva derivata. Varijabla O-TIP 473 (10,0-10,4 Å) ima najveći pozitivan uticaj u modelu. Ona je prisutna kod najaktivnijih derivata i spaja MIF-ove O probe povezane sa amidnom -NH- grupom jedinjenja i MIF-ove TIP probe povezane sa supstituentima na fenilamidnom prstenu (4-*i*-Pr ili 3,5-di-OMe, Slika 33). Za jedinjenja sa nesupstituisanom fenilamidnom grupom TIP polje je povezano sa supstituentima na aroil-fenil-prstenu.



**Slika 33.** Varijabla O-TIP 473 (10.0-10.4 Å), na primeru najaktivnijeg derivata **18b**.

### 3.2.4.2 Doking studija najaktivnijih 4-aril-4-okso-2-aminilbutanamida prema AChE

Da bi ispitali interakcije koje se mogu formirati između aminokiselinskih ostataka u aktivnom mestu AChE i liganada, za sedam jedinjenja koja su imala  $IC_{50}$  vrednosti ispod  $5 \mu M$  urađen je doking u šupljinu aktivnog mesta AChE. Doking je urađen za oba enantiomera svakog jedinjenja u kristalnu strukturu mišije *m*AChE (Mus musculus, PDB oznaka 2HA2), upotrebom najnovije verzije programa AutoDock 4.<sup>291</sup> Prilikom doking izračunavanja generisano je pedeset poza za svaki enantiomer. Kako su skoring funkcije koje se koriste za rangiranje poza liganada i dalje neprecizne,<sup>292</sup> odlučili smo da analizirajmo dva tipa poza: energetska najpovoljnija poza (na osnovu procenjene slobodne energije vezivanja,  $\Delta G$ ) i najpovoljnija poza koja pripada najviše popunjenom klasteru koji sadrži najveći broj poza. Interakcije između liganada i aminokiselinskih ostataka u aktivnom mestu AChE analizirane su programom LigPlot.<sup>293</sup> Detaljni podaci za interakcije između liganada i AChE, za sva jedinjenja, dati su u Tabeli 10. Može se zapaziti da se kod oba tipa poza (najbolje poze i poze koja pripada najviše popunjenom klasteru) za oba enantiomera svih jedinjenja prikazanih u Tabeli 10, vodonična veza formira između amidne -NH- grupe jedinjenja i -OH grupe bočnog ostataka Tyr 124 AChE. Takođe, kod značajnog broja doking poza, vodonična veza se formira između peptidne -NH- grupe aminokiselinskog ostatka Phe 295 i različitih funkcionalnih grupa liganada (fenilamidna -OMe grupa, N3 azot imidazola ili aroil karbonil grupe). Aminokiselinski ostaci koji formiraju hidrofobne interakcije sa jedinjenjima su His 447, Tyr 341, Phe 295, Phe 297 i Phe 338.

**Tabela 10.** Interakcije jedinjenja sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mestu AChE, dobijene doking izračunavanjima.

Comp. No*	Tyr 72	Asp 74	Trp 86**	Gly 120	Gly 121	Gly 122	Tyr 124	Ser125	Tyr 133	Glu 202	Ser 203	Trp 286**	Leu 289	Ser 293	Ile 294	Phe 295	Arg 296	Phe 297	Tyr 341	Tyr 337	Phe 338	His 447	ΔG	
2b (E, P)	1	1	Ph	0	0	1	HB (NH)***	0	0	0	1	Ar	1	1	1	HB (CO)	1	1	1	1	1	1	HB (MeO)	-10.57
6b (E, P)	1	1	Ph	0	0	0	HB (NH)	0	0	1	0	Ar	1	1	1	HB (CO)	1	0	1	1	1	1	1	-11.15
14b (E)	1	1	Ph	1	1	1	HB (NH)	1	0	1	0	Ar	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	-9.67
14b (P)	1	1	Ar	0	0	0	HB (NH)	0	0	0	0	Ph	0	1	1	HB (Im)	HB (Im)	1	HB (NH)	1	1	1	0	-9.66
17b (E)	0	1	Ar	1	1	1	HB (NH)	1	1	0	1	Ph	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	-12.65
17b (P)	1	1	Ph	0	0	0	HB (NH)	0	0	1	0	Ar	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-11.22
18b (E)	0	0	Ar	1	1	1	HB (NH)	1	1	1	0	Ph	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	-9.06
18b (P)	1	1	Ph	0	0	0	HB (NH)	0	0	1	0	Ar	0	0	1	HB (Im)	0	1	1	1	1	1	1	-8.96
26b (E)	1	1	Ar	0	1	1	HB (NH)	1	0	0	HB (Im)	Ph	0	1	1	HB (MeO)	1	1	0	1	1	1	1	-11.28
26b (P)	1	1	Ar	0	0	0	HB (NH)	0	0	0	0	Ph	0	0	1	HB (Im)	1	1	1	1	0	0	HB (MeO)	-10.76
30b (E,P)	1	1	Ph	0	0	0	HB (NH)	0	0	1	0	Ar	1	1	1	HB (CO)	1	1	1	1	1	1	1	-11.47
2b (E)	1	0	Ph	1	1	1	HB (NH)	1	1	0	HB (Im)	Ar	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-10.39
2b (P)	1	1	Ph	0	0	0	HB (NH)	0	0	0	1	Ar	1	1	1	HB (CO)	1	1	1	1	1	1	1	-10.25
6b (E, P)	1	1	Ph	0	0	0	HB (NH)	0	0	1	0	Ar	1	1	1	HB (CO)	1	0	1	1	1	1	1	-11.11
14b (E)	1	1	Ph	0	0	1	HB (NH)	HB (MeO)	0	0	1	Ar	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	HB (Im)	-10.72
14b (P)	1	1	Ar	0	1	1	HB (NH)	1	0	0	1	Ph	0	0	1	HB (Im)	0	1	1	1	1	1	1	-9.42
17b (E)	0	1	Ar	1	1	1	HB (NH)	1	1	0	1	Ph	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	-10.92
17b (P)	1	1	Ph	0	1	0	HB (NH)	0	0	1	1	Ar	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	-10.89
18b (E)	0	0	Ar	1	1	1	HB (NH)	1	1	1	1	Ph	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	-10.62
18b (P)	1	1	Ph	0	0	0	HB (NH)	0	0	1	0	Ar	0	0	1	HB (Im)	0	1	1	1	1	1	1	-10.26
26b (N, P)	1	1	Ph	0	0	0	HB (NH)	0	0	0	1	Ar	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	HB (Im)	-11.00
30b (E)	1	1	Ar	0	1	1	HB (NH)	1	0	0	HB (Im)	Ph	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	HB (Im)	-11.62
30b (P)	1	1	Ar	0	1	0	HB (NH)	0	0	0	0	Ph	0	1	1	HB (Im)	0	0	1	1	0	1	1	-10.78

*Objašnjenja:* Gornji deo table odgovara doking pozama *S* enantiomera, dok su u donjem delu date doking poze *R* enantiomera. Oznaka ‘0’ opisuje odsustvo interakcije između odgovarajućeg aminokiselinskog ostatka AChE i liganda, dok oznaka ‘1’, označava prisustvo bliskih kontakata između liganda i ostataka AChE. \*(E) – najbolje rangirana poza, (P)-poza koja pripada najviše popunjenom klasteru, (E, P) – ove poze su ekvivalentne; \*\* U ovim kolonama je naznačeno koja grupa liganda interaguje sa AS (Trp 86) odnosno sa PAS (Trp 286), oznaka Ph odgovara fenilamidnoj grupi, a oznaka Ar aroil fenil grupi jedinjenja. \*\*\*Naznačen je tip vodonične veze (HB) koji se fomira između funkcionalnih grupa liganda i aminokiselinskih osataka AChE: HB(NH) – između -NH- amidne grupe i –OH grupe bočnog ostatka Tyr 124; HB (MeO) – između metoksi grupe na fenilamidnom prstenu liganda i –OH grupe bočnog ostatka Ser 125, ili peptidne -NH- grupe Phe 295; HB(Im) – između N3 azota na imidazolskom prstenu liganda i –OH grupe Ser 203, ili peptidne -NH-grupe Phe 295; HB(CO) – između aroil karbonil grupe liganda i peptidne -NH- grupe Phe 295.



Detaljan opis doking poza za sve ligande je izvan okvira ovog teksta, ali ćemo dati detaljnu diskusiju vezanu za doking poze (rešenja) za tri najaktivnija jedinjenja **6b**, **17b** i **18b**, koje su prikazane na Slici 34. *S* Enantiomeri jedinjenja su obojeni tirkiznom, a *R* enantiomeri crvenom bojom. Nađeno je da su za sva jedinjenja doking poze *S* i *R* enantiomera veoma slične. Odnosno, da enantiomeri sva tri jedinjenja interaguju sa AChE na veoma sličan način. Ovo se ogleda i u RMSD<sup>††</sup> razlikama položaja atoma između poza enantiomera, koje ne prelaze 2.077 Å (za preklapanje koje uzima u obzir samo teške atome liganada, Tabela 11).

**Tabela 11.** RMSD razlike između doking poza *R* i *S* enantiomera, energetski najbolje rangiranih (*E*) i najbrojnijih (*P*) rešenja **6b**, **17b** i **18b**.

R. br. jedinjenja	RMSD, Å	
	sa H atomima	samo teški atomi
<b>6b</b>	1.811	1.810
<b>17b (E)</b>	2.350	1.480
<b>17b (P)</b>	2.077	2.077
<b>18b (E)</b>	1.874	1.220
<b>18 (P)</b>	2.312	1.440

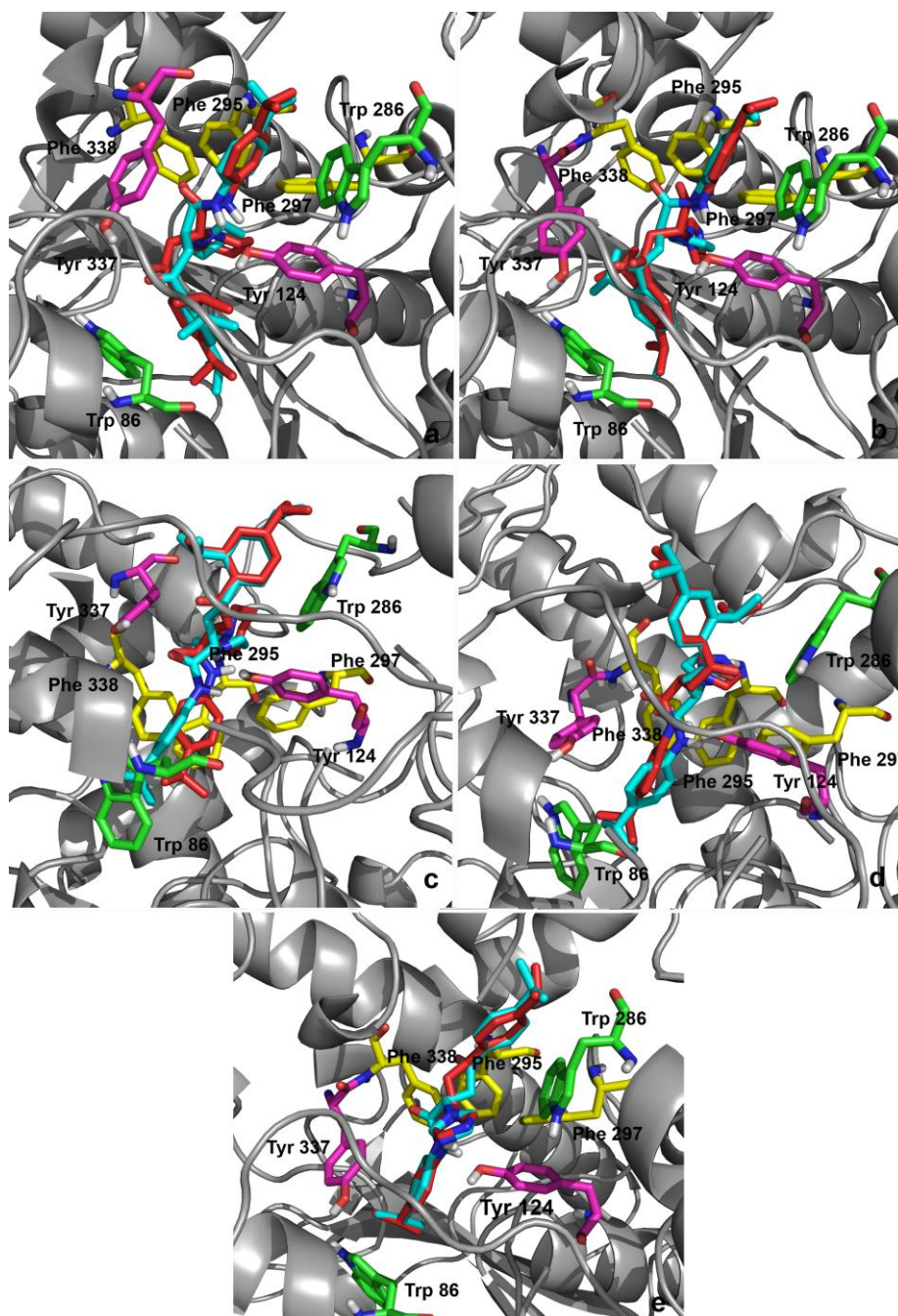
Na slici 34a i 34b su prikazane najbolje rangirane doking poze (prema procenjenoj slobodnoj energiji vezivanja  $\Delta G$ ) za *R* i *S* enantiomere jedinjenja **17b** i **18b**. Oba enantiomera oba jedinjenja su orijentisana unutar aktivnog mesta AChE na sličan način. Aroil-fenil-grupe su usmerene ka dnu šupljine aktivnog mesta i interaguju sa aromatičnim prstenovima aminokiselinskih ostataka Trp 86 i Tyr 337. Amidne -NH- grupe jedinjenja formiraju vodonične veze sa -OH grupom bočnog ostatka Tyr 124. Fenilamidni prstenovi oba jedinjenja su usmereni ka izlazu iz šupljine aktivnog mesta i interaguju sa bočnim ostacima Trp 286 (PAS) i Phe 295 i Phe 297 (acil džep). Piperidinski prsten derivata **17b** i imidazolski prsten derivata **18b** se nalaze u blizini aminokiselinskih ostataka katalitičke trijade, His 447 i Ser 203. Azot N3 imidazolskog prstena oba enantiomera jedinjenja **18b** formira vodoničnu vezu sa -OH grupom bočnog ostatka Ser 203. Aroil fenil prsten i odgovarajuće ciklolakilamino grupe se nalaze u blizini aminokiselinskih ostataka koji pripadaju oksianjonskoj šuplini, Gly 121 i Gly 122. Na Slici 34c i 34d su prikazane najbolje rangirane doking poze koje pripadaju najviše popunjenom klasteru za jedinjenja **17b** i **18b**.

<sup>††</sup> RMSD (eng. „Root Mean Square Deviation“) – srednja (uprosecena) vrednost položaja stih atoma dve različite konformacije molekula.

U ovom slučaju orijentacija liganada je suprotna u odnosu na energetske najbolje rangirane poze. Aroil-fenil-grupe liganada su usmerene ka izlazu iz šupljine aktivnog mesta AChE (PAS) i interaguju sa aromatičnim prstenovima aminokiselinskih ostataka Trp 286 i Tyr 72. Fenilamidne grupe oba jedinjenja su usmerene ka dnu šupljine aktivnog mesta i interaguju sa bočnim ostacima aminokiselinskih ostataka Tyr 337, Phe 338 i Trp 86. I ovde smo primetili da se kod energetski favorizovanih poza formira vodonična veza između -NH- grupe fenilamidnog dela liganada i -OH grupe Tyr 124. Važna razlika između energetski favorizovanih poza i onih koje pripadaju najviše popunjenom klasteru za jedinjenja **17b** i **18b** je da se ligandi u pozama koje pripadaju najviše popunjenom klasteru nalaze bliže PAS vezivnom mestu. Gornji deo šupljine aktivnog mesta je zapreminski veći u poređenju sa AS, i u ovom delu šupljine lako se mogu smestiti voluminozne diizopropil grupe na aroil fenil prstenovima jedinjenja **17b** i **18b**, i to u više različitih, ali suštinski sličnih konformacija. Verovatno zbog toga, algoritam za pretraživanje može naći više sličnih poza koje pripadaju istom klasteru. Cikloalkilamino-grupe jedinjenja **17b** i **18b**, se u pozama koje pripadaju najviše popunjenom klasteru, nalaze blizu ostataka acil džepa AChE, Phe 295 i Phe 297; dok se u energetski favorizovanim pozama te grupe nalaze blizu ostataka katalitičke trijade His 447 i Ser 203. Zbog toga, u ovom slučaju, N3 atom imidazolskog prstena jedinjenja **18b** ne može da formira vodoničnu vezu sa peptidnom -NH- grupom Phe 295.

Doking poze oba enantiomera jedinjenja **6b** su prikazane na Slici 34e. Energetski najbolje rangirana poza pripada najviše popunjenom klasteru doking rešenja. Oba enantiomera ostvaruju gotovo identične interakcije sa aminokiselinskim ostacima aktivnog mesta AChE. Procenjene slobodne energije vezivanja su veoma slične: -11,15 kcal/mol za S, odnosno -11,11 kcal/mol za R enantiomer. Fenilamidne grupe oba enantiomera su usmerene ka dnu šupljine aktivnog mesta AChE i formiraju hidrofobne interakcije sa aminokiselinskim ostacima Phe 338, Tyr 337 i Trp 86. Aroil-fenil-prstenovi oba enantiomera su usmereni ka izlazu iz šupljine i interaguju sa aminokiselinskim ostacima PAS mesta Tyr 72, Asp 74 i Trp 286. Kiseonikov atom aroil-karbonilne grupe formira vodoničnu vezu sa peptidnom -NH- grupom Phe 295. Za ovo jedinjenje samo nekoliko poza, od zadatih pedeset, je nađeno u orijentaciji u kojoj su aroil prstenovi usmereni ka dnu šupljine, ali sa značajno nižom procenjenom slobodnom energijom vezivanja. Prema tome, kada na aroil prstenu nisu prisutne voluminozne *i*-Pr grupe u položajima 2 i 4, koje mogu da formiraju važne hidrofobne interakcije sa aminokiselinskim ostacima aktivnog mesta

AChE i daju doprinos energetski favorizovanim pozama (ali koje ne pripadaju najviše popunjenom klasteru, kao u slučaju jedinjenja **17b** i **18b**) poza koja pripada najviše popunjenom klasteru postaje i energetski najbolje rangirana, sa fenilamidnom grupom usmerenom ka dnu šupljine aktivnog mesta.



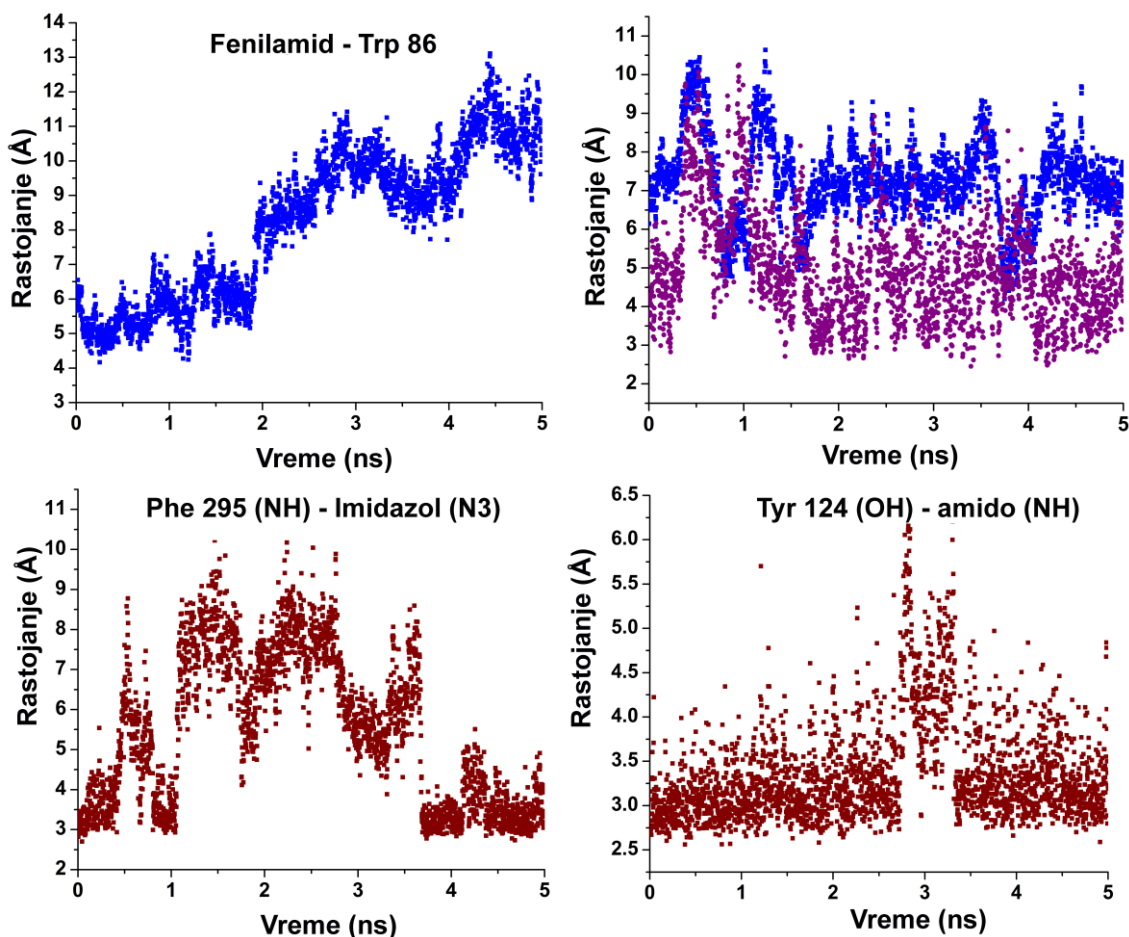
**Slika 34.** Doking poze jedinjenja **6b**, **17b** i **18b** u aktivnom mestu AChE. *S* Enantiomeri su obojeni tirkiznom, a *R* enantiomeri crvenom bojom. (a) energetski najbolje rangirana poza za **17b**; (b) energetski najbolje rangirana poza za **18b**; (c) poza koja pripada najviše popunjenom klasteru rešenja **17b**; (d) poza koja pripada najviše popunjenom klasteru rešenja **18b**; (e) doking rešenja za jedinjenje **6b**.

Prethodno opisani rezultati doking studija pružili su važan uvid u moguće interakcije oba enantiomera tri najaktivnija derivata (**6b**, **7b** i **18b**) sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mestu AChE. Detaljna analiza doking poza pokazala je da postoje dve moguće orijentacije liganda unutar šupljine aktivnog mesta AChE. U jednoj aroil-fenil-grupe liganda su usmerene ka dnu šupljine aktivnog mesta AChE, a u drugoj ove grupe su usmerene ka izlazu iz šupljine, blizu aminokiselinskih ostataka PAS. Ovaj poslednji tip poza pripada najviše popunjenom klasteru rešenja doking izračunavanja. Kod svih derivata, nezavisno od tipa poze, formira se vodonična veza između amidnih -NH- grupa liganada i -OH grupe bočnog ostatka Tyr 124.

#### 3.2.4.3 Studije molekulske dinamike za kompleks AChE i derivata (S)-**18b**

U prethodno opisanoj studiji molekuskog dokinga nije uzeta u obzir fleksibilnost proteina. Poznavanje varijacije interakcija, kao i konformacionih promena kompleksa enzima i liganda tokom vremena, može da pruži informacije o najpostojanijim interakcijama i o stabilnosti enzim-ligand kompleksa. Zbog toga je urađena 5 ns duga simulacija molekulske dinamike kompleksa S enantiomera jedinjenja **18b** i AChE, dobijenog dokingom. Simulacija je započeta iz energetski najpovoljnije doking poze, koja pripada najviše popunjenom klasteru rešenja. Na Slici 35 su prikazana najvažnija rastojanja između aminokiselinskih ostataka aktivnog mesta AChE i funkcionalnih grupa derivata **18b**. Tokom simulacije, ligand se pomera ka izlazu iz šupljine aktivnog mesta AChE, što se vidi iz postepenog povećanja rastojanja između centroida definisanih na indolovom prstenu Trp 86 i na fenilamidnom prstenu jedinjenja **18b**. Početno rastojanje iznosi 4 Å i do kraja simulacije dostiže oko 12 Å, Slika 35a. Na Slici 35b (plave tačke) prikazana je promena rastojanja tokom vremena između centroida na indolovom prstenu Trp 286 (ostatak koji pripada PAS) i centroida na aroil-fenil-prstenu jedinjenja **18b**. Tokom prve ns simulacije može se zapaziti najveća fluktuacija u rastojanju (od 4,5 do skoro 11 Å); nakon ovog vremena fluktuacija u rastojanju je stabilna sa prosečnom vrednošću od 7,5 Å. Praćeno je i rastojanje između ugljenikovog atoma metil-grupe *orto-i*-Pr grupe na aroil-fenil-prstenu jedinjenja **18b** i centroida definisanog na indolovom prstenu Trp 286. Profil ovog rastojanja tokom vremena (Slika 35b, ljubičaste tačke) je sličan profilu rastojanja između centroida definisanih na Trp 286 i na aroil fenil prstenu, i sugerise postojanje stabilne CH••• $\pi$  interakcije, sa prosečnim rastojanjem od oko 4 Å. Studije dokinga su ukazale na mogućnost

formiranja vodonične veze između peptidne -NH- grupe ostatka Phe 295 i azota N3 na imidazolovom prstenu derivata **18b**. Fluktuacija ovog rastojanja tokom vremena je prikazana na Slici 35c. Ova vodonična veza je stabilna tokom prvih 500 ps simulacije, posle čega rastojanje naglo raste (dakle veza se raskida) i ostaje veliko sve do kraja četvrte ns simulacije. Nakon ovog vremena, vrednost rastojanja opada, vodonična veza se ponovo formira i ostaje stabilna sve do kraja simulacije. Rastojanje između -OH grupe Tyr 124 i amidne -NH- grupe derivata **18b** je prikazano na Slici 35d. Ova vodonična veza, koja je primećena kod svih doking poza, za sva jedinjenja, stabilna je tokom čitave simulacije. Veoma kratkotrajan porast u rastojanju može se primetiti samo oko treće ns simulacije, posle čega se veza uspostavlja ponovo i ostaje stabilna do kraja simulacije. Procenat frejmova u kojima je ova veza uspostavljena (tzv. procenat zauzetosti) iznosi 72,52 %. Prema rezultatima simulacija molekulske dinamike, najstabilnije, i prema tome verovatno najvažnije interakcije između funkcionalnih grupa jedinjenja **18b** i aminokiselinskih ostataka u aktivnom mestu AChE su vodonična veza između amidne -NH- grupe liganda i -OH grupe Tyr 124 i CH••• $\pi$  interakcija između metil-grupe *orto-i*-Pr grupe jedinjenja **18b** i indolovog prstena Trp 286. Kako se ligand tokom simulacije pomera ka PAS mestu na AChE gube se CH••• $\pi$  interakcije sa Trp 86. Verovatno je da bi dodatni supstituenti, voluminozniji od *i*-Pr grupe u *para*-položaju fenilamidne grupe povećavali jačinu inhibicionog dejstva tako dizajniranih derivata.



**Slika 35.** Najvažnija rastojanja između aminokiselinskih ostataka AChE i funkcionalnih grupa jedinjenja **18b**, dobijenih iz 5 ns simulacije MD: (a) rastojanje između centroida fenilamidnog prstena **18b** i centroida indolovog prstena Trp 82; (b) Plave tačke-rastojanje između centroida aroil-fenil-prstena jedinjenja **18b** i centroida indolovog prstena Trp 286; ljubičaste tačke – rastojanje između centroida indolovog prstena Trp 286 i Me grupe *ortho-i*-Pr supstituenta; (c) rastojanje između peptidne -NH- grupe Phe 295 i N3 azota na imidazolovom prstenu jedinjenja **18b**; (d) rastojanje između kiseonika -OH grupe Tyr 124 i azotovog atoma amidne -NH- grupe jedinjenja **18b**.

Ukratko, ispitan je uticaj strukturnih modifikacija 4-aril-4-okso-2-aminilbutanamida na inhibicionu aktivnost i selektivnost prema AChE i BChE. Strukturne promene na amidnom delu molekula obuhvatile su uvođenje 3,5-dimetoksi ili 4-*i*-Pr supstituenata na fenilamidni prsten, ili zamenu fenil-prstena cikloheksil-grupom uz zadržavanje alkil-supstituenata (4-*i*-Pr, 2,4-*di-i*-Pr i  $\beta$ -teralinil) na aroil-fenil-prstenu jedinjenja koji imaju povoljan uticaj na jačinu inhibicionog dejstva. Za Majklovu adiciju na aktiviranu dvostruku vezu su upotrebljeni sledeći ciklični amini: piperidin, imidazol, morfolin, *N*-metilpiperazin, 4-benzilpiperidin i 4-(2-*N,N*-dimetilaminoeti)-1-piperazin. Dvanaest jedinjenja, uglavnom piperidinskih i imidazolskih derivata, inibira aktivnost AChE u niskom mikromolarnom opsegu koncentracija. Ova jedinjenja su neaktivna prema BChE. Tri jedinjenja su inhibirala aktivnost BChE u niskom mikromolarnom ili submikromolarnom opsegu koncentracija.

Sva tri jedinjenja su 2,4-di-*i*-Pr-supstituisana na aroil-fenil-prstenu i sa *N*-metilpiperazinskim prstenom na položaju C2 butanskog dela molekula. Kao i kod prethodnog kongenernog seta,<sup>289</sup> priroda cikloalkilamino-grupe utiče na selektivnost jedinjenja. Najaktivniji inhibitor AChE, derivat **17b**, ponaša se kao mešoviti tip inhibitora, što ukazuje na mogućnost vezivanja jedinjenja za slobodan enzim, ali i za enzim-supstrat kompleks. Doking studija, urađena za sedam najaktivnijih inhibitora AChE, pokazala je da svi derivati mogu da formiraju vodoničnu vezu između amidne -NH- grupe ispitivanih derivata i -OH grupe Tyr 124. Simulacija molekulske dinamike kompleksa AChE sa jedinjenjem **18b**, pokazala je da je ova vodonična veza jedna od najstabilnijih (najpostojanijih) interakcija u kompleksu, zajedno sa CH••• $\pi$  interakcijom koja se formira između metil-grupe *orto-i*-Pr supstituenta na aroil-fenil-prstenu jedinjenja **18b** i aromatičnog indolovog prstena Trp 286. Iako umereno aktivna, jedinjenja se mogu dalje strukturno modifikovati tako da se dobiju derivati sa većom jačinom inhibicionog dejstva prema AChE i BChE.

### 3.3. Kvantitativna analiza odnosa trodimenzionalne strukture i aktivnosti dualnih reverzibilnih inhibitora AChE i dizajn novih heterodimernih takrinskih inhibitora

U prethodnom poglavlju su opisani dizajn i sinteza reverzibilnih umereno aktivnih, mikromolarnih inhibitora acetilholinesteraze. Mešoviti tip inhibicije, određen za derivat **17b**, pokazao je da postoji mogućnost da aktivni 4-aril-4-okso-2-aminilbutanamidi pokazuju afinitet vezivanja za mesto na AChE koje je udaljeno od aktivnog mesta (AS). Jedna od dobro poznatih strategija dizajna inhibitora holinesteraza visokog afiniteta jeste povezivanje dobro poznatih inhibitora AS sa strukturnim fragmentima inhibitora nešto nižeg afiniteta u novi, dualni molekul, obično preko polimetilenskog linkera odgovarajuće dužine. Tako se tetrahidroakridinil-polialkil-amini mogu upotrebiti za Majklovu adiciju na aktiviranu dvostruku vezu aroilakrilnih kiselina ili njihovih amida, u cilju dobijanja dualnih reverzibilnih inhibitora AChE koji bi se simultano vezivali za AS i za PAS AChE. Međutim, zbog brojnih mogućnosti kombinovanja različitih strukturnih fragmenata prilikom dizajna ovih molekula (različita veličina alicikličnih prstenova na takrinskom fragmentu, različita dužina linkera, različiti tip Majklovog akceptora i supstituenata na njemu) odlučili smo da izvedemo 3D QSAR model koji bi poslužio za predviđanje jačine dejstva *in silico* dizajniranih reverzibilnih dualnih inhibitora AChE zasnovanih na strukturi takrina i amida aroilakrilnih kiselina.

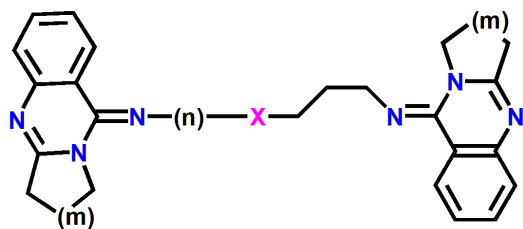
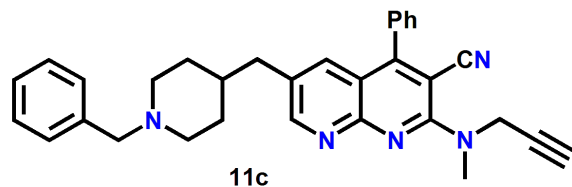
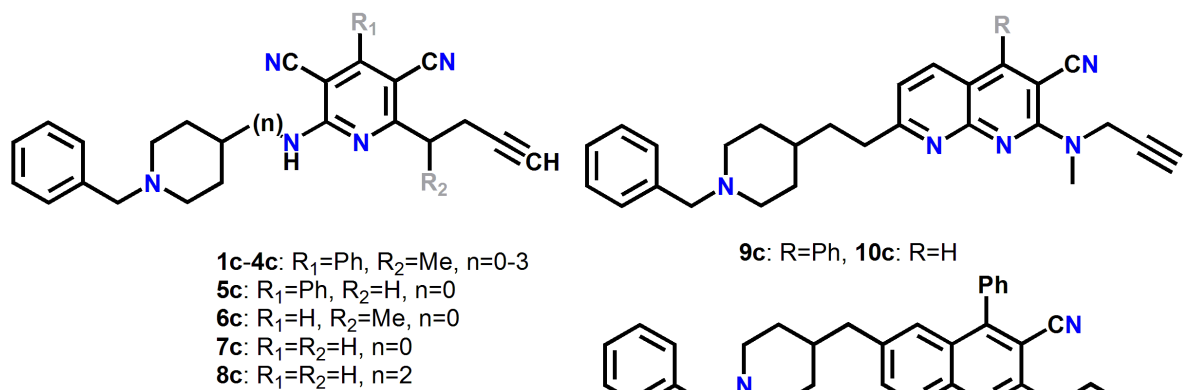
#### 3.3.1 Opis seta dualnih inhibitora AChE i izbor konformacija koje su korišćene za izvođenje 3D QSAR modela

Cilj ove studije je bio da se izvedu 3D-QSAR modeli zasnovani na GRIND-2 deskriptorima (nezavisnim od međusobnog prostornog svrstavanja molekula) za set od 110 dualnih reverzibilnih inhibitora AChE.<sup>294</sup> Ovako izveden model je upotrebljen kao smernica za dizajn heterodimernih inhibitora zasnovanih na strukturi takrina i strukturi amida aroilakrilnih kiselina povezanih polimetilenskim linkerom pogodne dužine.

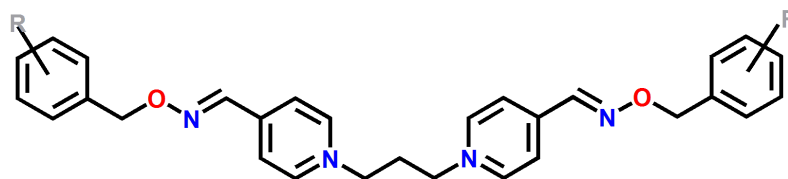
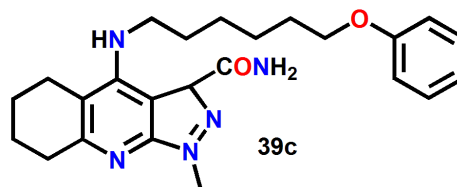
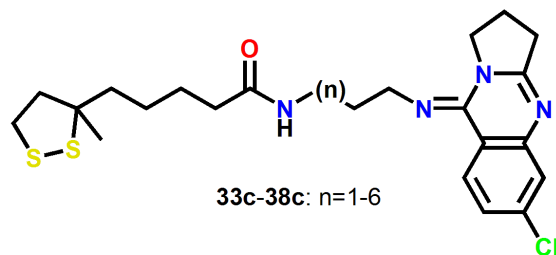
Za izvođenje modela korišćeno je šest strukturno različitih grupa jedinjenja: *N*-benzilpiperidinski derivati (**1c-11c**),<sup>295</sup> homodimerni hinazolinimini (**12c-32c**),<sup>296</sup> heterodimeri hinazolinimina i lipoične kiseline (**33c-38c**),<sup>297</sup> dimerni piridinski inhibitori (**40c-67c**),<sup>298</sup> heterodimeri takrina i supstituisanih benzena (**39c, 68c-80c i 97c-110c**),<sup>299</sup> i heterodimeri takrina i ksanomelina (**81c-96c**),<sup>300</sup> što je dalo set od ukupno 110 jedinjenja u



opsegu aktivnosti od četiri  $pIC_{50}$  jedinice. Strukture jedinjenja su prikazane na Shemama 52 i 53. Obzirom da su eksperimentalni podaci o jačini inhibicionog dejstva ( $IC_{50}$  vrednosti) sakupljeni od različitih istraživačkih grupa (preuzeti iz različitih literaturnih izvora), eksperimentalni uslovi za određivanje  $IC_{50}$  vrednosti za inhibiciono dejstvo prema AChE za različite kongenerne serije jedinjenja u okviru seta su detaljno ispitani i upoređeni. U svim eksperimentima korišćena je Elmanova spektrofotometrijska metoda za određivanje aktivnosti jedinjenja, na pH 8.00 sa ASCh kao supstratom. Kao izvor AChE, korišćen je enzim iz električne jegulje.  $IC_{50}$  Vrednosti za takrin (Slika 20), kao referentno jedinjenje, bile su poredive kod svih istraživačkih grupa, osim u referenci 297. Eksperimentalno određena  $IC_{50}$  vrednost za takrin je bila četiri puta niža od eksperimentalno određenih  $IC_{50}$  vrednost za takrin u ostalim radovima iz kojih smo podatke preuzeli. Zbog toga su  $IC_{50}$  vrednosti za ovu grupu jedinjenja renormalizovane prema preporuci Martin-Santamarie i saradnika.<sup>301</sup> Inhibiciono dejstvo prema AChE svih jedinjenja iz seta, kao  $pIC_{50}$  vrednosti, su prikazane u Tabeli 12.

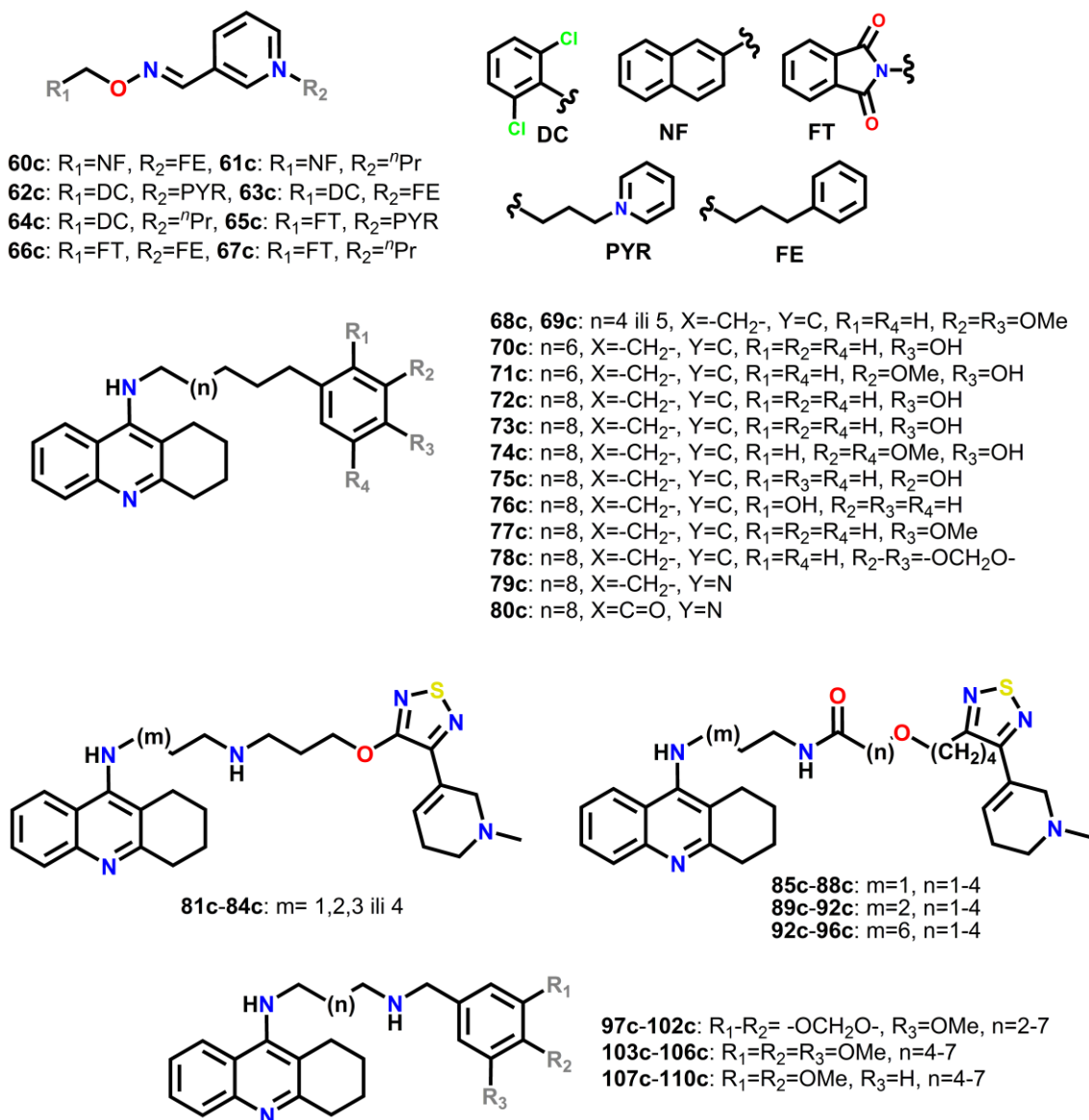


- 12c, 13c:**  $n = 3$ ,  $m = 1$ ,  $X = \text{NMe}$ ,  $\text{NAC}$   
**14c, 15c:**  $n = 3$ ,  $m = 4$ ,  $X = \text{NMe}$ ,  $\text{NAC}$   
**16c, 17c:**  $n = 4$ ,  $m = 1$ ,  $X = \text{NMe}$ ,  $\text{NAC}$   
**18c, 19c:**  $n = 4$ ,  $m = 4$ ,  $X = \text{NMe}$ ,  $\text{NAC}$   
**20c, 21c:**  $n = 4$ ,  $m = 1, 4$ ,  $X = \text{EtC(O)N-}$   
**22c, 23c:**  $n = 4$ ,  $m = 1, 4$ ,  $X = (\text{CH}_3)_2\text{C(O)N-}$   
**24c-28c:**  $n = 4$ ,  $m = 4$ ,  $X = \text{CH}_3\text{C(O)NCH}_2\text{C(O)N-}$ ,  
 $\text{tBuC(O)N-}$ ,  $\text{BuC(O)N-}$ ,  $\text{iBuC(O)N-}$ ,  $\text{tPeC(O)N-}$   
**29c, 30c:**  $n = 3$ ,  $m = 1, 4$ ,  $X = -\text{CH}_2-$   
**31c, 32c:**  $n = 4$ ,  $m = 1, 4$ ,  $X = -\text{CH}_2-$



- R = 40c:**  $\text{H}$ , **41c:**  $3\text{-CN}$ , **43c:**  $2\text{-NO}_2$ , **44c:**  $3\text{-NO}_2$ , **45c:**  $4\text{-NO}_2$ ,  
**46c:**  $2\text{-OMe}$ , **47c:**  $3\text{-OMe}$ , **48c:**  $4\text{-OMe}$ , **49c:**  $2,6\text{-diOMe}$ ,  
**50c:**  $2,5\text{-diOMe}$ , **51c:**  $2\text{-Cl}$ , **52c:**  $2\text{-F}$ , **53c:**  $2\text{-naftil}$ , **54c:**  $4\text{-Cl}$   
**55c:**  $2,4\text{-diCl}$ , **56c:**  $2\text{-Me}$ , **57c:**  $3\text{-Me}$ , **58c:**  $4\text{-Me}$ , **59c:**  $2\text{-CN}$

**Shema 52.** Strukture jedinjenja **1c-59c** korišćene za izvođenje 3D-QSAR modela



**Shema 53.** Strukture jedinjenja **60c-110c** korišćene za izvođenje 3D-QSAR modela

Dualni reverzibilni inhibitori AChE se sastoje iz dva aromatična policiklična molekulska fragmenta koji su spojeni polimetilenskim linkerom odgovarajuće dužine. Zbog toga su ova jedinjenja veoma fleksibilna. Kako je opisano u poglavlju 2.2., metod zasnovan na GRIND-2 molekulskim deskriptorima je neosetljiv na male konformacione promene jedinjenja, međutim za dobijanje validnog modela, potrebno je koristiti konformacije jedinjenja koje su najpribližnije bioaktivnim konformacijama molekula. Jedan od ciljeva ove studije bio je i da se ispita uticaj korišćenja konformacija molekula dobijenih na osnovu različitih kriterijuma na statistički kvalitet i interpretabilnost modela. Zbog toga su izvedena tri nezavisna 3D-QSAR modela upotrebom konformacija jedinjenja koje su dobijene na osnovu različitih kriterijuma: (a) konformacije minimalne energije izvedene korišćenjem MMFF94s polja sila,

u daljem tekstu OMEGA model, (b) konformacije koje su najsličnije konformaciji liganda iz kristalne strukture sa AChE, u daljem tekstu ROCS model i (c) konformacije dobijene molekulskim dokingom liganda u aktivno mesto AChE, u daljem tekstu VINA model.

**Tabela 12.** Eksperimentalno određene  $pIC_{50}$  vrednosti jedinjenja **1c-110c** za inhibiciju aktivnosti AChE iz električne jegulje.

Br. Jed.	$pIC_{50}$	Br. Jed.	$pIC_{50}$	Br. Jed.	$pIC_{50}$
1c*	5,921	38c	6,330	75c*	8,426
2c*	6,567	39c	5,031	76c	8,506
3c	7,796	40c*	5,455	77c	8,417
4c	7,584	41c	5,848	78c	8,812
5c	5,398	42c*	5,846	79c	8,932
6c	7,886	43c	5,863	80c*	8,016
7c*	7,432	44c	6,036	81c	7,200
8c	7,276	45c	6,143	82c	7,360
9c	7,796	46c	5,551	83c	7,660
10c*	5,638	47c	5,710	84c*	7,580
11c*	6,276	48c*	4,684	85c	7,830
12c	6,267	49c*	4,943	86c*	7,870
13c	6,480	50c	4,932	87c	7,970
14c	6,692	51c	6,236	88c	7,990
15c*	7,310	52c	5,939	89c*	7,920
16c	6,251	53c	6,055	90c	7,970
17c	7,678	54c	5,351	91c	8,070
18c	6,217	55c	6,468	92c*	8,060
19c*	6,752	56c	5,762	93c	8,180
20c	7,745	57c	5,684	94c	7,640
21c*	6,539	58c*	5,099	95c	8,190
22c	8,174	59c	5,879	96c*	8,210
23c	6,815	60c	5,775	97c	7,564
24c	7,119	61c	5,337	98c	7,722
25c	6,271	62c	4,527	99c	8,384
26c*	5,976	63c	5,842	100c	8,352
27c	6,207	64c	4,996	101c	8,714
28c	6,101	65c*	4,588	102c	8,346
29c*	7,102	66c	6,161	103c	8,267
30c	7,187	67c*	5,262	104c	8,379
31c	7,236	68c	7,032	105c	8,627
32c	4,842	69c	7,583	106c	8,312
33c*	5,547	70c	8,194	107c	8,127
34c	5,339	71c*	7,971	108c	8,236
35c	5,358	72c*	8,728	109c	8,562
36c	6,129	73c	8,947	110c	8,217
37c	5,712	74c	8,939		

\*Jedinjenja pripadaju test setu 1.

Za izvođenje deskriptora, korišćene su četiri GRID probe: hidrofobna (DRY), donor vodonične veze (N1), acceptor vodonične veze (O) i proba koja opisuje oblik molekula (TIP). Ove probe opisuju uobičajene tipove interakcija između liganda i receptora. Statistički podaci za PCA model su dati u Tabeli 13. Tri PLS modela, izvedena na osnovu različitih konformacija molekula **1c-110c**, imaju dobre statističke parametre i prediktivnost (Tabela 14). Eksperimentalne i izračunate  $pIC_{50}$  vrednosti su prikazane u Tabeli 15. Grafici PLS koeficijenata, dobijeni sa tri latentne varijable, za svaki model, su prikazani na Slici 36.

**Tabela 13.** Statistički parametri PCA modela

	LV	SSX	SSX <sub>acc</sub>	VarX	VarX <sub>acc</sub>
OMEGA	1	35,39	35,93	35,28	35,28
	2	17,76	53,69	17,46	52,74
	3	6,46	60,15	6,17	58,91
	4	4,66	64,81	4,42	63,33
	5	4,55	68,96	3,99	67,31
ROCS	1	39,03	39,03	38,40	38,40
	2	11,07	50,10	10,67	49,07
	3	8,13	58,23	7,86	56,93
	4	5,05	63,28	4,81	61,74
	5	3,28	66,55	3,05	64,78
VINA	1	38,37	38,37	37,73	37,73
	2	9,60	47,97	9,15	46,88
	3	7,08	55,04	6,74	53,62
	4	6,38	61,42	6,16	59,79
	5	4,11	65,64	3,90	63,69

**Tabela 14.** Statistički parametri PLS modela.<sup>#</sup> Modeli su izvedeni korišćenjem različitih konformacija molekula, kao što je opisano u tekstu.

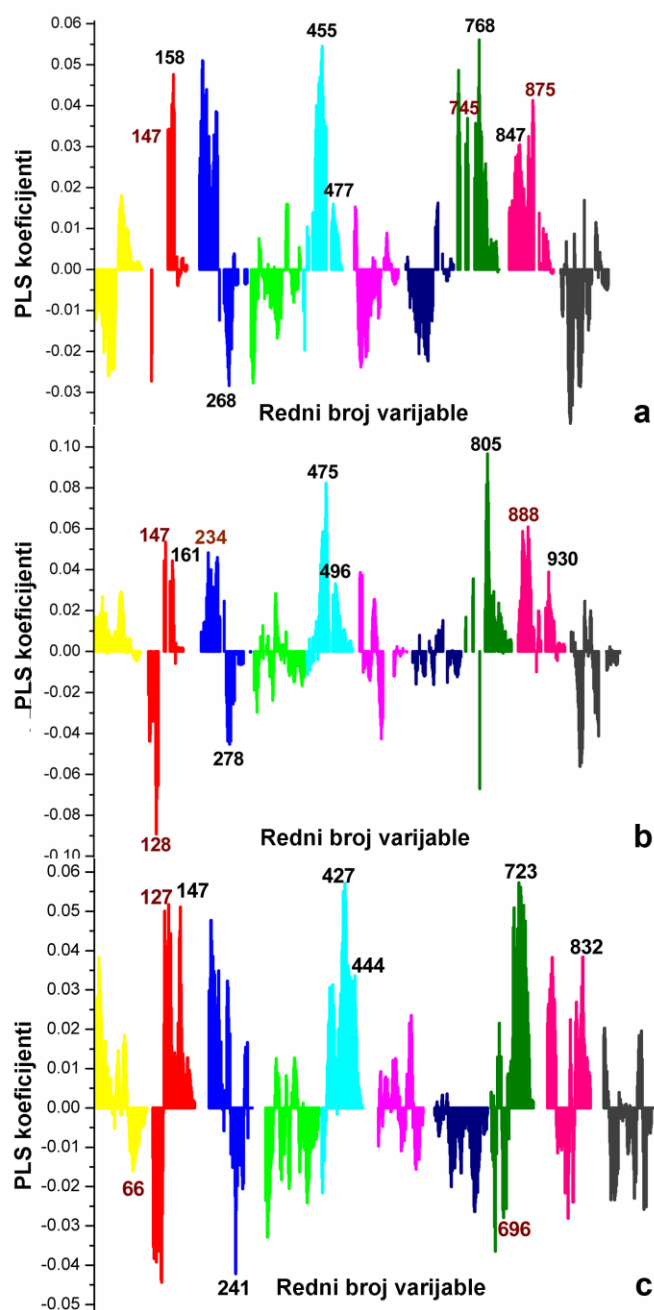
	LV	SSX	SSX <sub>acc</sub>	SDEC	SDEP	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>acc</sub>	Q <sup>2</sup> <sub>acc</sub> (5RG)	Q <sup>2</sup> <sub>acc</sub> (LTO)	Q <sup>2</sup> <sub>acc</sub> (LOO)
OMEGA	1	34,73	34,73	0,77	0,80	0,60	0,60	0,57	0,60	0,58
	2	8,48	43,21	0,66	0,73	0,71	0,71	0,64	0,68	0,65
	3	13,62	56,83	0,63	0,73	0,03	0,73	0,64	0,66	0,65
ROKS	1	39,63	39,63	0,71	0,73	0,67	0,67	0,65	0,62	0,65
	2	7,78	47,40	0,56	0,62	0,12	0,79	0,74	0,69	0,75
	3	3,91	51,31	0,48	0,62	0,05	0,84	0,75	0,72	0,76
VINA	1	36,76	36,76	0,75	0,77	0,63	0,63	0,60	0,60	0,60
	2	7,69	44,45	0,63	0,70	0,11	0,74	0,67	0,68	0,68
	3	4,21	48,66	0,55	0,73	0,06	0,80	0,65	0,66	0,66

<sup>#</sup> SSX- procenat sume kvadrata X objašnjen LV, SSX<sub>acc</sub>- akumulativni procenat sume kvadrata X objašnjen LV, SDEC - standardna devijacija izračunavanja, SDEP - standardna devijacija predviđanja, R<sup>2</sup> - doprinos LV koeficijentu korelacije modela, R<sup>2</sup><sub>acc</sub> - akumulativni koeficijent korelacije modela, Q<sup>2</sup><sub>acc</sub> - indeks prediktivne sposobnosti modela

Tabela 15. Eksperimentalno dobijene i izračunate pIC<sub>50</sub> vrednosti.

Br. Jed.	Eksp. pIC <sub>50</sub>	Izračunato pIC <sub>50</sub>			Br. Jed.	Eksp. pIC <sub>50</sub>	Izračunato pIC <sub>50</sub>		
		OMEGA	ROCS	VINA			OMEGA	ROCS	VINA
1c	5,921	6,187	6,371	6,388	56c	5,762	5,533	5,274	5,806
2c	6,567	6,857	6,374	6,082	57c	5,684	5,500	5,211	5,657
3c	7,796	6,920	7,023	6,904	58c	5,099	5,468	5,266	5,563
4c	7,584	6,821	6,868	6,860	59c	5,879	5,630	5,966	5,611
5c	5,398	6,484	6,578	6,823	60c	5,775	5,733	6,040	5,715
6c	7,886	7,213	6,587	6,906	61c	5,337	5,714	5,412	5,721
7c	7,432	6,974	7,281	7,401	62c	4,527	6,085	5,717	5,665
8c	7,276	7,043	7,288	7,061	63c	5,842	6,000	5,708	5,678
9c	7,796	7,126	6,858	6,612	64c	4,996	5,749	5,172	5,533
10c	5,638	5,423	6,458	6,702	65c	4,588	5,655	5,649	5,986
11c	6,276	6,581	6,567	6,570	66c	6,161	5,655	5,713	6,187
12c	6,267	7,194	6,401	6,850	67c	5,262	5,705	5,440	5,957
13c	6,480	6,861	6,575	6,526	68c	7,032	7,886	7,596	7,551
14c	6,692	7,520	6,008	6,207	69c	7,583	7,747	7,688	8,156
15c	7,310	6,451	6,846	5,723	70c	8,194	8,082	8,245	8,171
16c	6,251	6,944	5,669	6,692	71c	7,971	8,036	7,744	8,740
17c	7,678	7,034	7,696	6,778	72c	8,728	8,743	8,464	8,444
18c	6,217	7,308	6,155	5,773	73c	8,947	8,896	8,790	8,437
19c	6,752	6,827	7,058	6,888	74c	8,939	9,012	8,840	8,646
20c	7,745	6,893	7,778	6,506	75c	8,426	8,797	8,217	8,353
21c	6,539	6,847	6,578	6,167	76c	8,506	8,339	7,974	8,500
22c	8,174	7,193	7,481	6,959	77c	8,417	7,853	8,191	8,468
23c	6,815	6,974	7,349	6,910	78c	8,812	8,584	8,993	8,747
24c	7,119	7,074	6,830	7,254	79c	8,932	8,327	8,913	8,160
25c	6,271	6,845	7,042	6,791	80c	8,016	7,025	7,352	7,780
26c	5,976	6,687	6,396	5,955	81c	7,200	7,721	7,369	7,289
27c	6,207	6,929	6,347	6,180	82c	7,360	7,682	7,906	7,083
28c	6,101	6,828	6,311	6,573	83c	7,660	7,385	8,038	8,155
29c	7,102	6,930	7,008	6,700	84c	7,580	7,690	7,956	8,207
30c	7,187	6,852	6,500	6,834	85c	7,830	6,735	7,801	7,886
31c	7,236	6,818	7,104	6,660	86c	7,870	6,828	8,044	7,876
32c	4,842	6,747	6,558	6,839	87c	7,970	6,780	7,544	7,380
33c	5,547	6,495	5,796	5,983	88c	7,990	6,774	7,823	7,770
34c	5,339	6,619	5,912	6,317	89c	7,920	6,812	7,965	7,859
35c	5,358	6,730	5,760	6,313	90c	7,970	6,688	8,044	7,701
36c	6,129	6,751	6,297	6,087	91c	8,070	6,760	7,964	7,797
37c	5,712	6,631	6,231	5,696	92c	8,060	6,588	7,624	8,056
38c	6,330	6,516	6,336	6,052	93c	8,180	6,978	7,833	8,098
39c	5,031	6,931	6,221	5,722	94c	7,640	6,676	7,755	7,976
40c	5,455	5,590	5,422	5,658	95c	8,190	6,875	7,891	8,020
41c	5,848	6,231	5,980	5,159	96c	8,210	6,874	8,059	7,739
42c	5,846	5,761	5,581	5,548	97c	7,564	8,067	7,420	7,340
43c	5,863	5,585	6,330	5,977	98c	7,722	7,917	7,630	7,717
44c	6,036	6,166	6,181	5,907	99c	8,384	7,911	7,798	8,665
45c	6,143	5,885	5,506	6,214	100c	8,352	8,434	8,587	8,256
46c	5,551	5,473	5,389	5,440	101c	8,714	8,658	8,300	8,396
47c	5,710	5,455	5,155	5,328	102c	8,346	8,502	8,466	8,268
48c	4,684	5,464	4,992	5,044	103c	8,267	8,470	8,006	8,320
49c	4,943	5,441	5,193	5,239	104c	8,379	8,274	8,922	8,529
50c	4,932	5,806	5,146	5,551	105c	8,627	8,716	8,512	8,863

51c	6,236	5,575	5,512	5,676	106c	8,312	8,650	8,441	8,543
52c	5,939	5,591	5,448	5,586	107c	8,127	8,258	7,844	8,336
53c	6,055	5,464	5,343	5,987	108c	8,236	8,258	8,477	8,273
54c	5,351	5,453	5,185	5,375	109c	8,562	8,783	8,669	8,472
55c	6,468	5,964	6,004	5,583	110c	8,217	8,505	8,827	8,339



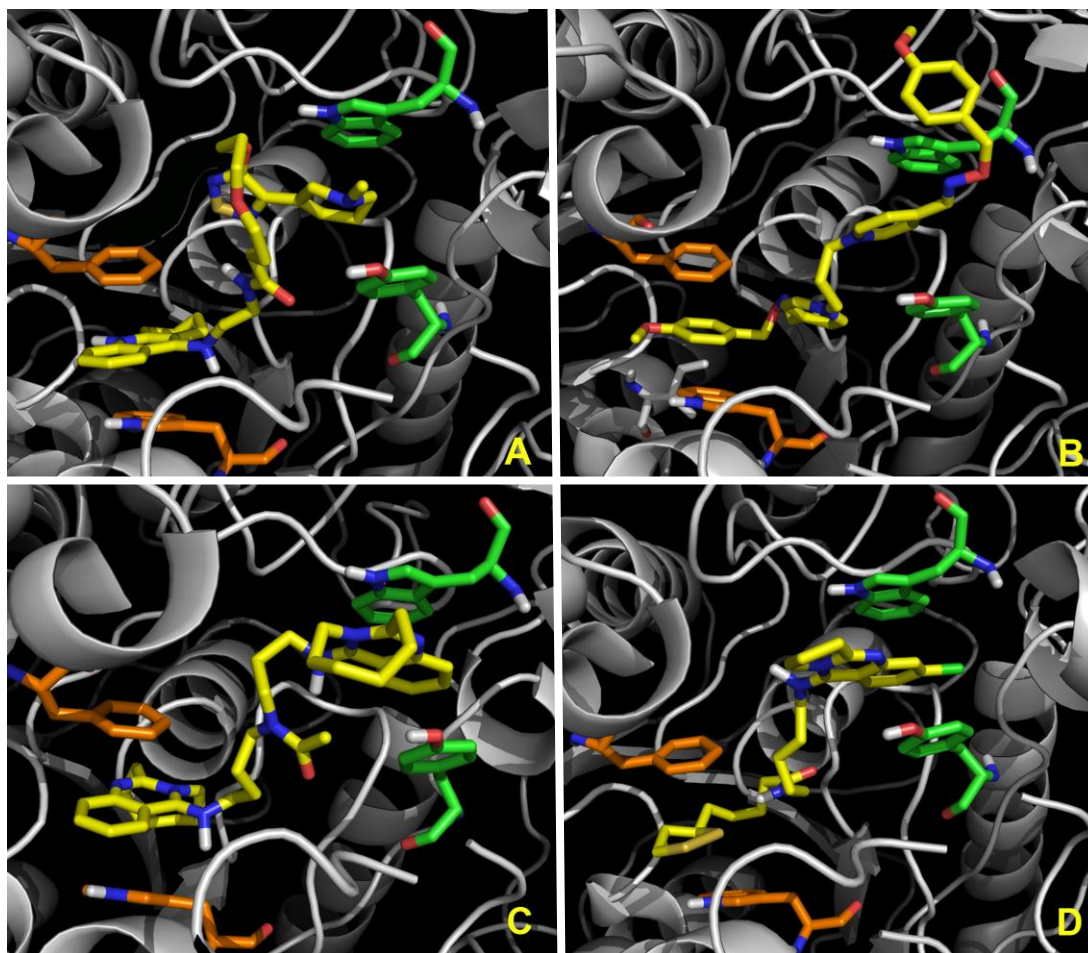
**Slika 36.** Grafici PLS koeficijenta dobijeni sa 3LV za modele izvedene iz: (a) OMEGA konformacija, (b) ROCS konformacija, (c) VINA konformacija. Tip varijabli je označen bojom: DRY-DRY - žuta, O-O - crvena, N1-N1 - plava, TIP-TIP - zelena, DRY-O - tirkizna, DRY-N1 - roze, DRY-TIP - tamno plava, O-N1 - tamno zelena, O-TIP - ružičasta, N1-TIP - siva. Varijable označene crvenim brojevima su specifične za dati model.

U daljem tekstu ćemo opisati osnovna zapažanja o farmakofornim svojstvima molekula koja imaju značajan uticaj na antiholinestraznu aktivnost jedinjenja, za svaki model pojedinačno. Dve grupe jedinjenja sadrže takrinski fragment na jednom kraju molekula. Zato treba naglasiti da su rezultati modela interpretirani na osnovu široko prihvaćene pretpostavke (zasnovane na kristalografskim podacima i podacima iz SAR studija) da se ova jedinjenja vezuju za aktivno mesto AChE tako da takrinski fragment interaguje sa AS a drugi aromatični fragment molekula interaguje sa PAS. Ova pretpostavka je takođe u skladu sa dobijenim doking pozama za jedinjenja **1c-110c**.

#### *3.3.1.1. Kratak opis doking rešenja*

Detaljan opis poza molekula unutar šupljine aktivnog mesta AChE dobijenih dokingom je izvan okvira ovog teksta, ali je potrebno navesti nekoliko važnih zapažanja. Sva jedinjenja koja imaju takrinski fragment su smeštena unutar aktivnog mesta AChE tako da takrinski sistem kondenzovanih prstenova formira steking interakcije sa aromatičnim prstenovima bočnih ostataka Trp 84 i Phe 330 koji pripadaju AS. Gornji aromatični (dimeri takrina i supstituisanih benzena, **68c-80c** i **97c-102c**) ili aliciklični prsten (dimeri takrina i ksanomelina **81c-96c**) interaguje sa aromatičnim prstenovima bočnih ostataka Trp 279 i Tyr 70 koj pripadaju PAS. Kod doking poza piridinskih dimera (**40c-59c**) jedan aromatičan fragment interaguje sa AS, međutim, kako su jedinjenja veoma dugačka, drugi aromatični fragment ne može da zauzme povoljnu konformaciju i interaguje sa ostacima PAS, već izlazi izvan šupljine aktivnog mesta AChE. Doking poze dimernih hinazolinimina (**12c-32c**) su veoma slične takrinskim derivatima. Kod doking poza dimera hinazolinimina i lipočne kiseline (**33c-38c**) primećen je veći broj poza kod kojih lipoična kiselina interaguje sa aminokiselinskim ostacima AS. Važne doking poze za pojedine molekule su prikazane na Slici 37.





**Slika 37.** Doking poze: a) dimera takrina i ksanomelina, b) bispiridinijskih jedinjenja, c) heterodimera hinazolinimina, i d) heterodimera hinazolinimina i lipoične kiseline. Ligandi su obojeni žutom bojom, ostaci koji pripadaju AS (Trp 84 i Phe 330) narandžastom, a ostaci koji pripadaju PAS (Trp 279 i Tyr 70) zelenom bojom.

### 3.3.2. Opis modela zasnovanih na različitim konformacijama jedinjenja 1c-110c

#### 3.3.2.1. Model zasnovan na konformacijama minimalne energije (OMEGA model)

Najvažnije varijable za ovaj model su prikazane na Slici 38. Ekspresija važnih varijabli za sva jedinjenja data je u Prilogu 3a.

U O-O bloku, sve varijable koje su pozitivno korelisane sa aktivnošću (odn. jačinom dejstva jedinjenja) imaju visok uticaj na model i prisutne su samo kod najaktivnijih jedinjenja. Varijabla O-O 147 (14,08 – 14,40 Å) spaja MIF-ove povezane se dve sekundarne amino-grupe linkera jedinjenja kod izduženih konformacija dimera takrina i benzena, ili one povezane sa protonovanim piridinskim azotom takrinskog fragmenta i udaljenom amino-grupom linkera, kod savijenih konformacija dimera takrina i benzena i dimera takrina i ksanomelina. Varijable O-O 150 (15,04 – 15,36 Å), 156 (16,96 – 17,28 Å) i 158 (17,60 –

17,92 Å, Slika 38a) spajaju MIF-ove povezane sa protonovanim piridinskim azotom takrinskog fragmenta i udaljenom amino grupom linkera kod heterodimera takrina i supstituisanih benzena. Prema tome, prisustvo dva donora vodonične veze molekula, na međusobnom prostornom rastojanju od 14,08 do 17,28 Å, ima pozitivan uticaj na jačinu dejstva jedinjenja i predstavlja strukturni motiv koji je prisutan samo kod najaktivnijih derivata.

U N1-N1 bloku, najinformativnije su varijable koje imaju negativan uticaj na model, tj. one koje su negativno korelisane sa jačinom dejstva jedinjenja. Varijable 263 (18,24 - 18,56 Å), 267 (19,52 - 19,84 Å) i 268 (19,84 - 20,16 Å) spajaju MIF-ove povezane sa dva udaljena atoma kiseonika kod bispiridinijumskih derivata (**40c-67c**) ili sa dva heterociklična azota kod homodimernih hinazolinimina (**12c-32c**). Ove varijable su prisutne samo kod jedinjenja sa najmanjom jačinom dejstva. Prema tome, dva akceptora vodonične veze na međusobnom prostornom rastojanju većem od 18,24 Å imaju negativan uticaj na jačinu inhibicionog dejstva prema AChE i ovaj strukturni motiv pravi jasnu razliku između derivata sa najmanjom jačinom dejstva i ostalih, aktivnijih jedinjenja.

U DRY-O bloku, varijabla 455 (13,76 - 14,08 Å, Slika 38b) ima veliki pozitivan uticaj na model i prisutna je kod najaktivnijih jedinjenja (Prilog 3a). Za većinu dimera takrina i supstituisanih benzena ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa hidrofobnim delom takrinskog fragmenta molekula i udaljenom amino-grupom linkera. Ova jedinjenja imaju izdužene konformacije. Kod heterodimera hinazolinimina (**12c-38c**) ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa hinazoliniminskim prstenom i udaljenom amino-grupom linkera. Kod dimera takrina i ksanomelina, ova varijabla se ne može interpretirati na jednoznačan način, zbog savijenih konformacija molekula. Ona spaja MIF-ove povezane sa protonovanim piridinskim azotom takrina (HBD) i hidrofobnim delovima ksanomelinskog tetrahidropiridinskog prstena, ili hidrofobnom oblasti središnjeg dela linkera. Za neke derivate, ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa hidrofobnim delovima ksanomelinskog tetrahidropiridinskog prstena i sa amino grupom linkera. Varijabla 463 (16,32 - 16,64 Å) opisuje isti farmakoforni obrazac kao i varijabla 455. Varijabla 477 (20,80 - 21,12 Å, Slika 38c) ima nešto manji pozitivan uticaj na model, ali je značajna, zato što pravi razliku između najaktivnijih jedinjenja (dimera takrina i supstituisanih benzena) i ostalih manje aktivnih derivata. Kod nekih derivata, ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa protonovanim piridinskim azotom na takrinskom fragmentu molekula (HBD) i

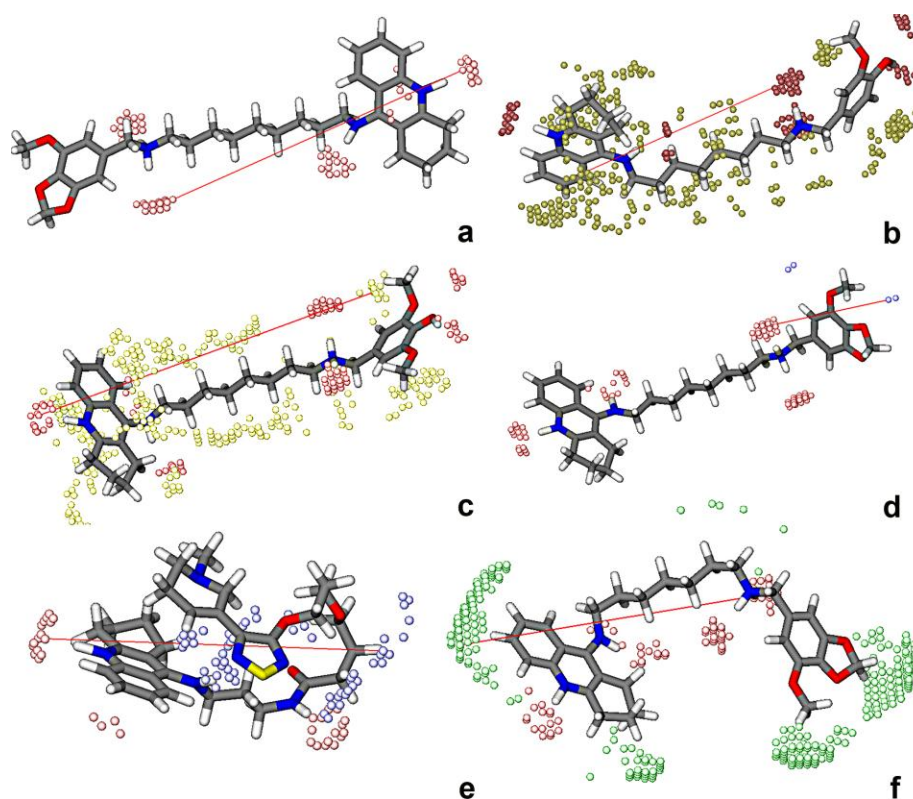
hidrofobnom oblasti benzenovog prstena. U drugom slučaju, varijabla spaja MIF-ove povezane sa hidrofobnim delovima takrinskog prstena i –OH grupom na fenilnom fragmentu molekula. Prema tome, prisustvo hidrofobne grupe i donora vodonične veze na međusobnom prostornom rastojanju od oko 20 Å je farmakoforno svojstvo najaktivnijih molekula.

Varijabla O-N1 745 (7,68 – 8,00 Å, Slika 38d), iako je zbog svoje relativno male dužine izražena kod većine jedinjenja, može da pruži informaciju o farmakofornim svojstvima jedinjenja koja su povoljna za interakciju sa PAS vezivnim mestom AChE. Ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa međusobno udaljenim amino grupama linkera (O) i sa alkoxi-supstituentima (N1) na benzenskom fragmentu molekula, kod heterodimera takrina i benzena. Ukoliko pretpostavimo da takrinski fragment molekula interaguje sa AS (tj. sa Trp 84) a da supstituisani benzenski fragment molekula interaguje sa PAS (tj. Trp 279) ova varijabla može da pruži informaciju o povoljnim strukturnim elementima za vezivanje za PAS. Kod heterodimera takrina i ksanomelina ova varijabla se ne može interpretirati na sličan ili na isti način. Većina ovih derivata u slučaju OMEGA modela je prisutna u savijenim konformacijama, u kojima su dva aromatična fragmenta molekula (takrin i ksanomelin) prostorno blizu. Kod ovih molekula varijabla O-N1 745 povezuje odgovarajuće motive (HBD i HBA) na dva prostorno bliska aromatična fragmenta u konformaciji minimalne energije, koja je upotrebljena za izvođenje modela, ali su verovatno ova dva fragmenta molekula prostorno udaljena u bioaktivnoj konformaciji.

Varijabla O-N1 768 (15,04 – 15,36 Å, Slika 38e) ima najveći pozitivan uticaj na model i spaja MIF-ove povezane sa jednom od alkoxi-grupa benzenskog fragmenta (kod heterodimera takrina i supstituisanih benzena) i proksimalnom amino-grupom linkera, ili MIF-ove povezane sa protonovanim piridinskim azotom takrina i amidnom karbonilnom grupom linkera, kod dimera takrina i ksanomelina. Ista varijabla povezuje MIF-ove koji potiču od azotovog atoma hinazoliniminskog prstena i udaljene amino grupe linkera, kod homodimernih hinazolinimina. Slični strukturni elementi opisani su nešto dužim varijablama unutar ovog bloka. Ova varijabla je prisutna kod jedinjenja sa većom jačinom dejstva.

U O-TIP bloku, varijabla 849 (8,00 – 8,32 Å) pruža informaciju o strukturnim elementima koji su povoljni za interakciju liganada i sa AS i sa PAS vezivnim mestima AChE. Kod heterodimera takrina i ksanomelina ona spaja MIF-ove povezane sa

protonovanim piridinskim azotom takrina (O) i aromatičnim prstenom ksanomelina (TIP). Ovo mogu biti strukturni elementi koji su povoljni za interakcije sa AS AChE. Kod heterodimera takrina i benzena ista varijabla spaja MIF-ove povezane sa amino-grupom linkera (O) i alkoksi grupama benzenovog prstena (TIP). Varijabla O-TIP 875 (16,64 – 16,96 Å, Slika 38f) ima najveći pozitivni uticaj u ovom bloku i opisuje farmakoforna svojstva koja su povoljna za simultano vezivanje za oba vezivna mesta AChE (AS i PAS). Ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa aromatičnim prstenom takrina ili hinazoliniminskom grupom (TIP) i udaljenim amino-grupama linkera (O), kod heterodimera takrina i supstituisanih benzena ili homodimernih hinazolinimina.



**Slika 38.** Najvažnije varijable izvedene iz OMEGA modela, zasnovanog na konformacijama minimalne energije: (a) O-O 158 (16,96-17,92 Å), (b) DRY-O 455 (13,76-14,08 Å), (c) DRY-O 477 (20,80-21,12 Å), (d) 745 O-N1 (7,68-8,00 Å) (e) O-N1 768 (15,04-15,36 Å), (f) O-TIP 875 (16,32-16,64 Å).

### 3.3.2.2. Model zasnovan na ROCS konformacijama

Najvažnije varijable ovog modela su prikazane na Slici 39. Ekspresija varijabli za sva jedinjenja je data u Prilogu 3b.

U O-O bloku, varijabla 128 (Slika 39a) ima najveći negativan uticaj na celokupan model. Ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa dva donora vodonične veze na prostornom rastojanju od 6,40 do 6,72 Å, koji se mogu pripisati različitim strukturnim

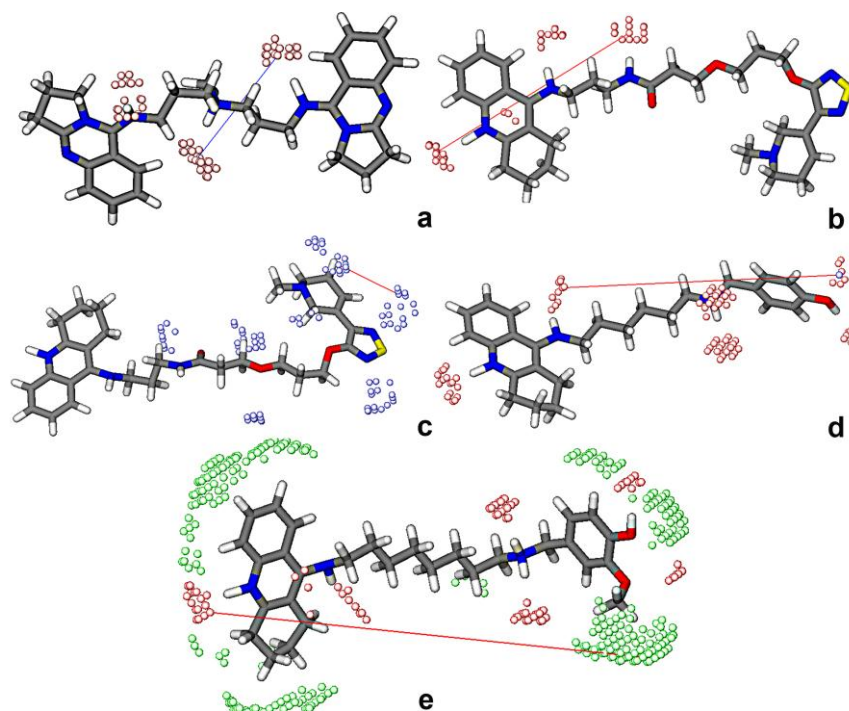
elementima jedinjenja, čak i za molekule koji pripadaju istom podsetu. Za neka jedinjenja, ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa dve amino grupe polimetilenskog linkera, što je farmakoforno svojstvo za koje se smatra da ima povoljan uticaj na jačinu inhibicionog dejstva prema AChE.<sup>302</sup> Varijable O-O 144 (11,52 – 11,84 Å) i 161 (16,96 – 17,28 Å) pružaju isti tip informacija kao i varijable 143, 150, 156 i 158 u OMEGA modelu, iako su rastojanja neznatno različita.

U N1-N1 bloku, varijabla 234 (5,76 – 6,08 Å, Slika 39c) ima najveći pozitivan uticaj u ovom bloku, iako nije prisutna kod najaktivnijih jedinjenja iz seta. Ova varijabla je karakteristična za ROCS model i može da puži informaciju u povoljnim farmakofornim (strukturnim) svojstvima molekula za interakciju sa PAS. Kod dimera takrina i ksanomelina (**81c-96c**) ona spaja MIF-ove povezane sa azotom tiadiazolinskog prstena i MIF-ove povezane sa tetrahidropiridinskim ili amidnim azotom. Kod heterodimera takrina i benzena ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa dve metoksi-grupe na benzenovom prstenu. Stoga, prisustvo dva akceptora vodonične veze na međusobnom prostornom rastojanju od 5,76 do 6,08 Å, predstavlja povoljan strukturni motiv za interakciju liganada sa PAS. Varijable 278 (19,84 – 20,16 Å) i 280 (20,48 – 20,80 Å) su slične varijablama 263-268 u OMEGA modelu.

Varijabla DRY-O 475 (13,76 – 14,08 Å) pruža isti tip informacije kao i varijabla 455 u OMEGA modelu i ima najveći pozitivan uticaj u ovom bloku. Ona opisuje donekle različite strukturne elemente dimera takrina i ksanomelina u odnosu na istu varijablu u OMEGA modelu. Ova jedinjenja u ROCS modelu imaju izdužene konformacije dok su u OMEGA modelu u donekle savijenoj konformaciji. Ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa ksanomelinskim fragmentom molekula (DRY) i sa protonovanim piridinskim azotom takrina ili udaljenom amino grupom linkera (O), zavisno od dužine linkera u molekulu i njegove konformacije. Varijabla DRY-O 496 (20,48 – 20,80 Å) pravi jasnu razliku između najaktivnijih jedinjenja i ostalih, manje aktivnijih jedinjenja u setu, i pruža isti tip informacije kao i varijabla 477 u OMEGA modelu. Varijabla O-N1 805 (15,68 – 16,00 Å, Slika 39d) ima najveći pozitivan uticaj na model i zajedno sa srodnim varijablama (803 i 806) daje isti tip informacija kao i varijabla 768 u OMEGA modelu.

U O-TIP bloku, varijabla 888 (7,68 -8,00 Å) odgovara varijabli 849 u OMEGA modelu i pruža informaciju o povoljnim strukturnim elementima za simultanu interakciju jedinjenja i sa AS i sa PAS mestom AChE. Varijabla O-TIP 930 (21,12 – 21,44 Å) je prisutna samo

kod najaktivnijih jedinjenja u setu i spaja MIF-ove povezane sa protonovanim piridinskim azotom takrina (O) i drugim aromatičnim krajem heterodimera takrina i benzena, i takrina i ksanomelina (TIP).



**Slika 39.** Najvažnije varijable modela zasnovanog na ROCS konformacijama: (a) O-O 128 (6,40-6,72 Å), (b) O-O 147 (12,48-12,80 Å), (c) N1-N1 234 (5,76-6,08 Å), (d) O-N1 805 (15,68-16,00 Å), (e) O-TIP 930 (21,12-21,44 Å).

### 3.3.2.3. Model zasnovan na VINA konformacijama

Najvažnije varijable ovog modela su prikazane na Slici 40, a ekspresija varijabli je data u Prilogu 3c.

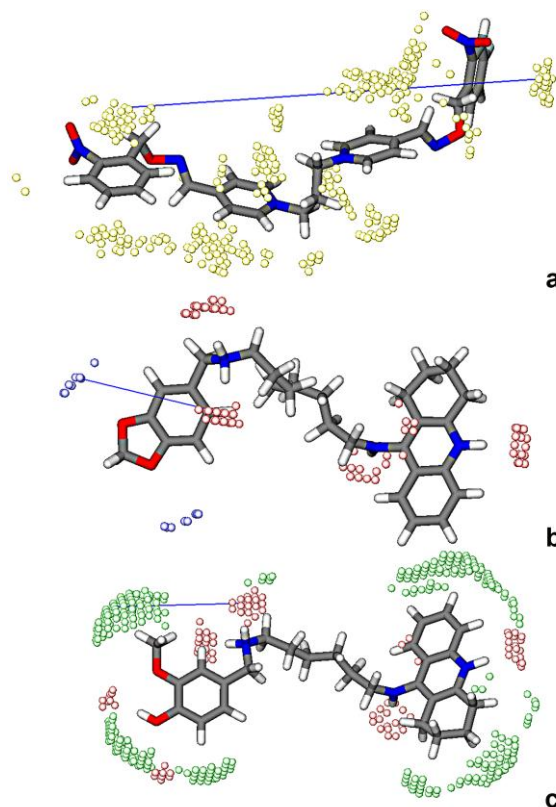
Varijabla DRY-DRY 66 (21,12 – 21,44 Å, Slika 40a) ima umeren negativan uticaj na model i prisutna je samo kod manje aktivnih jedinjenja. Ona spaja MIF-ove povezane sa dve benzil-grupe piridinskih heterodimera (**40c-67c**). Kod dualnih inhibitora AChE, jedan aromatičan fragment molekula interaguje sa AS (Trp 84), linker interaguje sa aminokiselinskim ostacima koji se nalaze negde u sredini šupljine aktivnog mesta, a drugi aromatični fragment interaguje sa PAS (Trp 279). Zavisnost jačine inhibicionog dejstva prema AChE od dužine linkera je dobro dokumentovan u literaturi.<sup>303</sup> Prema tome, ova varijabla pokazuje da velika dužina linkera kod dualnih inhibitora AChE prouzrokuje smanjenje u jačini inhibicionog dejstva. Kada je linker previše dugačak drugi aromatični fragment ne može da se pozicionira tako da ostvari povoljnu interakciju sa aminokiselinskim ostacima koji pripadaju PAS (tj. Trp 279).

Varijabla 123 (8,64 – 8,96 Å) ima visok pozitivan uticaj u O-O bloku. Kod različitih podsetova jedinjenja, ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa različitim strukturnim elementima jedinjenja. Kod dimera takrina i ksanomelina (**81c-96c**) ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa protonovanim piridinskim azotom takrina i proksimalnom amino-grupom linkera. Kod dimera takrina i supstituisanih benzena (**39c, 68c-80c, 97c-110c**) i kod heterodimera hinazolinimina (**12c-32c**) ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa dve amino-grupe linkera. Varijabla O-O 135 (12,48 – 12,80 Å) odgovara varijabli 143 u OMEGA, odnosno varijabli 147 u ROCS modelu, ali ima nizak pozitivan uticaj na model. Varijabla 147 (16,32 – 16,64 Å) kod dimera takrina i supstituisanih benzena spaja MIF-ove povezane sa protonovanim piridinskim azotom na takrinu i udaljenom amino grupom linkera. Ona odgovara varijabli 158 u OMEGA, odnosno varijabli 161 u ROCS modelu.

N1-N1 blok varijabli pruža isti tip informacija kao i kod ostala dva modela; varijabla 241 (16,68 -16,00 Å) odgovara nešto dužim varijablama (>18 Å) u druga dva modela. U DRY-O bloku, varijabla 427 (13,76 – 14,08 Å) pruža isti tip informacija kao i varijable 455 i 475 u OMEGA i ROCS modelima. Isto važi i za varijablu 444 (19,20 – 19,52 Å) koja odgovara varijablama 477 i 496 u OMEGA i ROCS modelima.

U O-N1 bloku, varijable 697 (8,00 – 8,32 Å, Slika 40b) i 698 (8,32 – 8,64 Å) imaju umeren negativan uticaj na model. Ove varijable opisuju iste strukturne i farmakoforne elemente jedinjenja kao i varijabla 745 u OMEGA modelu, u kome ima pozitivan uticaj na model (odn. pozitivno je korelisana sa jačinom dejstva jedinjenja). Ova varijabla spaja MIF-ove povezane sa udaljenom amino-grupom linkera i sa alkoksi-supstituentima na benzenovom prstenu, kod heterodimera takrina i supstituisanih benzena. Ovakav farmakoforni obrazac ima povoljan uticaj na jačinu inhibicionog dejstva u OMEGA modelu, a nepovoljan u VINA modelu, koji je zasnovan na konformacijama dobijenim dokingom. Varijabla O-N1 723 (16,32 – 16,64 Å) ima najveći pozitivan uticaj na model i pruža isti tip informacije kao i varijable 768 i 805 u OMEGA, odnosno ROCS modelu.

Varijabla O-TIP 791 (7,36 – 7,68 Å, Slika 40) opisuje iste strukturne elemente molekula kao i varijable 849 i 888 u OMEGA i ROCS modelu, ali ima veoma nizak pozitivan uticaj na model. Varijabla 832 (20,48 – 20,80 Å) je ista kao i varijabla 930 u ROCS modelu i prisutna je samo kod najaktivnijih derivata u setu.



**Slika 40.** Najvažnije varijable u VINA modelu: (a) DRY-DRY 66 (21,12-21,44 Å), (b) O-N1 697 (7,68-8,00 Å), (c) O-TIP 791 (7,36-7,68 Å).

Najvažnije varijable za sva tri modela, njihova ekspresija i strukturni elementi jedinjenja koji su njima opisani, su prikazani u Tabeli 16. Nezavisno od konformacije molekula koja je upotrebljena za izvođenje modela, sva tri modela imaju dobre statističke parametre i unutrašnju prediktivnost. Komparativna analiza OMEGA, ROCS i VINA modela, prikazana u Tabeli 16, pokazuje da su najvažnije varijable prisutne u sva tri modela. Strukturni elementi i farmkoforna svojstva jedinjenja koja imaju pozitivan uticaj na jačinu inhibicionog dejstva prema AChE su:

- Protonovan piridinski azot (takrinskog fragmenta) i udaljena amino-grupa linkera, ili dve amino-grupe linkera na prostornom rastojanju većem od 14 Å. Ove strukturne elemente opisuju relativno dugačke O-O varijable.
- Protonovani piridinski azot (O) i udaljena hidrofobna oblast (DRY) na molekulima (ksanomelinski ili fenilni fragment) koja interaguje sa PAS AChE. Ovi strukturni elementi su opisani varijablama 477, 496 i 444 u OMEGA, ROCS i VINA modelima.



- Proksimalna amino-grupa linkera (O) i alkoks-supstituenti na benzenovom prstenu ili imino-grupa hinazoliniminskog prstena (N1) opisana varijablama 768, 805 odnosno 723 u OMEGA, ROCS odnosno VINA modelu. Ove varijable imaju najveći pozitivan uticaj kod sva tri modela.
- Protonovani piridinski azot (O) i aromatični deo na suprotnom kraju molekula (TIP) što je opisano varijablama 876, 930 odnosno 832 u OMEGA, ROCS odnosno VINA modelu.

**Tabela 16.** Najvažnije varijable u OMEGA, ROCS i VINA modelima

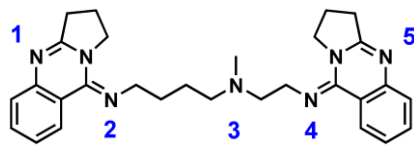
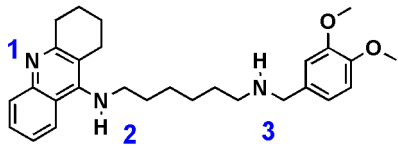
Blok varijabli	OMEGA	ROCS	VINA	Strukturni elementi*	Ekspresija varijabli
<b>DRY-DRY</b>	/	/	66 (31,12-21,44)**	Aromatični prstenovi piridinskih dimera	Samo za jedinjenja sa manjom jačinom dejstva
<b>O-O</b>	/	<b>128 (6,40-6,72)</b>	<b>114 (5,76-6,08)</b>	<b>Različiti</b>	<b>Najveći negativan uticaj. Prisutna kod većine jedinjenja</b>
	147 (14,08-14,40)	144(11,52-11,84)	Nizak uticaj	dNH-Npyr ili pNH-dNH	Samo kod jedinjenja sa najvećom jačinom dejstva
	150-158 (16,96-17,92)	161 (19,96-17,28)	147 (16,32-16,64)	dNH-Npyr ili pNH-dNH	Samo kod jedinjenja sa najvećom jačinom dejstva
<b>N1-N1</b>	/	234 (5,76-6,08)	/	Vezivanje za PAS	Najveći pozitivan uticaj unutar bloka. Kod većine jedinjenja.
	263-268 (18,24-20,16)	278, 280 (19,84-20,80)	241 (15,68-16,00)	Kiseonici oksimskog dela molekula kod piridinskih homodimera	Samo za jedinjenja sa manjom jačinom dejstva
<b>DRY-O</b>	455 (13,76-14,08)	475 (13,76-14,08)	427 (13,76-14,08)	Tac-dNH	Za većinu jedinjenja
	463 (16,32-16,64)	/	435 (16,32-16,64)	Tac-dNH	Za većinu jedinjenja
	477 (20,80-21,12)	496 (20,48-20,80)	444 (19,20-19,52)	Benzen-Npyr	Samo kod jedinjenja sa najvećom jačinom dejstva
<b>O-N1</b>	745 (7,68-8,00) Pozitivan uticaj	/	696-698 (7,68-8,64) Negativan uticaj	dNH-Obenz, kod dimera takrina i benzena	Za većinu jedinjenja
	<b>768 (15,04-15,36)</b>	<b>805 (15,68-16,00)</b>	<b>723 (16,32-16,64)</b>	pNH-Obenz	<b>Najveći pozitivan uticaj. Prisutna kod većine jedinjenja</b>
<b>O-TIP</b>	849 (8,00-8,32) Pozitivan uticaj	888 (7,68-8,00) Pozitivan uticaj	791 (7,36-7,68) Nizak negativan uticaj	Npyr-tac – dNH-Obenz	Za većinu jedinjenja
	876 (16,64-16,96)	/	/	dNH-tac	Za većinu jedinjenja
	/	930 (21,12-21,44)	832 (20,48-20,80)	Npyr-krajnji fragment	Samo kod jedinjenja sa najvećom jačinom dejstva

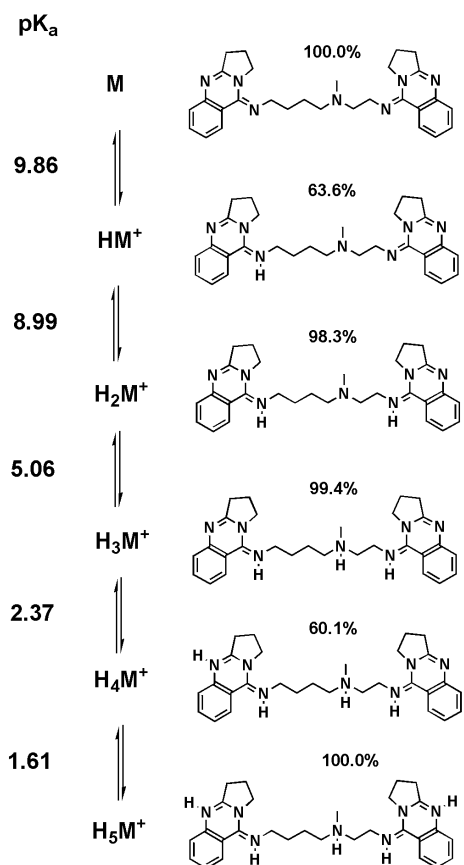
\*Objašnjenja: tac – takrinski fragment; dNH-distalna amino-grupa linkera, u odnosu na takrin; pNH-proksimalna amino-grupa linkera, u odnosu na takrin, Npyr-piridinski azot, Obenz-alkoksi supstituenti na benzenovom prstenu. \*\* Rastojanja u zagradi su data u angstromima.

Sve opisane varijable i njima pridruženi strukturni elementi jedinjenja, ukazuju na važnost prisustva protonovanog piridinskog azota u molekulima za inhibiciono dejstvo

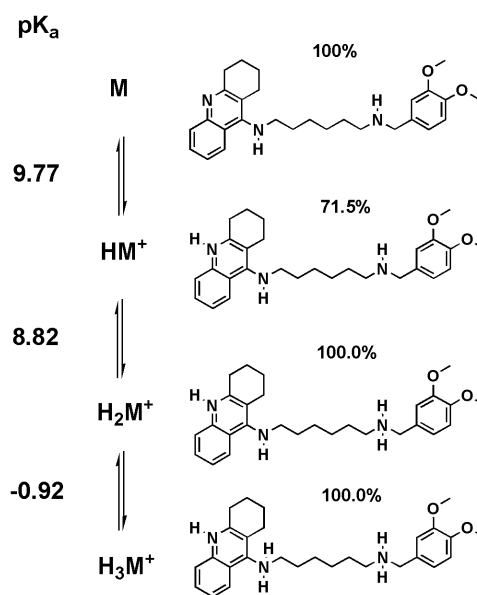
prema AChE. Kristalne strukture AChE sa takrinom kao ligandom ili njegovim homodimerima pokazale su da protonovani piridinski azot formira vodoničnu vezu sa karbonilnom peptidnom grupom His 440, koji pripada katalitičkoj trijadi enzima.<sup>304</sup> Heterodimeri hinazolinimina (**12c–32c**) imaju povoljne strukturne elemente za veliku jačinu inhibicionog dejstva prema AChE, slične onima koji se mogu naći kod heterodimernih takrinskih inhibitora. Na ovo ukazuje prisustvo veoma intenzivnih DRY-O i O-TIP (455 i 875, OMEGA model) varijabli kod oba podseta inhibitora. Međutim, heterociklični azot heterodimera hinazolinimina ima nižu  $pK_a$  vrednost u odnosu na piridinski azot takrinskih inhibitora i stoga nije protonovan na pH 8,00 (pH vrednost na kojoj se izvodi enzimski test). Stoga varijable koje su takođe važne za inhibicionu aktivnost prema AChE, O-O 158 i DRY-O 477, koje povezuju MIF-ove koji potiču od protonovanog piridinskog azota takrinskog fragmenta sa drugim strukturnim elementima inhibitora, nisu prisutne kod heterodimera hinazolinimina. Zbog važnosti ovog zapažanja za interpretaciju modela, mikrostanja protonovanja su procenjena nezavisnim softverom (ADMET Predictor, Simulations Plus, Inc)<sup>305</sup> za dva reprezentativna jedinjenja koja pripadaju heterodimernim hinazoliniminima (jedinjenje **16c**) i dimerima takrina i supstituisanih benzena (jedinjenje **107c**). Predominantna mikrostanja na pH 8,00 su prikazana u Tabeli 15, i na Shemama 54 i 55. Dobijeni rezultati su saglasni stanjima protonovanja koja su određena u programu Pentacle i pokazuju da je piridinski azot jedinjenja **107c** protonovan, a da heterociklični azot jedinjenja **16c** nije protonovan na pH 8,00. Prema tome, nemogućnost protonovanja heterocikličnog azota na pH 8,00, kod heterodimernih hinazolinimina se može smatrati osnovnim razlogom za nižu jačinu inhibicionog dejstva ovog podseta jedinjenja u odnosu na dualne inhibitore koji sadrže takrin.

**Tabela 17.** Prosečna stanja protonovanja izračunata za jedinjenja **16c** i **107c**, na pH 8.02, procenjena programom ADMET Predictor.

			
<b>1</b> N (prsten)	0.0000	<b>1</b> N (ar)	0.9580
<b>2</b> =N-	0.9635	<b>2</b> -NH-	0.0000
<b>3</b> >N-	0.0180	<b>3</b> -NH-	0.9005
<b>4</b> =N-	0.9202		
<b>5</b> N (prsten)	0.0000		



Shema 54. Predominantna mikrostanja za jedinjenje **16c** u širokom opsegu pH vrednosti, procenjena programom ADMET Predictor.



Shema 55. Predominantna mikrostanja za jedinjenje **107c** u širokom opsegu pH vrednosti, procenjena programom ADMET Predictor.

Strukturni motiv jedinjenja koji ima najveći nepovoljan uticaj na inhibicionu aktivnost prema AChE, kod sva tri izvedena modela, jeste prisustvo dva akceptora vodonične veze na međusobnom prostornom rastojanju većem od 18 Å. U ove strukturne elemente spadaju dva kiseonika oksimskog fragmenta homodimernih piridinskih inhibitora (**40c-67c**) i dva neprotonovana heterociklična azota kod homodimernih hinazolinimina (**12c-32c**).

Najveće razlike između OMEGA, ROCS i VINA modela mogu se naći za relativno kratke varijable (< 8,00 Å). Pokušali smo da identifikujemo kratke varijable, koje bi opisivale strukturne elemente koji su povoljni za interakciju sa AS ili sa PAS AChE. Ovakve varijable su identifikovane u tri bloka: N1-N1, O-N1 i O-TIP, ali one nisu prisutne u svim modelima, ili nemaju isti uticaj (pozitivan ili negativan) na model. Takođe su izvedeni parcijalni modeli za dimere takrina i supstituisanih benzena (**68c-110c**), u nameri da se identifikuju varijable koje opisuju povoljne strukturne elemente za interakciju sa PAS. Iako su dobijeni statistički relevantni modeli, kratke varijable su imale niže intenzitete nego odgovarajuće varijable kod prvobitno dobijenih OMEGA, ROCS i VINA modela. Osim toga, kraće varijable je teško interpretirati na jednoznačan način, budući da su one opisivale različite strukturne elemente jedinjenja, čak i unutar istog podseta inhibitora. Ovo se naročito može zapaziti u N1-N1 bloku varijabli za sva tri modela. Kratke varijable imaju visok pozitivan uticaj u sva tri modela, ali se ne može doneti opšti zaključak o tome koji su strukturni elementi jedinjenja opisani ovim varijablama. U nekim slučajevima, kratke varijable imaju različiti uticaj (pozitivan ili negativan) i različiti intenzitet (visok ili nizak) u različitim modelima, pa su uopšteno govoreći manje interpretabilne u opisu odnosa strukture i aktivnosti za ispitani set (**1c-110c**) inhibitora.

Još jedna razlika koja je zapažena između OMEGA, ROCS i VINA modela je različiti doprinos DRY-DRY varijabli. Kod OMEGA modela relativno kratke varijable su negativno korelisane sa jačinom dejstva derivata, dok je kod VINA modela zapažena obrnuta situacija. Kod ROCS modela su sve DRY-DRY varijable pozitivno korelisane sa aktivnošću.

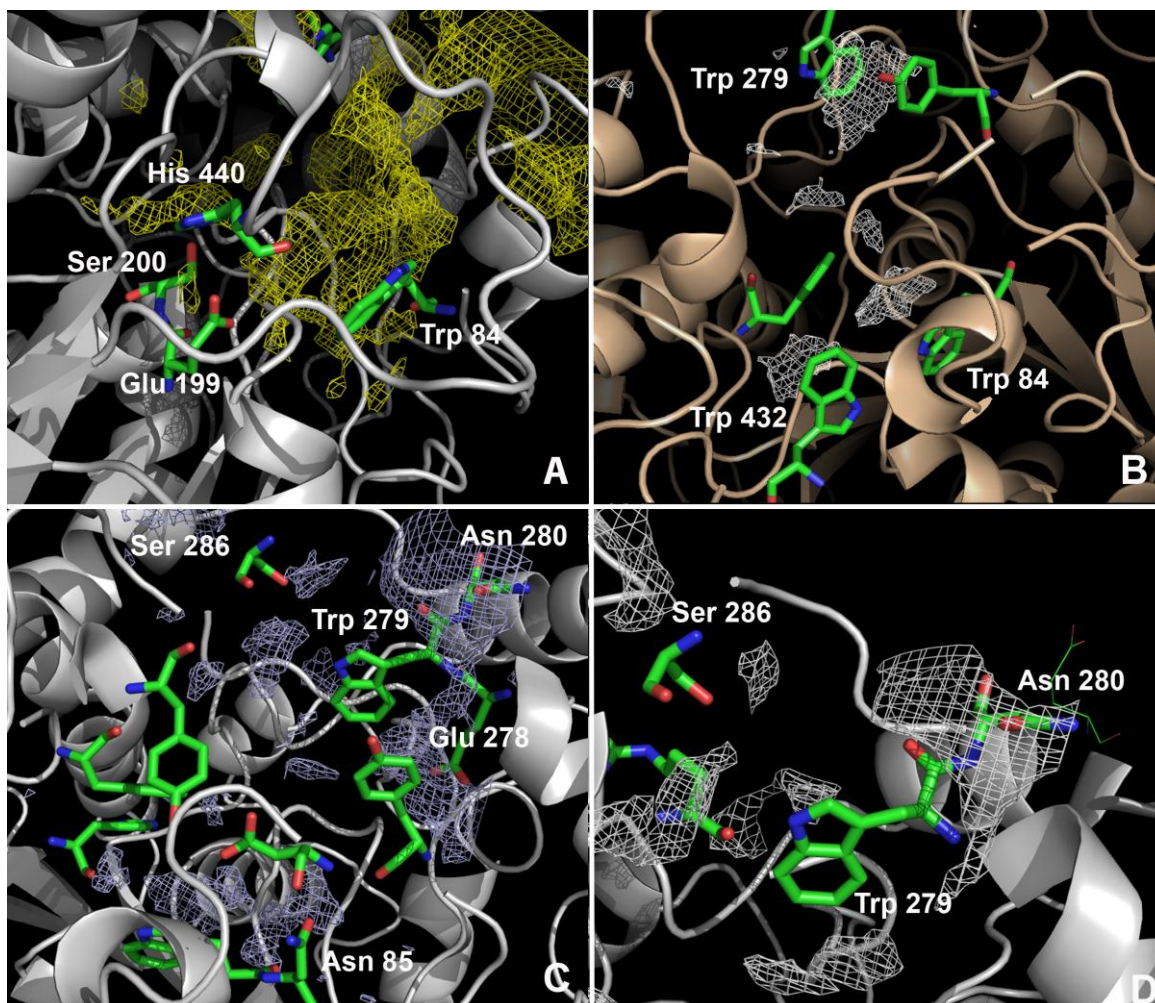
### 3.3.3. Polja molekularskih interakcija aktivnog mesta AChE

Polja molekularskih interakcija su izračunata za aktivno mesto AChE, koristeći GRID probe koje odgovaraju (opisuju) važnim strukturnim motivima inhibitora iz seta. To su: N1= proba koja odgovara protonovanom piridinskom azotu, N1: proba, koja odgovara

amino grupi linkera i DRY (hidrofobna) proba. Ovi strukturni motivi su prisutni kod većine inhibitora u setu (**1c-110c**). Korišćena je i OC1 proba koja opisuje alkoksi supstituente prisutne kod heterodimera takrina i supstituisanih benzena (**68c-79c** i **97c-110c**). Polja koja su dobijena izračunavanjem sa N1= probom su predstavljena na Slici 41a, na izokonturnom nivou energije od  $-8,0$  kcal/mol. Važni minimumi polja mogu se naći blizu karbonilne grupe His 440, hidroksilne grupe bočnog ostatka Ser 203 i karboksilne grupe Glu 199. Prva dva aminokiselinska ostatka pripadaju katalitičkoj trijadi enzima, a Glu199 je takođe važan za katalizu hidrolize ACh, pošto stabilizuje prelazno stanje tokom acilovanja Ser 200, elektrostatičkom interakcijom sa imidazolovim prstenom His 440. Ovi rezultati su saglasni sa pretpostavkom da protonovani piridinski azot takrina formira vodoničnu vezu sa peptidnom karbonilnom grupom His 440. Prosečno rastojanje između peptidnog karbonilnog kiseonika His 440 i centroida na indolovom prstenu Trp 279 kreće se od  $16,50$  Å do  $17,50$  Å u različitim kristalnim strukturama AChE.<sup>302</sup> Ovo rastojanje odgovara DRY-O varijablama 437-439, kod OMEGA, ROCS i VINA modela, koje su prisutne kod jedinjenja u setu koja imaju najveću jačinu dejstva i spajaju MIF-ove povezane sa protonovanim piridinskim azotom na takrinu i udaljene, aromatične hidrofobne grupe jedinjenja (**68c-110c**). DRY polja su predstavljena na Slici 41b, na izokonturnom nivou energije od  $-2,0$  kcal/mol. Tri važna minimuma su locirana između Trp 279 i Tyr 70 (PAS) i između Trp 84 i Phe 330 (AS). Treći minimum je lociran blizu Trp 432. Položaj minimuma DRY polja je u skladu sa dobro poznatima eksperimentalnim rezultatima (kristalnim strukturama) dobijenim za mesto i način vezivanja dualnih inhibitora unutar šupljine aktivnog mesta AChE.

Minimumi polja za N1: probu se nalaze blizu hidroksilne grupe Ser 286, na ivici ulaza u šupljinu aktivnog mesta, na suprotnoj strani od aminokiselinskih ostataka koji pripadaju PAS. Relativno veliki minimum za istu probu se nalazi i blizu peptidne karbonilne grupe Trp 279, bočnog ostatka Asn 280 i karboksilatnog anjona bočnog ostatka Glu 278. U AS vezivnom mestu, minimumi N1: probe se nalaze blizu peptidnih karbonilnih grupa Trp 84 i Asn 85. Ova polja za N1: probu su prikazana na Slici 41c, na izokonturnom nivou od energije  $-8,0$  kcal/mol. Minimumi polja za OC1 probu se nalaze blizu peptidne karbonilne grupe Trp 279, bočnog ostatka Asn 280 i blizu hidroksilne grupe Ser 286 (Slika 41d). Detaljnijim uvidom u doking poze dobijene za derivate **68c-80c** i **97c-110c** zapaženo je da se amino grupe linkera i alkoksi grupe na benzenovom prstenu ne nalaze blizu minimuma polja dobijenih za N1: i OC1 probu. U ovom slučaju izračunata polja molekulskih

interakcija ne mogu se dovesti u vezu sa mogućim položajima inhibitora u aktivnom mestu AChE dobijenim doking izračunavanjima.



Slika 41. MIF-ovi izračunati za aktivno mesto AChE: A. N1= proba, B. DRY proba, C. N1: proba, D. OC1 proba.

### 3.3.4. Prediktivnost modela

Unutrašnja prediktivnost modela je testirana metodama unakrsne validacije (LOO, LTO i RG, Tabela 14). Međutim, koeficijent unutrašnje prediktivnosti,  $q^2$  je prema nekim autorima neophodan, ali ne i dovoljan statistički parametar koji opisuje prediktivnost modela.<sup>306</sup> Iz ovih razloga, originalni set inhibitora (**1c-110c**) je nasumično podeljen na osnovni set (set za izvođenje modela koji sadrži 78 jedinjenja, u daljem tekstu „redukovani osnovni set“) i test set 1 (32 jedinjenja, u daljem tekstu „test set 1“) da bi se odredio prediktivni koeficijent korelacije,  $r^2_{pred}$ . Jedinjenja koja pripadaju test setu 1 su označena zvezdicom (\*) u Tabeli 12. Modeli su izvedeni i prediktivnost je izračunata za sva tri tipa konformacija jedinjenja (OMEGA, ROCS i VINA). Statistički parametri PLS modela

izvedenih iz redukovanog osnovnog seta nisu se razlikovali značajno od parametara modela koji su izvedeni za originalni set od 110 jedinjenja. Takođe, ovi modeli imaju sve važne varijable kao i prethodno izvedeni modeli. Prediktivni koeficijenti korelacije  $r^2_{pred}$  i standardne greške predviđanja (SDEP) za test set 1 su prikazani u Tabeli 18. Eksperimentalne i predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti su prikazane u Tabeli 19 i na Slici 42. Kao i kod modela izvedenog za originalan set jedinjenja, model zasnovan na ROCS konformacijama za redukovani osnovni set imao je najbolju prediktivnost, u poređenju sa druga dva modela (OMEGA i VINA) sa  $r^2_{pred} = 0,834$  (za 3LV). Kod test seta 1, za sva tri tipa konformacija, predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti za većinu jedinjenja su odstupale za manje od jedne logaritamske jedinice od eksperimentalno određenih vrednosti. U OMEGA test setu 1, predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti su samo za neka jedinjenja značajno odstupale od eksperimentalnih. To su jedinjenja **15c** i **107c** (značajno niže izračunate pIC<sub>50</sub>) i **65c** i **84c** (značajno više izračunate pIC<sub>50</sub>). Jedinjenja **15c** i **107c** su prisutna u savijenim konformacijama pa za njih nisu bile prisutne važne, relativno dugačke, varijable velikog intenziteta (O-O 158, DRY-O 477 i O-N1 768). Ovo se može smatrati osnovnim razlogom za lošu prediktivnost jačine dejstva ovih jedinjenja. U test setu 1, zasnovanom na ROCS konformacijama jedinjenja (koja se nalaze u izduženim konformacijama) prediktivnost za jačinu dejstva ovih derivata je zadovoljavajuća. Jačina inhibicionog dejstva jedinjenja **65c**, nije dobro predviđena ni u jednom test setu 1 i za sada nemamo objašnjenje za to. Zapaženo je da postoje veće razlike između  $r^2_{pred}$  vrednosti dobijenih za OMEGA, ROCS i VINA konformacije jedinjenja (0,752, 0,834 i 0,679) u odnosu na razlike između vrednosti za  $q^2$  (RG), izvedene za originalni set jedinjenja (0,64, 0,75 i 0,65). Prema tome  $r^2_{pred}$  vrednosti su osetljivije na tip konformacija koji se koristi za izvođenje modela i test prediktivnosti.

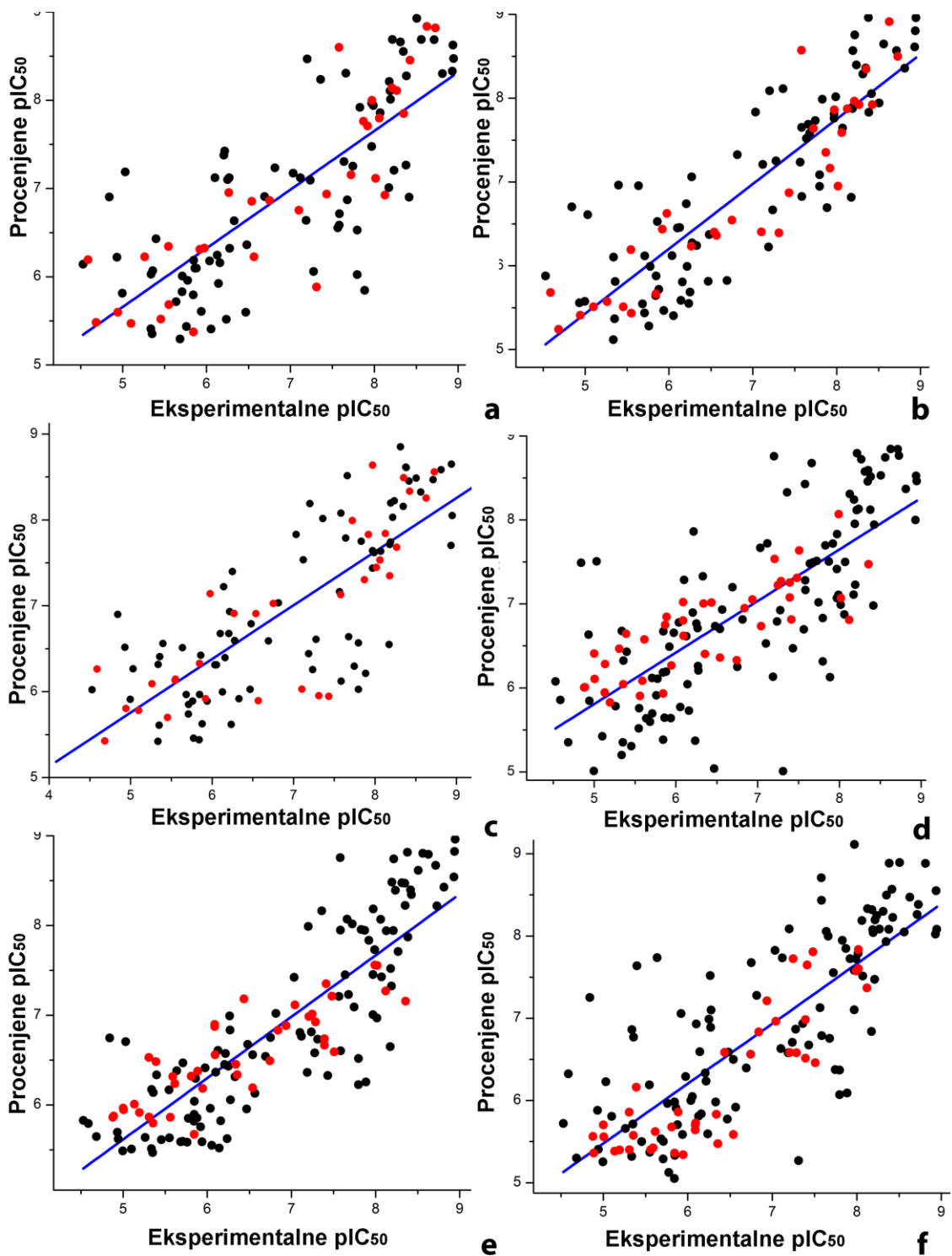
**Tabela 18.** Prediktivna sposobnost modela (izražena kroz  $r^2_{pred}$  vrednosti) za test set 1 (OMEGA, ROCS i VINA konformacije) i test set 2 (OMEGA, ROCS i VINA konformacije) za različite dimenzionalnosti modela (broj LV). Najbolje vrednosti za  $r^2_{pred}$  i SDEP su prikazane masnim slovima.

		1 LV		2LV		3LV		4LV		5LV	
		$r^2$	SDEP	$r^2$	SDEP	$r^2$	SDEP	$r^2$	SDEP	$r^2$	SDEP
Test set 1	OMEGA	0,750	0,641	0,725	0,672	<b>0,752</b>	<b>0,638</b>	0,622	0,788	0,609	0,801
	ROCS	0,702	0,699	0,777	0,605	<b>0,834</b>	<b>0,522</b>	0,793	0,582	0,795	0,580
	VINA	0,627	0,782	<b>0,679</b>	<b>0,725</b>	0,657	0,750	0,619	0,790	0,515	0,892
Test set 2	OMEGA	0,360	0,803	0,397	0,779	0,423	0,762	0,314	0,814	<b>0,469</b>	<b>0,731</b>
	ROCS	0,452	0,739	<b>0,581</b>	<b>0,647</b>	0,460	0,734	0,482	0,719	0,533	0,683
	VINA	0,556	0,655	0,670	0,565	0,672	0,563	<b>0,740</b>	<b>0,501</b>	0,712	0,528

**Tabela 19.** Eksperimentalno određene i predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti za test set 1.

R. br. Jed.	Eksperimentalne pIC <sub>50</sub>	Predviđene pIC <sub>50</sub>		
		OMEGA	ROCS	VINA
1c	5.921	6.310	6.436	5.918
2c	6.567	6.225	6.362	5.893
7c	7.432	6.935	6.870	5.945
12c	6.267	6.954	6.234	6.911
15c	7.310	5.884	6.391	5.951
19c	6.752	6.864	6.545	7.027
21c	6.539	6.854	6.403	6.908
26c	5.976	6.323	6.623	7.140
29c	7.102	6.753	6.405	6.028
33c	5.547	6.344	6.191	6.131
40c	5.455	5.520	5.509	5.699
42c	5.846	5.374	5.663	6.328
46c	5.551	5.683	5.435	6.144
48c	4.684	5.482	5.242	5.425
49c	4.943	5.598	5.408	5.803
58c	5.099	5.471	5.509	5.780
65c	4.588	6.192	5.680	6.263
67c	5.262	6.225	5.573	6.091
71c	7.971	7.999	7.862	8.636
72c	8.728	8.818	8.499	8.558
75c	8.426	8.452	7.923	8.333
80c	8.016	7.114	6.951	7.446
84c	7.580	8.598	8.572	7.128
86c	7.870	7.761	7.353	7.302
89c	7.920	7.706	7.166	7.831
92c	8.060	7.797	7.591	7.532
96c	8.210	8.138	7.966	7.349
98c	7.722	7.155	7.639	7.991
100c	8.352	7.849	8.347	8.491
103c	8.267	8.108	7.923	7.681
105c	8.627	8.836	8.914	8.255
107c	8.127	6.925	7.874	7.842



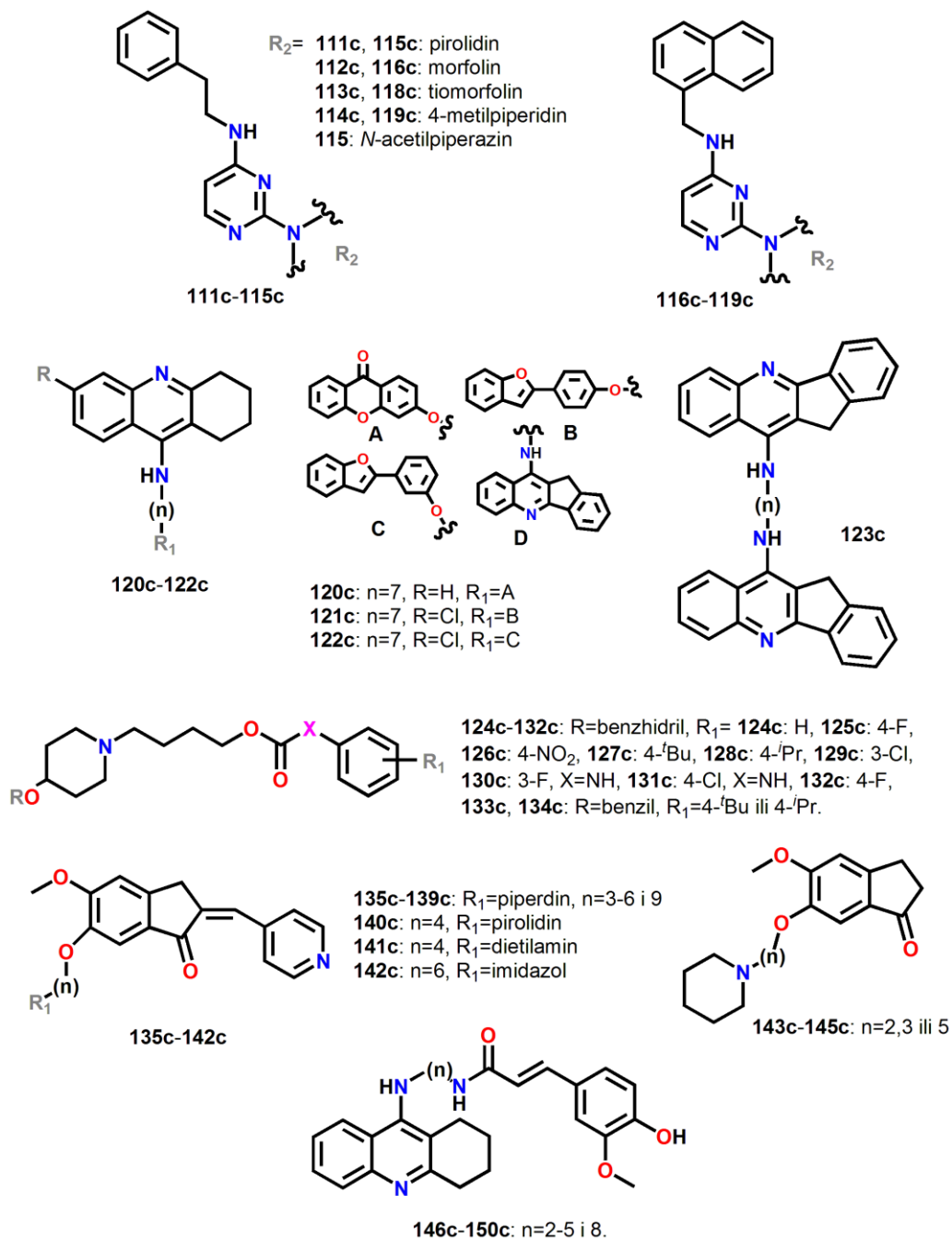


**Slika 42.** Eksperimentalne i predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti za test set 1 (a) OMEGA konformacije, (b) ROCS konformacije, (c) VINA konformacije; i test set 2 (d) OMEGA konformacije, (e) ROCS konformacije, (f) VINA konformacije.

Podela seta jedinjenja na osnovni i test set obično daje zadovoljavajuće statističke parametre prediktivnosti, budući da su jedinjenja u test setu obično kongeneri ili strukturno veoma slična jedinjenjima u osnovnom setu. Dalje smo ispitali da li se izvedeni modeli

mogu koristiti za predviđanje jačine dejstva strukturno različitih jedinjenja i jedinjenja čija je aktivnost određivana na enzimu iz različitog izvora (humana AChE). Slično ispitivanje sproveli su Bernard i saradnici.<sup>307</sup> Osnovni set inhibitora AChE sastojao se iz 82 *N*-benzilpiperidinska derivata, čija je aktivnost određena na mišijoj AChE, a test set se sastojao iz 29 *N*-benzilpiperidina čija je aktivnost određena na humanoj AChE. Model je pokazivao dobru prediktivnost, pokazujući da je moguće da se predvidi jačina dejstva jedinjenja koja su testirana na enzimu iz različitog izvora i u donekle različitim eksperimentalnim uslovima (pH, temperatura).

Za test set 2, izabrano je 40 jedinjenja: 2,4-disupstituisani pirimidini (**111c-119c**, strukturno različiti i testirani na *Hu*AChE), heterodimerni derivati takrina (**121c-123c**, strukturno slični, ali testirani na *Hu*AChE), derivati piperidina (**124c-134c**, strukturno različiti i testirani na *Ee*AChE), derivati indanona (**135c-145c**, strukturno različiti i testirani na *Ee*AChE) i heterodimeri takrina i ferulinske kiseline (**145c-150c**, strukturno slični i testirani na *Ee*AChE). Strukture ovih jedinjenja su prikazane na Shemi 56. Za predikciju su korišćeni originalni modeli (OMEGA; ROCS i VINA) izvedeni za 110 inhibitora AChE. Statistički parametri prediktivnosti ( $r^2_{pred}$  i SDEP) su prikazani u Tabeli 18 (poslednja tri reda) a izračunate i predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti su prikazane u Tabeli 20 i na Slici 42. Iz Tabele 18 se vidi da je  $r^2_{pred}$  jako osetljiva na tip konformacija koji se koristi za izvođenje modela i test prediktivnosti. Ova vrednost varira od nezadovoljavajuće, 0,469 (OMEGA model) do zadovoljavajuće prediktivnosti (0,740) za VINA model. Jačina dejstva za neke od 2,4-disupstituisanih pirimidina je loše predviđena u OMEGA i ROCS test setu 2. Ovi molekuli su značajno manji od molekula u originalnom osnovnom setu iz koga su izvedeni modeli. Verovatno je da se ova jedinjenja ne vezuju simultano za oba vezivna mesta AChE (AS i PAS) i stoga je značajno manji broj hidrofobnih kontakta između ovih inhibitora i aminokiselinskih ostataka u aktivnom mestu AChE. Međutim, individualni doprinosi velikog broja kratkih varijabli koja postoje za ova jedinjenja daju doprinos precenjenim pIC<sub>50</sub> vrednostima. Predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti za jedinjenja **148c** (OMEGA test set 2) i **149c** (ROCS test set 2) takođe značajno odstupaju od eksperimentalnih, iako su ova jedinjenja strukturno slična heterodimerima takrina i benzenu (**68c-79c** i **97c-110c**) i testirana na *Ee*AChE, bez potrebe za renormalizacijom IC<sub>50</sub> vrednosti. Konformacije korišćene za ova jedinjenja su bile savijene, pa relativno dugačke varijable visokog intenziteta ne postoje za ova jedinjenja. Zbog toga su predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti nešto niže u odnosu na eksperimentalne.



Shema 56. Strukture jedinjenja 111c-140c iz test seta 2

**Tabela 20.** Eksperimentalno određene i predviđene pIC<sub>50</sub> Vrednosti za test set 2.

R. br. Jed.	Eksperimentalne pIC <sub>50</sub>	Predviđene pIC <sub>50</sub>		
		OMEGA	ROCS	VINA
111c	5.130	5.945	5.863	5.401
112c	5.006	6.106	5.946	5.558
113c	4.879	6.005	5.862	5.564
114c	5.356	6.044	5.797	5.577
115c	5.002	6.409	5.964	5.703
116c	5.561	5.903	5.861	5.401
117c	5.134	6.284	6.007	5.383
118c	5.194	5.828	5.915	5.399
120c	4.889	6.006	5.876	5.361
120c	7.247	7.224	7.012	7.722
121c	7.208	7.536	6.985	6.583
122c	7.287	7.272	6.926	6.580
123c	7.041	6.736	7.114	6.963
124c	6.356	6.404	6.337	5.474
125c	6.538	6.361	6.191	5.586
126c	5.616	6.578	6.236	5.623
127c	6.095	6.621	6.559	5.727
128c	5.886	6.846	6.377	5.859
129c	5.947	6.267	6.184	5.340
130c	5.590	6.085	6.315	5.423
131c	6.088	6.803	6.896	5.642
132c	6.088	7.021	6.874	5.704
133c	5.390	6.644	6.482	6.162
134c	5.307	6.467	6.529	5.858
135c	7.509	7.637	6.592	6.459
136c	7.392	7.077	6.666	6.984
137c	6.841	6.949	6.831	6.833
138c	6.935	7.052	6.884	7.212
139c	6.435	7.017	7.181	6.584
140c	7.392	7.255	6.736	6.513
141c	7.991	8.069	7.560	7.575
142c	5.845	5.932	5.673	5.361
143c	5.870	6.749	6.321	5.677
144c	6.339	7.004	6.452	5.831
145c	6.745	6.329	6.492	6.563
146c	7.413	6.815	7.212	7.648
147c	7.481	7.309	7.351	7.807
148c	8.119	6.810	7.157	7.368
149c	8.356	7.472	7.270	7.835
150c	8.018	7.070	7.554	7.601

Za piperidinske derivate **133c** i **134c**, OMEGA i ROCS modeli su dali nešto više predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti, ali je jačina dejstva ovih derivata dobro predviđena VINA modelom. Jedino jedinjenje čija jačina dejstva nije dobro predviđena u VINA modelu je jedinjenje **135c**, međutim jačina dejstva ovog derivata je dobro procenjena u druga dva modela.

Oba metoda (podela na osnovni i test set jedinjenja i upotreba pravog eksternog seta strukturno različitih jedinjenja) za procenu prediktivnosti modela, dala je dobre statističke parametre prediktivnosti, izražene sa  $r^2_{pred}$  koja iznosi 0,834 za ROCS test set 1 i 0,740 za VINA test set 2; uzimajući u obzir relativno veliki strukturni diverzitet jedinjenja u osnovnim i test setovima. VINA model je veoma prediktivan za jedinjenja koja pripadaju test setu 2, i veoma se razlikuju u strukturi od jedinjenja u osnovnom setu i testirana su na AChE iz različitog izvora. Prediktivnost originalnog modela, izvedenog iz 110 jedinjenja ne zavisi od konformacija jedinjenja, što se vidi po sličnim vrednostima  $q^2$  za OMEGA, ROCS i VINA modele, dok je prediktivnost test seta 2 veoma zavisi od konformacija koje su korišćene u osnovnom i test setu, što se ogleda u velikoj razlici između  $r^2_{pred}$  za OMEGA, ROCS i VINA modele. Jačina dejstva jedinjenja u test setu 2, je najbolje predviđena VINA modelom, što ukazuje na važnost korišćenja konformacija jedinjenja koje su izvedene uzimajući u obzir geometrijska ograničenja aktivnog mesta AChE.

### 3.3.5. Model zasnovan na dvodimenzionalnim (2D) molekulskim deskriptorima

Obzirom na činjenicu da sva tri izvedena modela (OMEGA, ROCS i VINA) pružaju isti tip informacije o odnosu između strukture i aktivnosti dualnih reverzibilnih inhibitora AChE (iako je prediktivnost modela zavisila od konformacija jedinjenja koje su korišćene) izvedeni su modeli na osnovu deskriptora zasnovanih na dvodimenzionalnoj strukturi jedinjenja (tzv. 2D deskriptori). Korišćenjem E-Dragon programa<sup>308</sup> su izračunati sledeći 2D deskriptori<sup>309</sup>: konstitucioni, broj funkcionalnih grupa, topološki, geometrijski, fragmenti centrirani na atomima, i molekulske osobine. Pažljivo su razmotrene vrednosti svih deskriptora, i oni deskriptori čije numeričke vrednosti nisu značajno varirale za različita jedinjenja nisu uzeti u obzir prilikom izvođenja modela. Ostali deskriptori i brojčane vrednosti aktivnosti jedinjenja unete su u program BILIN,<sup>310</sup> i urađeno je sistematsko pretraživanje korelacija koje uključuju do četiri varijable. Model koji je imao najbolju statistiku za set od 110 inhibitora je prikazan u jednačini 1. Model koji je izveden sa istim deskriptorima ali za set od 150 jedinjenja (osnovni i test set 2) je takođe statistički validan, ali sa nešto lošijim statističkim parametrima (jednačina 2). Brojčane vrednosti deskriptora za sva jedinjenja, zajedno sa predviđenim  $IC_{50}$  vrednostima su prikazane u Prilogu 3d.

$$pIC_{50} = 0,716(\pm 0,15) nR10 + 1,113(\pm 0,25) N-070 + 5,446(\pm 0,24) \quad \text{Jed. 1.}$$

$$(n=110; r=0,827; s=0,697; F=115,710; Q^2=0,656; s_{PRESS}=0,728)$$

$$pIC_{50} = 0,653(\pm 0,16) nR10 + 0,645(\pm 0,27) N-070 + 5,736(\pm 0,22) \quad \text{Jed. 2.}$$

$$(n=150; r=0,700; s=0,862; F=70,598; Q^2=0,465; \epsilon=0,883)$$

U jednačinama  $n$  predstavlja broj objekata,  $r$  koeficijent korelacije,  $s$  standardnu devijaciju,  $F$  Fišerov F test,  $Q^2$  LOO koeficijent prediktivnosti dobijen unakrsnom validacijom sa izostavljanjem po jednog objekta iz seta,  $s_{PRESS}$  je standardna devijacija unakrsne validacije.

Oba deskriptora u obe jednačine imaju pozitivan predznak, pa je jačina dejstva derivata korelisana sa povećanjem broja fragmenata opisanih nR10 deskriptorom (broj desetočlanih prstenova u molekulu) i N-070 deskriptorom (broj Ar-NH-Al fragmenata). Podsetovi jedinjenja koji imaju veliku jačinu dejstva zaista sadrže oba tipa fragmenata (to su heterodimeri takrina i supstituisanih benzena i takrina i ksanomelina) ali su oba ova fragmenta vezana za takrinski deo molekula. Homodimeri hinazolinimina i heterodimeri hinazolinimina i lipočne kiseline sadrže samo molekulski fragment opisan nR10 deskriptorom, ali ova jedinjenja ne sadrže N-070 fragment, zbog prisustva dvostruke veze između centralnog prstena hinazoliniminskog fragmenta i azota iz linkera. Uprkos zadovoljavajućim statističkim parametrima modela, predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti pokazuju da 2D QSAR modeli klasifikuju jedinjenja prema strukturnim klasama kojim jedinjenja pripadaju, ali ne predviđaju dobro jačinu dejstva jedinjenja unutar iste klase.

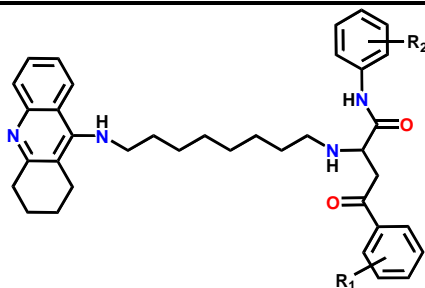
### 3.3.6. Previđanje antiholinesterazne aktivnosti dualnih inhibitora AChE izvedenih iz takrina i amida aroilakrilnih kiselina i eksperimentalna validacija

U protekloj deceniji je sintetizovano nešto više od stotinu različitih homo- i heterodimernih takrinskih analoga koji se međusobno razlikuju u: dužini linkera i prisustvu funkcionalnih grupa na njemu, prisustvu različitih supstituenata na tetrahidroakridinskom jezgru, veličini alicikličnog prstena i prisustvu heteroatoma (najčešće azota) na položaju 5. Na osnovu literaturnih podataka, kao i informacija dobijenih detaljnom analizom najvažnijih varijabli prethodno izvedenih modela za dualne reverzibilne inhibitore AChE, zaključili smo da heterodimerni inhibitori AChE, zasnovani na strukturi takrina i amida aroilakrilnih kiselina, trebaju da sadrže takrinski fragment sa šestočlanim alicikličnim prstenom, koji prema literaturnim podacima pokazuje najveću jačinu inhibicionog dejstva prema AChE. Optimalna dužina linkera trebalo bi da iznosi oko osam metilenskih jedinica. Dužina linkera je procenjena na osnovu dužine varijabli u izvedenim modelima koje spajaju krajnje aromatične fragmente dualnih inhibitora **1c-110c**. Zbog relativno širokog ulaza u

šupljinu aktivnog mesta AChE i zastupljenosti aromatičnih aminokiselinskih ostataka u ovoj oblasti enzima, procenjeno je da će fenilamidi aroilakrilnih kiselina, pre nego same aroilakrilne kiseline biti dobri ligandi za PAS. *In silico* je dizajnirano sedam ovakvih molekula (Tabela 21), sa različitim supstuentima na aroil-fenil- i na fenilamidnom delu molekula. Konformacije dizajniranih molekula su izvedene dokingom. Za procenu jačine inhibicionog dejstva ovih derivata je korišćen model zasnovan na VINA konformacijama osnovnog seta, kao najprediktivniji.

U tabeli 21 su prikazane predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti za sedam *in silico* dizajniranih dualnih reverzibilnih inhibitora AChE, za različite dimenzionalnosti modela (broj LV). Vidi se da je za većinu derivata procenjena nanomolarna jačina inhibicionog dejstva prema AChE.

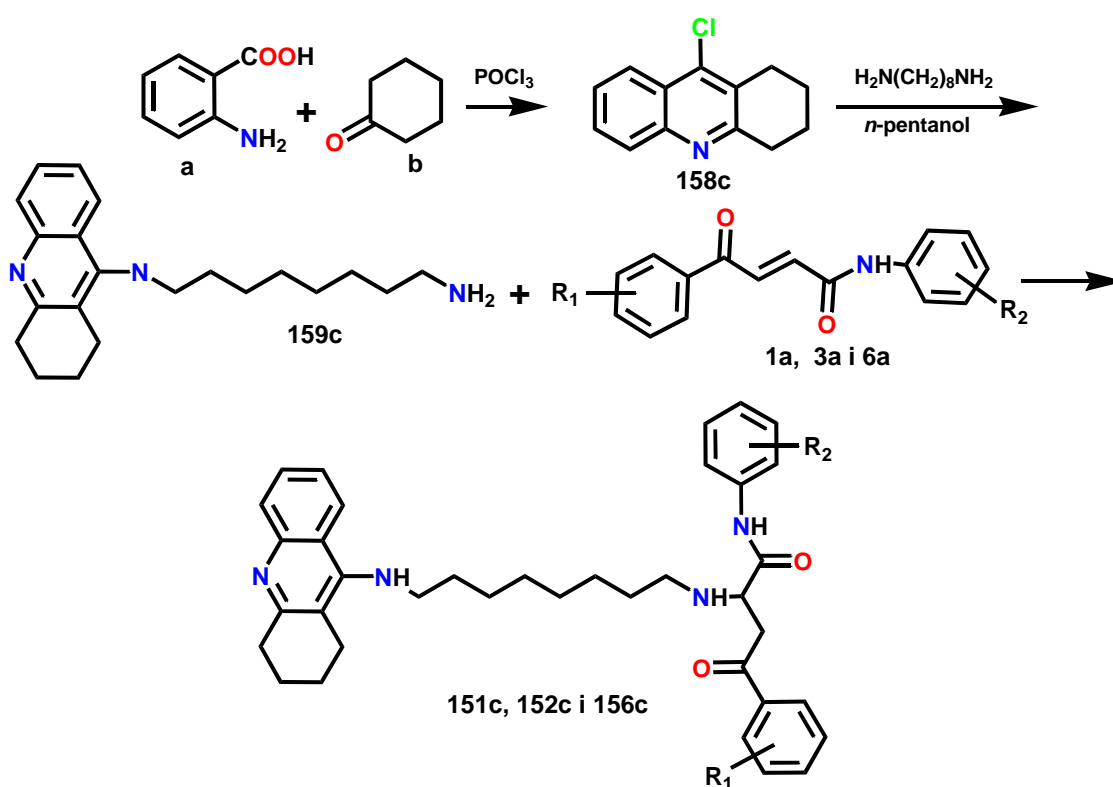
**Tabela 21.** Procenjene pIC<sub>50</sub> vrednosti za *in silico* dizajnirane heterodimere takrina i amida aroilakrilnih kiselina



R. Br. Jed.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	1LV	2LV	3LV	4LV	5LV
151c	4- <i>i</i> -Pr	-H	7,015	7,783	7,808	7,826	7,755
152c	3,4-diMe	-H	6,921	7,551	7,592	7,588	7,570
153c	3,4-diMe	4- <i>i</i> -Pr	6,777	7,277	7,333	7,596	8,030
154c	4- <i>i</i> -Pr	3,5-diOMe	6,926	7,578	7,319	7,268	7,039
155c	-H	3,5-diOMe	7,258	7,363	7,035	6,749	6,876
156c	-H	-H	6,882	7,458	7,404	7,359	7,508
157c	$\beta$ -tetralinil	4- <i>i</i> -Pr	7,076	7,578	7,664	7,710	7,841

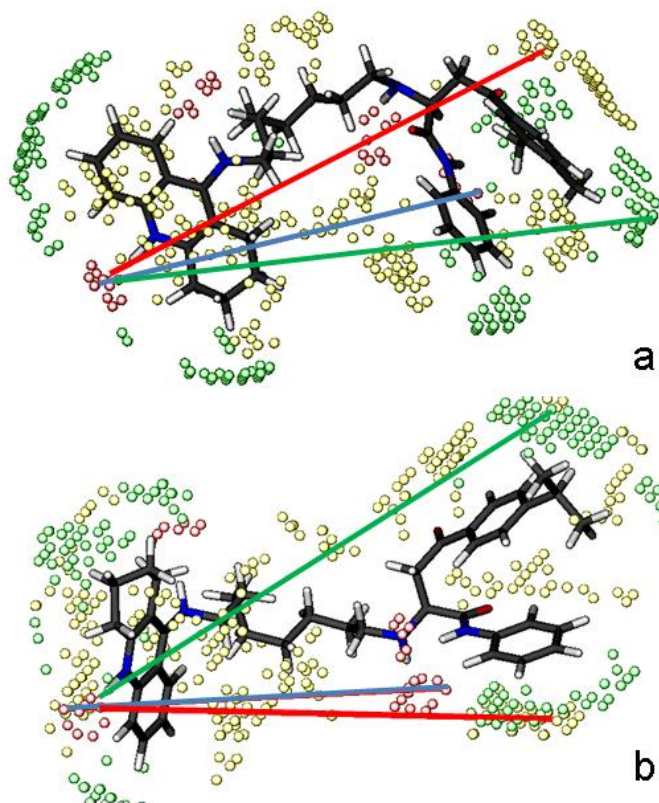
Da bi potvrdili pretpostavke izvedene iz modela, sintetizovana su tri (**151c**, **152c** i **156c**) jedinjenja. Sintetički put za ova jedinjenja je predstavljen na Shemi 57. Modifikovanom reakcijom Niementovskog između antranilne kiseline (**a**) i cikloheksanona (**b**) dobija se 9-hlorotetrahydroakridin (**158c**). Nukleofilna aromatična supstitucija hlora u položaju 9, 1,8-

diaminooktanom daje *N*-9-(1,2,3,4-tetrahydroakridinil)-oktan-1,8-diamin (**159c**), koji se zatim adira na aktiviranu dvostruku vezu fenilamida aroilakrilnih kiselina. Jedinjenja su okarakterisana  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom (Prilog 4) i masenom spektrometrijom visoke rezolucije sa elektrosprej jonizacijom. Jačina inhibicionog dejstva jedinjenja prema AChE je određena Elmanovom spektrofotometrijskom metodom. Dobijene  $\text{pIC}_{50}$  vrednosti su  $8,448 \pm 0,115$  za **151c**,  $8,889 \pm 0,213$  za **152c**, odnosno  $8,067 \pm 0,098$  za **156c**. Prema tome, eksperimentalno određene vrednosti nisu mnogo odstupale od onih koje su procenjene modelom. Na Slici 43 su prikazane važne varijable za kod derivate **151c** i **152c**, koje odgovaraju varijablama O-O 147 (plava), DRY-O 477 (crvena) u OMEGA i varijabli O-TIP 832 (zelena) u VINA modelu.



**Shema 53.** Sinteza jedinjenja **151c** ( $\text{R}_1=4\text{-}i\text{-Pr}$ ,  $\text{R}_2=\text{H}$ ), **152c** ( $\text{R}_1=\text{Me}$ ,  $\text{R}_2=\text{H}$ ) i **156c** ( $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$ ).





**Slika 43.** Važne varijable za derivate **151c** (a) i **152c** (b), koje odgovaraju varijablama O-O 147 (plava), DRY-O 477 (crvena) u OMEGA i varijabli O-TIP 832 (zeleni) u VINA modelu.

Prema tome, 3D-QSAR analiza, zasnovana na deskriptorima nezavisnim od međusobnog svrstavanja molekula (GRIND-2) urađena je na setu od 110 strukturno različitih reverzibilnih inhibitora AChE. Za sva tri tipa konformacija (OMEGA, ROCS i VINA) koje su korišćene za izvođene modela, statistički parametri i prediktivnost modela dobijena metodom unakrsne validacije su zadovoljavajući. Najvažnije varijable koje imaju veliki uticaj na model su prisutne u sva tri modela. Prisustvo donora i akceptora vodonične veze na molekulima ima veliki uticaj na jačinu inhibicionog dejstva prema AChE. U ove funkcionalne grupe spadaju protonovani piridinski azot, amino-grupe linkera inhibitora i alkoksi-supstituenti na onim delovima molekula koji se vezuju za PAS. Međutim, metod nije pronašao specifične varijable koje bi opisivale strukturne elemente jedinjenja povoljne za (lokalno) vezivanje za AS odnosno za PAS AChE. Kraće varijable koje bi se mogle povezati sa povoljnom interakcijom sa AS ili sa PAS obično su postojale za sva jedinjenja u setu i bile su povezane sa različitim strukturnim elementima molekula, čak i unutar istog podseta jedinjenja. Stoga su relativno kratke varijable bile znatno manje informativne u objašnjavanju odnosa strukture i aktivnosti za ovaj set inhibitora. Polja molekularnih

interakcija (MIF) izračunata za šupljinu aktivnog mesta AChE upotrebom N1= (protonovani piridinski azot) i DRY proba, omogućila su identifikaciju aminokiselinskih ostataka (Trp 279, Trp 84, His 440, Tyr 70) koji odgovaraju relativno dugačkim DRY-O varijablama.

Prediktivnost modela je procenjena podelom originalnog seta jedinjenja na osnovni i test set, i pomoću eksternog seta od 40 jedinjenja (test set 2), strukturno različitog od originalnog seta jedinjenja. Neka od ovih jedinjenja su testirana na enzimu iz različitog izvora (*Hu*AChE). Prediktivnost modela za test set 2 veoma zavisi od korišćene konformacije jedinjenja. Model zasnovan na VINA konformacijama dobijenim dokingom imao je superiornu prediktivnu sposobnost u odnosu na ostala dva modela, što ukazuje na potrebu da se koriste konformacije jedinjenja koje su dobijene uzimajući u obzir i geometrijska ograničenja šupljine aktivnog mesta AChE. Međutim, sva tri modela, nezavisno od varijacije njihovih statističkih parametara, pružila su isti tip informacije o povoljnim strukturnim elementima za vezivanje za AChE. Takođe, jačina inhibicionog dejstva tri sintetizovana heterodimerna inhibitora zasnovana na strukturi takrina i fenilamida aroilakrilnih kiselina je relativno dobro predviđena VINA modelom.

Do sada objavljene 3D-QSAR studije o reverzibilnim inhibitorima AChE,<sup>311</sup> su uglavnom ograničene na CoMFA/CoMSIA metode, zavisne od međusobnog prostornog svrstavanja molekula, i izvedene su za setove jedinjenja koji su obuhvatali samo određenu klasu jedinjenja (tetrahidroaminoakridini, *N*-benzilpiperidini i piperazini, karbamati itd.). Ovakvi modeli, uglavnom imaju veoma dobre statističke parametre i prediktivnost ( $r^2 > 0,9$  i  $q^2 > 0,7$ ), ali se ne mogu upotebiti za predviđanje jačine dejstva jedinjenja koja nisu strukturno slična sa setom jedinjenja iz kojih su modeli izvedeni. Naša studija je pokazala prednosti korišćenja deskriptora koji su nezavisni od međusobnog prostornog svrstavanja molekula. Set jedinjenja korišćen u ovoj 3D QSAR studiji je do sada jedan od najvećih i strukturno najraznorodnijih setova reverzibilnih inhibitora AChE.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Sinteza i karakterizacija jedinjenja

#### 4.1.1. Opšte napomene

Sva jedinjenja upotrebljena za sinteze anilida aroilakrilnih kiselina (**1a – 29a**) su bila čistoće *p.a.* Fosforoksihlorid je destilovan neposredno pre upotrebe za svaku sintezu. Čistoća aroilakrilnih kiselina (**C**, Slika 48), koje su upotrebljene kao prekursori za sintezu amida (*E*)-4-aril-4-oxo-2-butenskih kiselina, od >98 %, je potvrđena instrumentalnim metodama.

Za tankoslojnu hromatografiju je korišćen silika gel (63-100, 60 Å), sa fluorescentnim indikatorom (254 nm).

Tačke topljenja amida aroilakrilnih kiselina (**1a – 29a**) i Majklovih adukata sekundarnih amina na amide aroilakrilnih kiselina (**1b-38b**) su određene SMP-10 Stuart aparatu i nisu korigovane.

<sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektri jedinjenja **1a – 29a**, **1b-38b** i **151c**, **152c** i **156c** su snimani u CDCl<sub>3</sub> na aparatima Varian Gemini 200 ili Bruker AVANCE na 200/50 ili 500/125 MHz. Vrednosti hemijskih pomeranja,  $\delta$ , su izražene u *ppm* jedinicama u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutrašnji standard.

Maseni spektri visoke rezolucije jedinjenja **1a – 29a**, **1b-38b** i **151c**, **152c** i **156c** su snimljeni u smeši hloroforma i metanola (50:50) na aparatu Agilent Technologies 6210-1210 TOF-LC-ESI-MS u pozitivnom modu.

#### 4.1.2. Sinteza i karakterizacija amida benzoilakrilnih kiselina (**1a-29a**)

##### 4.1.2.1. Sinteza amida benzoilakrilnih kiselina (**1a-29a**)

U troglom balonu koji je opremljen refluks kondenzatorom, magnetnom mešalicom, kapalicom i termometrom, u 85 ml suvog tetrahidrofurana rastvori se 0,017 mol odgovarajuće aroilakrilne kiseline, i ekvimolarna količina odgovarajućeg amina. Zatim se balon uroni u ledeno kupatilo. Kada temperatura smeše u balonu dostigne 0 °C doda se pažljivo, u kapima, 2,04 ml fosforoksihlorida, pri čemu se reakciona smeša zamuti. Meša se oko petnaest minuta. Zatim se kroz kapalicu doda 6,8 ml trietilamina. Pri dodavanju

fosforoksihlorida i trietilamina treba paziti da temperatura u balonu ne pređe 5 °C. Balon se zatim izvadi iz ledenog kupatila i smeša se meša još jedan sat na sobnoj temperaturi. Nakon toga se smeša izlije u 200 ml vode i blago zagreva (u kapeli) tako da ispari tetrahidrofuran, pri čemu se izdvaja narandžasti talog, koji se procedi na bihnerovom levku. Talog se suspenduje u etil-acetatu, tako da se dobija žitka masa, koja se ponovo cedi na bihnerovom levku, pri čemu se dobija žuti talog sirovog anilida aroilakrilne kiseline. Dobijeni talog se ispira dietiletom i suši na vazduhu. Dobijeni amidi (*E*)-4-aril-4-oxo-2-butenskih kiselina (**1a** – **29a**) su okarakterisani <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom visoke rezolucije sa elektrosprej jonizacijom.

#### 4.1.2.2. Karakterizacija amida aroilakrilnih kiselina (**1a-29a**)

**Fenilamid (*E*)-4-okso-4-fenil-2-butenske kiseline (**1a**):** C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (*E*)-4-fenil-4-okso-2-butenske kiseline (0.017 mol) i odgovarajuće količine anilina, dobija se 1,70 g **1a**, u prinosu 39,81 %, kao svetlo žuta čvrsta supstanca, t.t. = 143-145 °C (razlaganje, AcOEt); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7,15 (*t*, *J* = 7,63 Hz, 1H, amid *p*-fenil), 7,36-7,32 (multiplet, 3H, uključuje ~ 7,33 (*d*, *J* = 14,35 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-) i 7,35 (*t*, *J* = 7,32 Hz, 2H, aroil *m*-fenil)), 7,50 (*t*, *J* = 7,93 Hz, 2H, amido *m*-fenil), 7,62 (*t*, *J* = 7,32 Hz, 1H, aroil *p*-fenil), 7,67 (*d*, *J* = 7,94 Hz, 2H, amido *o*-fenil), 8,04 (*d*, *J* = 7,02 Hz, 2H, aroil *o*-fenil), 8,11 (*d*, 14,95 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 8,45 (*s,b*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 120,19; 125,03; 128,92; 129,10; 133,79; 134,01; 136,21; 136,79; 137,65; 162,10; 190,05, HR MS (ESI): 252,1003 (M+1); Izr.: 252,1025,

**Fenilamid (*E*)-4-(2,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**2a**):** C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (*E*)-4-(2,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,017 mol) odgovarajuće količine anilina, kao što je opisano, dobija se 2,56 g **2a**, u prinosu 70,52 %, u obliku čvrste žute supstance, t.t. = 159-160 °C, (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2,34 (*s*, 3H, *m*-CH<sub>3</sub>); 2,50 (*s*, 3H, *o*-CH<sub>3</sub>); 6,97 (*d*, *J* = 15,11 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,11 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 7,16 Hz, 1H, amido *p*-fenil); 7,24 (*d*, *J* = 7,95, 1H, aroil *p*-fenil); 7,30 (signali slični dubletu, 1H, aroil *m*-fenil); 7,35 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 8,71 Hz, 2H, amido *m*-fenil); 7,43 (*d*, *J* = 15,11 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,46 (*s*, 1H, aroil *o*-fenil); 7,69 (*d*, *J* = 8,75 Hz, 2H, amido *o*-fenil); 10,54 (1H, *s*, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 19,65; 20,36; 119,38; 124,07; 128,88; 129,23; 131,40; 132,10; 133,91; 135,10; 136,39; 137,22; 138,65; 161,80; 193,75. HR MS (ESI): 280,1338 (M+1), Izr.: 280,1338.

**Fenilamid (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**3a**):** C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,013 mol) i odgovarajuće količine anilina, dobija se 2,00 g **3a**, u prinosu 55,10 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 163-165 °C, (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 2,32 (*s*, 6H, *m,p*-CH<sub>3</sub>); 7,12 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 7,30 Hz, 1H, amido *p*-fenil); 7,22 (*d*, *J* = 15,11 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,37 (*m*, 3H, amido *m*-fenil and aroil *m*-fenil); 7,73 (*d*, *J* = 7,30 Hz, 2H, amido *o*-fenil); 7,80 (*d*, *J* = 8,32

Hz, 1H, aroil *o*-fenil); 7,85 (*s*, 1H, aroil *o*-fenil); 7,92 (*d*, 1H,  $J = 15,11$  Hz, C(O)-CH=CH-); 10,60 (*s*, 1H, NH-C(O)).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 19,28; 19,66; 119,44; 124,04; 128,49; 128,90; 129,59; 130,08; 132,08; 133,00; 134,48; 136,27; 137,22; 138,75; 143,37; 162,00; 189,05$ , HR MS (ESI): 280,1335 (M+1), Izr.: 280,1338.

**3,5-Dimetoksifenilamid (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (4a):**  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$  reakcijom (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0114 mol) i odgovarajuće količine 3,5-dimetoksianilina, dobija se 2,32 g **4a**, u prinosu 59,95 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 162-164 °C, uz razlaganje (AcOEt).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 2,31$  (*s*, 3H, *p*- $\text{CH}_3$ ); 2,34 (*s*, 3H, *m*- $\text{CH}_3$ ); 3,77 (*s*, 6H, - $\text{OCH}_3$ ); 6,26 (*t*,  $J = 2,35$  Hz, 1H, amido-*p*-fenil); 7,01 (signali slični dubletu, 2H, aroil *o*-fenil); 7,25 (*d*,  $J = 7,70$  Hz, 1H, aroil *m*-fenil), 7,39 (*d*,  $J = 14,96$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,81 (*d*,  $J = 7,89$  Hz, 1H, aroil *o*-fenil); 7,84 (*s*, 1H, aroil *o*-fenil); 8,12 (*d*,  $J = 14,75$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,85 (*sb*, 1H, NH-C(O));  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 19,68; 20,18; 55,39; 97,51; 98,48; 126,79; 130,09; 130,20; 133,94; 134,79; 134,79; 135,95; 137,53; 139,70; 144,05; 161,06; 162,48; 189,79$ . ESI-MS HR: 340,1544 (M+1), Izr. 340,1549.

**4-Izopropilfenilamid (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (5a):**  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_2$  reakcijom (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0076 mol) i odgovarajuće količine 4-izopropilanilina, dobija se 1,65 g **5a**, u prinosu 67,62 %, u obliku žute čvrste supstance, t.t. = 129-130 °C, uz razlaganje (AcOEt).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1,24$  (*d*,  $J = 6,83$  Hz, 6H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,29 (*s*, 3H, *p*- $\text{CH}_3$ ); 2,33 (*s*, 3H, *m*- $\text{CH}_3$ ); 2,89 (*b*,  $J = 6,82$  Hz, 1H, *i*-PrCH); 7,20 (*d*,  $J = 8,58$  Hz, 2H, amido *m*-fenil); 7,24 (*d*,  $J = 7,88$  Hz, 1H, aroil *m*-fenil); 7,45 (*d*,  $J = 14,87$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,64 (*d*,  $J = 8,58$  Hz, 2H, amido *o*-fenil); 7,88 (*d*,  $J = 7,88$  Hz, 1H, aroil *o*-fenil); 7,83 (*s*, 1H, aroil *o*-fenil); 8,13 (*d*,  $J = 14,87$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,91 (*sb*, 1H, NH-C(O)).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 19,95; 20,12; 23,95; 33,63; 120,36; 126,79; 126,90; 130,05; 130,13; 133,47; 133,47; 134,77; 135,61; 136,60; 137,39; 143,91; 145,61; 162,27; 189,88$ . ESI-MS HR: 322,1814 (M+1), Izr. 321,1729.

**Fenilamid (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (6a):**  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ , reakcijom (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,017 mol) i odgovarajuće količine anilina, dobija se 2,15 g **6a**, u prinosu 42,99 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 132-136 °C, uz razlaganje (AcOEt);  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1,29$  (*d*,  $J = 6,94$  Hz, 6H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,99 (*m*, 1H, *i*-PrCH); 7,16 (*t*,  $J_{1,2} = 7,38$  Hz, 1H, amido *p*-fenil); 7,33-7,37 (preklopljeni multipljeti, 5H, amido *m*-fenil, aroil *m*-fenil and C(O)-CH=CH-); 7,69 (*d*,  $J = 7,73$  Hz, 2H, amido *o*-fenil); 8,00 (*d*,  $J = 8,23$  Hz, 2H, aroil *o*-fenil); 8,13 (*d*,  $J = 14,97$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,50 (*s*, 1H, NH-C(O)).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta = 23,57; 34,36; 120,20; 124,97; 127,07; 129,09; 129,28; 133,94; 134,67; 135,90; 137,74; 155,89; 162,25; 189,56$ . HR MS (ESI): 294,1493 (M+H), Izr. 294,1494.

**3,5-Dimetoksifenilamid (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (7a):**  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ , reakcijom (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0114 mol) i odgovarajuće količine 3,5-dimetoksianilina, dobija se 1,70 g **7a**, u prinosu 41,44 %, kao žuta

čvrsta supstanca, t.t. = 132-134 °C, (AcOEt); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1,27 (*d*, *J* = 6,84 Hz, 6H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,98 (*b*, *J* = 2,98 Hz, 1H, *i*-PrCH); 3,76 (*s*, 6H, -OCH<sub>3</sub>); 6,97 (*s*, 2H, amido *o*-fenil); 7,35 (*d*, *J* = 8,12 Hz, 2H, aroil *m*-fenil); 7,39 (*d*, *J* = 14,96 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,00 (*d*, *J* = 8,33 Hz, 2H, aroil *o*-fenil); 8,13 (*d*, *J* = 14,75 Hz, 2H, C(O)-CH=CH-); 8,74 (*sb*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 23,55; 34,34; 55,36; 97,60; 98,39; 127,07; 129,26; 133,83; 134,69; 136,03; 139,56; 155,88; 161,03; 162,36; 189,61. ESI-MS HR: 354,1709 (M+H), Izr. 354,1705.

**Cikloheksilamid (E)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (8a):** C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0092 mol) i odgovarajuće količine cikloheksilamina, dobija se 0,65 g **8a**, u prinosu 23,78, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 136-138 °C, (AcOEt); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1,16 - 1,25 (*m*, 3H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 1,27 (*d*, *J* = 7,0 Hz, 6H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 1,36-1,44 (*m*, 2H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 1,62-1,67 (*m*, 1H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 1,72-1,76 (*m*, 2H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 1,97-2,00 (*m*, 2H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>); 2,96 (*b*, *J* = 6,5 Hz, 1H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 3,93 (*m*, 1H, cikloheksil-CH); 6,56 (*d*, *J* = 8,00 Hz, 1H, NH-C(O)); 7,10 (*d*, *J* = 15,00 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,34 (*d*, *J* = 8,5 Hz, 2H, aroil *m*-fenil); 7,97 (*d*, *J* = 8,5 Hz, 2H, aroil *o*-fenil); 7,98 (*d*, *J* = 15,50 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 23,53; 24,76; 25,46; 32,88; 34,26; 48,68; 126,87; 129,11; 132,78; 134,76; 135,88; 155,43; 163,17; 189,54. ESI-MS HR: 300,1958 (M+1), Izr. 300,1964.

**Benzilamid (E)-4-(2,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (9a):** C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(2,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0078 mol) i odgovarajuće količine benzilamina, dobija se 1,04 g **9a**, u prinosu 45,41 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 142-144 °C, (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 2,33 (*s*, 3H, *m*-CH<sub>3</sub>); 2,38 (*s*, 3H, *o*-CH<sub>3</sub>); 4,52 (*d*, *J* = 5,92 Hz, 2H, benzil-CH<sub>2</sub>-); 6,80 (*sb*, 1H, benzilamid-NH); 6,87 (*d*, *J* = 15,36 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,12 (*d*, *J* = 7,84 Hz, 1H, aroil *p*-fenil); 7,20 (*dd*, *J* = 7,68 Hz, 1H, aroil *m*-fenil); 7,24-7,30 (*m*, 5H, benzil-CH); 7,40 (*d*, *J* = 1,12 Hz, 1H, aroil *o*-fenil); 7,65 (*d*, *J* = 15,20 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 20,31; 20,74; 43,94; 127,60; 127,79; 128,68; 129,74; 131,68; 132,58; 134,97; 135,25; 135,51; 136,71; 137,01; 137,48; 164,07; 194,09. ESI-MS HR: 294,1490 (M+1) 100 %, Izr. 294,1494.

**Benzilamid (E)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (10a),** C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0092 mol) i odgovarajuće količine benzilamina, dobija se 0,94 g **10a**, u prinosu 33,29 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 125-127 °C, uz razlaganje (AcOEt); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 1,27 (*d*, *J* = 7,30 Hz, 6H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,96 (*b*, *J* = 6,74 Hz, 1H, *i*-PrCH); 4,57 (*d*, *J* = 5,62 Hz, 2H, benzil-CH<sub>2</sub>-); 7,23 - 7,53 (preklopljeni *m*, 9H, aroil *m*-fenil, C(O)-CH=CH-, i benzilamid-NH); 7,83 (*d*, *J* = 6,74 Hz, 2H, aroil *o*-fenil); 8,03 (*d*, *J* = 15,16 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 23,47; 34,20; 43,94; 95,68; 126,89; 127,51; 127,83; 128,63; 129,11; 132,97; 134,52; 135,46; 137,57; 155,53; 164,28; 189,48. ESI-MS HR: 308,1647 (M+1), Izr. 308,1651.

**4-Metoksifenilamid (E)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (11a):** C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>, reakcijom (E)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0078 mol) i odgovarajuće količine 4-metoksianilina, dobija se 0,71 g **11a**, u prinosu 28,09 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 142-144 °C, uz razlaganje (AcOEt); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1,27 (*d*, *J* = 6,71 Hz, 6H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,97 (*b*, *J* = 6,72 Hz, 1H, *i*-PrCH); 3,78 (*s*, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 6,86 (*d*, *J* = 9,06 Hz, 2H, amido *m*-fenil); 7,33 (*d*, *J* = 8,39 Hz, 2H, aroil *m*-fenil); 7,41 (*d*, *J* = 15,10 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,62 (*d*, *J* = 8,06 Hz, 2H, amido *o*-fenil); 7,97 (*d*, *J* = 8,39 Hz, 2H, aroil *o*-fenil); 8,11 (*d*, *J* = 14,77 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,90 (*sb*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 23,54; 34,31; 55,40; 114,16; 121,93; 127,00; 129,23; 131,02; 133,28; 134,69; 136,30; 155,76; 155,77; 162,15; 189,66. ESI-MS HR: 324,1599 (M+1), Izr. 324,1600.

**Fenilamid (E)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (12a),** C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,013 mol) i odgovarajuće količine anilina, dobija se 2,06 g **12a**, u prinosu 45,87 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 122-124 °C, (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 1,20 (*d*, *J* = 6,86 Hz, 6H, *p*-*i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,24 (*d*, *J* = 6,75 Hz, 6H, *o*-*i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,96 (*m*, 1H, *p*-*i*-PrCH); 3,19 (*m*, 1H, *o*-*i*-PrCH); 6,91 (*d*, *J* = 14,93 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,10 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 6,97 Hz, 1H, amido *p*-fenil); 7,21, 7,22 (signali slični dubletu, 1H, aroil *m*-fenil); 7,30 (*d*, *J* = 14,93 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,34 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 8,30 Hz, 2H, amido *m*-fenil); 7,37 (*br*, 1H, aroil *m*-fenil); 7,42 (*d*, *J* = 7,94 Hz, 1H, aroil *o*-fenil); 7,67 (*d*, *J* = 8,63 Hz, 2H, amido *o*-fenil); 10,54 (*s*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 23,63; 23,90; 29,23; 33,57; 119,28; 123,39; 124,08; 128,88; 134,95; 137,40; 137,57; 136,63; 147,58; 151,82; 161,72; 196,11. HR MS (ESI): 336,1975 (M+1), Izr.: 336,1964.

**3,5-Dimetoksifenilamid (E)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (13a):** C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub>, reakcijom (E)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0096 mol) i odgovarajuće količine 3,5-dimetoksianilina, dobija se 1,90 g **13a**, u prinosu 50,00 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 120-122 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1,23 (*d*, *J* = 6,72 Hz, 6H, *p*-*i*-PrCH<sub>3</sub>), 1,27 (*d*, *J* = 6,88 Hz, 6H, *o*-*i*-PrCH<sub>3</sub>), 2,94 (*b*, *J* = 6,72 Hz, 1H, *p*-*i*-PrCH), 3,42 (*b*, *J* = 6,72 Hz, 1H, *o*-*i*-PrCH), 3,73 (*s*, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 6,26 (*s*, 1H, amido *p*-fenil), 6,86 (*s*, 2H, amido *o*-fenil), 7,98 (*d*, *J* = 15,03 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 7,11 (*d*, *J* = 7,67 Hz, 1H, aroil *m*-fenil), 7,28 (*s*, 1H, aroil *m*-fenil), 7,43 (*d*, *J* = 7,84 Hz, 1H, aroil *o*-fenil), 7,65 (*d*, *J* = 15,20 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 8,11 (*sb*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 23,71; 24,14; 29,58; 34,36; 55,53; 97,55; 98,26; 123,45; 124,82; 128,87; 135,00; 135,64; 136,12; 139,28; 148,93; 153,09; 161,02; 162,18; 194,99. ESI-MS HR: 396,2169 (M+1), Izr. 396,2175.

**4-Izopropilfenilamid (E)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (14a):** C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0096 mol) i odgovarajuće količine 4-izopropilanilina, dobija se 2,30 g **14a**, u prinosu 63,53 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 119-121 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 1,23 (*d*, *J* = 6,50 Hz, 6H, aroil-*o*-*i*-PrCH<sub>3</sub>), 1,17-1,20 (*m*, 12 H, aroil *p*-*i*-PrCH<sub>3</sub>, amido *p*-*i*-PrCH<sub>3</sub>), 2,96 (*b*, *J* = 6,31 Hz, 1H, aroil *p*-*i*-PrCH<sub>3</sub>), 2,84 (*b*, *J* = 6,31 Hz,

1H, amido *p*-*i*-PrCH<sub>3</sub>), 3,18 (*b*, *J* = 6,31 Hz, 1H, aroil *o*-*i*-Pr-CH), 6,90 (*d*, *J* = 15,49 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 7,19-7,21 (*m*, 3H, aroil *m*-fenil, amido *m*-fenil) 7,29 (*d*, *J* = 15,49 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 7,37 (*s*, 1H, aroil *m*-fenil), 7,41 (*d*, *J* = 7,65 Hz, 1H, aroil *o*-fenil), 7,59 (*d*, *J* = 7,27 Hz, 2H, amido *o*-fenil), 10,5 (*sb*, 1H, NH-C(O)); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 23,62; 23,85; 23,89; 29,23; 32,89; 33,57; 119,43; 123,36; 124,44; 126,57; 128,34; 134,99; 136,42; 137,19; 137,72; 144,20; 147,51; 151,76; 161,46; 196,12. ESI-MS HR: 378,2421 (M+1), Izr. 378,2433.

**Benzilamid (E)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (15a):** C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0077 mol) i odgovarajuće količine benzilamina, dobija se 0,92 g **15a**, u prinosu 35,11 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 125-127 °C, (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1,22 (*d*, *J* = 6,85 Hz, 6H, *p*-*i*-PrCH<sub>3</sub>), 1,26 (*d*, *J* = 6,85 Hz, 6H, *o*-*i*-PrCH<sub>3</sub>), 2,93 (*b*, *J* = 7,00 Hz, 1H, *p*-*i*-PrCH), 3,37 (*b*, *J* = 6,85 Hz, 1H, *o*-*i*-PrCH), 4,52 (*d*, *J* = 5,79 Hz, 2H, benzil-CH<sub>2</sub>-), 6,48 (*m*, 1H, benzil-*p*-CH), 6,75 (*d*, *J* = 15,37 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 7,09 (*d*, *J* = 8,06 Hz, 1H, aroil *m*-fenil), 7,26-7,30 (*m*, 6H, benzil-CH-, aroil *m*-fenil and benzil-NH-), 7,38 (*d*, *J* = 8,06 Hz, 1H, aroil *o*-fenil), 7,53 (*d*, *J* = 15,37 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 23,70; 24,10; 29,49; 34,33; 44,01; 123,32; 124,72; 127,69; 127,87; 128,74; 134,90; 135,04; 137,45; 137,75; 148,79; 152,80; 164,02; 195,06. ESI-MS HR: 350,2114 (M+1), Izr. 350,2120.

**3,5-Dimetoksifenilamid (E)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (16a):** C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>, reakcijom (E)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0065 mol) i odgovarajuće količine 3,5-dimetoksianilina, dobija se 1,48 g **16a**, u prinosu 62,40 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 172-174 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1,83 (*m*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-), 2,82 (*m*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-), 3,78 (*m*, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 6,29 (*s*, 1H, amido *p*-fenil), 6,95 (*m*, 2H, amido *o*-fenil), 7,17 (*d*, *J* = 8,50 Hz, 1H, aroil *m*-fenil), 7,30 (*d*, *J* = 14,72 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 1,79 (*m*, 2H, aroil *o*-fenil), 6,12 (*d*, *J* = 15,05 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 8,37 (*sb*, 1H, NH-C(O)); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 22,71; 22,86; 29,26; 29,78; 55,39; 97,51; 98,37; 125,98; 129,74; 129,99; 134,17; 134,32; 135,57; 136,02; 139,47; 144,64; 161,08; 162,33; 189,63. ESI-MS HR: 366,1710 (M+1), Izr. 366,1705.

**Cikloheksilamid (E)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (17a):** C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0078 mol) i odgovarajuće količine cikloheksilamina, dobija se 1,06 g **17a**, u prinosu 43,46 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 166-168 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1,16-1,29 (*m*, 3H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-), 1,39-1,43 (*m*, 2H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-), 1,64 (*m*, 1H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-), 1,75 (*m*, 2H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-), 1,82 (*sb*, 4H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-), 2,00 (*m*, 2H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-), 2,81 (*sb*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-), 3,93 (*m*, 1H, cikloheksil-CH-), 6,66 (*d*, *J* = 8,10 Hz, 1H, amid-NH-), 7,13 (*d*, *J* = 15,15 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 7,17 (*d*, *J* = 8,56 Hz, 1H, aroil *m*-fenil), 7,75 (*m*, 2H, aroil *o*-fenil), 7,97 (*d*, *J* = 14,95 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 22,66; 22,81; 24,77;



25,46; 29,44; 29,66; 32,89; 48,67; 125,86; 129,52; 129,78; 132,79; 134,38; 135,79; 137,71; 144,16; 163,25; 189,74. ESI-MS HR: 312.1956 (M+1), Izr. 312.1964.

**4-Izopropilfenilamid (E)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (18a)**, C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0096 mol) i odgovarajuće količine 4-izopropilanilina, dobija se 1,76 g **18a**, u prinosu 52,54 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 146-148 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1,23 (*d*, *J* = 6,99 Hz, 6H, *i*-PrCH<sub>3</sub>), 1,81 (*m*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-), 2,79 (*db*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-), 2,88 (*b*, *J* = 6,99 Hz, 1H, *i*-PrCH), 7,15 (*d*, *J* = 8,43 Hz, 2H, amido *m*-fenil), 7,19 (*d*, *J* = 8,43 Hz, 1H, aroil *m*-fenil), 7,47 (*d*, *J* = 14,81 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 7,65 (*d*, *J* = 8,43 Hz, 2H, amido *o*-fenil), 7,76 (*m*, 2H, aroil *o*-fenil), 8,13 (*d*, *J* = 14,81 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 9,06 (*sb*, 1H, NH-C(O)); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 22,60; 22,80; 23,94; 29,93; 29,71; 33,60; 120,35; 125,98; 126,85; 129,64; 129,92; 133,43; 134,35; 135,65; 136,93; 137,86; 144,49; 145,53; 162,23; 189,92. ESI-MS HR: 348,1957 (M+1), Izr. 348,1964.

**Benzilamid (E)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (19a)**: C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0078 mol) i odgovarajuće količine benzilamina, dobija se 1,03 g **19a**, u prinosu 41,20 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 148-150 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1,81 (*sb*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-), 2,80 (*mb*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-), 4,57 (*d*, *J* = 5,94 Hz, 2H, benzilamin-CH<sub>2</sub>-), 6,87 (*m*, 1H, benzilamin-CH-), 7,09 (*d*, *J* = 15,07 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 7,13 (*d*, *J* = 8,06 Hz, 1H, aroil *m*-fenil), 7,27 (*m*, 1H, benzil-NH-), 7,31 (*m*, 4H, benzilamin-CH-), 7,65 (*d*, *J* = 7,91 Hz, 1H, aroil *o*-fenil), 7,70 (*sb*, 1H, aroil *o*-fenil), 8,00 (*d*, *J* = 14,92 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 22,69; 22,83; 29,26; 29,71; 44,02; 125,85; 127,62; 127,83; 128,73; 129,62; 129,86; 133,55; 134,25; 134,79; 137,59; 137,77; 144,29; 164,19; 189,53. ESI-MS HR: 320,1649 (M+1), Izr. 320,1651.

**Fenilamid (E)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-4-okso-2-butenske kiseline (20a)**: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,017 mol) i odgovarajuće količine anilina, dobija se 3,10 g **20a**, u prinosu 78,08 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 135-167 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 1,82 (*m*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-); 2,82 (*m*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-); 7,14-7,19 (preklopljeni signali, 2H, amido *p*-fenil and aroil *m*-fenil); 7,36 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 8,32 Hz, 2H, amido *m*-fenil); 7,41 (*d*, *J* = 14,94 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,71 (*d*, *J* = 8,63 Hz, 2H, amido *o*-fenil); 7,77 (*s*, 1H, aroil *o*-fenil); 7,78 (*s*, 1H, aroil *o*-fenil); 8,14 (*d*, *J* = 14,94 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,68 (*s*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 22,69; 22,84; 29,30; 29,77; 120,20; 124,91; 126,02; 129,06; 129,73; 129,97; 133,90; 134,34; 135,94; 137,85; 137,97; 144,66; 162,32; 189,85. HR MS (ESI): 306,1491 (M+1), Izr. 306,1494.

**Fenilamid (E)-4-(4-*n*-butilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (21a)**: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(4-*n*-butilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,013 mol) i odgovarajuće količine anilina, dobija se 1,29 g **21a**, u prinosu 32,25 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 133-135 °C, (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0,91 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 7,07 Hz, 3H,

CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>); 1,32 (*sp*,  $J_{1,2} = 7,48$  Hz,  $J_{1,3} = 14,95$  Hz, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,59 (*m*,  $J_{1,2} = 7,47$  Hz,  $J_{1,3} = 14,95$  Hz, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,68 (*t*,  $J_{1,2} = 7,47$  Hz, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 7,12 (*t*,  $J_{1,2} = 7,08$  Hz, 1H, amido *p*-fenil); 7,21 (*d*,  $J = 15,33$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,37 (*t*,  $J_{1,2} = 7,47$  Hz, 2H, amido *m*-fenil); 7,42 (*d*,  $J = 7,87$  Hz, 2H, aroil *m*-fenil); 7,73 (*d*,  $J = 7,47$  Hz, 2H, amido *o*-fenil); 7,89 (*d*,  $J = 15,33$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,99 (*d*,  $J = 8,26$  Hz, 2H, aroil *o*-fenil); 10,59 (*s*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta = 13,70; 21,71; 32,65; 34,81; 119,41; 124,02; 128,88; 149,11; 161,92; 189,06$ . HR MS (ESI): 308,1656 (M+1), Izr. 308,1651.

**3,5-Dimetoksifenilamid (E)-4-(2,3,5,6-tetrametilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (22a)**: C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>, reakcijom (E)-4-(2,3,5,6-tetrametilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0094 mol) i odgovarajuće količine of 3,5-dimetoksianilina, dobija se 2,50 g **22a**, u prinosu 72,46 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 198-200 °C, (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 2,03$  (*s*, 6H, *o*- and *m*-CH<sub>3</sub>); 2,19 (*s*, 6H, *m*- and *p*-CH<sub>3</sub>); 3,67 (*s*, 6H, -OCH<sub>3</sub>); 6,23 (*t*,  $J_{1,2} = 2,16$  Hz, 1H, amido *p*-fenil); 6,80 (*d*,  $J = 15,41$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 6,79 (*s*, 1H, amido *o*-fenil); 6,80 (*s*, 1H, amido *o*-fenil); 6,99 (*s*, 1H, aroil *o*-fenil); 7,31 (*d*,  $J = 15,41$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,38 (*s*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 16,19; 19,36; 55,17; 97,45; 97,99; 129,35; 132,31; 134,52; 137,32; 138,52; 139,20; 139,52; 160,92; 162,03; 201,92$ . ESI-MS HR: 368,1856 (M+1), Izr. 368,1862.

**Fenilamid (E)-4-(4-fluorfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (23a)**: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(4-fluorfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,013 mol) i odgovarajuće količine anilina, dobija se 1,19 g **23a**, u prinosu 34,00 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 163-173 °C, (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta = 7,13$  (*t*,  $J_{1,2} = 7,54$  Hz, 1H, amido *p*-fenil); 7,23 (*d*,  $J = 15,38$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,37 (*t*,  $J_{1,2} = 7,57$  Hz, 2H, amido *m*-fenil); 7,42 (*t*,  $J_{1,2} = 7,42$  Hz, 2H, aroil *m*-fenil); 7,73 (*d*,  $J = 7,66$  Hz, 2H, amido *o*-fenil); 7,92 (*d*,  $J = 15,32$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,17 (*m*,  $J_{1,2} = 5,55$  Hz,  $J_{1,3} = 9,07$  Hz, 2H, aroil *o*-fenil); 10,60 (*s*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta = 115,52; 116,23; 119,41; 124,08; 128,90; 131,82; 131,89; 132,73; 133,28; 133,30; 136,75; 138,66; 161,89; 166,37; 164,36; 188,22$ . HR MS (ESI): 270,0935 (M+1), Izr.: 270,0930.

**Fenilamid (E)-4-(4-hlorfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (24a)**: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(4-hlorfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,017 mol) i odgovarajuće količine anilina, dobija se 2,30 g **24a**, u prinosu 47,42 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 181-183 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta = 7,12$  (*t*,  $J_{1,2} = 7,26$  Hz, 1H, amido *p*-fenil); 7,22 (*d*,  $J = 15,29$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,37 (*t*,  $J_{1,2} = 7,58$  Hz, 2H, amido *m*-fenil); 7,72 (*d*,  $J = 7,44$  Hz, 2H, amido *o*-fenil); 7,80 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2H, aroil *m*-fenil); 7,87 (*d*,  $J = 15,29$  Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,00 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2H, aroil *o*-fenil); 10,60 (*s*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta = 119,42; 124,09; 128,00; 128,01; 130,73; 132,08; 132,61; 135,55; 137,00; 138,66; 161,76; 188,91$ . HR MS (ESI): 286,0634 (M+1), Izr. 286,0635.

**Fenilamid (E)-4-(3,4-dihlorfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (25a)**: C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(3,4-dihlorfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,013 mol) i odgovarajuće

količine anilina, dobija se 2,80 g **25a**, u prinosu 67,31 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 187-194 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7,12 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 7,35 Hz, 1H, amido *p*-fenil); 7,24 (*d*, *J* = 15,30 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,37 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 7,65 Hz, 2H, amido *m*-fenil); 7,72 (*d*, *J* = 7,65 Hz, 2H, amido *o*-fenil); 7,84 (*d*, *J* = 8,46 Hz, 1H, aroil *m*-fenil); 7,87 (*d*, *J* = 15,32 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,03 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 2,12 Hz, *J*<sub>1,3</sub> = 8,48 Hz, aroil *o*-fenil); 8,24 (*s*, 1H, aroil *o*-fenil); 10,61 (*s*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 119,43; 124,11; 128,77; 128,90; 130,49; 131,29; 132,08; 132,35; 136,61; 136,69; 137,45; 136,64; 161,67; 187,85. HR MS (ESI): 320,0241 (M+1), Izr. 320,0245.

**Fenilamid (E)-4-(4-bromfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (26a)**: C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>BrNO<sub>2</sub>, reakcijom (E)-4-(4-bromfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,013 mol) i odgovarajuće količine anilina, dobija se 2,60 g **26a**, u prinosu 60,60 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 187-194 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 7,12 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 7,55 Hz, 1H, amido *p*-fenil); 7,23 (*d*, *J* = 14,37, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,37 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 7,85 Hz, 2H, amido *m*-fenil); 7,73 (*d*, *J* = 7,60, 2H, amido *o*-fenil); 7,82 (*d*, *J* = 8,74, 2H, aroil *m*-fenil); 7,88 (*d*, *J* = 15,26, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,00 (*d*, *J* = 8,77 Hz, 2H, aroil *o*-fenil); 10,60 (*s*, 1H, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 119,41; 124,08; 127,99; 128,90; 130,72; 132,07; 132,60; 135,54; 136,99; 138,65; 161,75; 188,90. HR MS (ESI): 330,0120/332,0102 (M+1), Izr.: 330,0124/332,0105.

**Fenilamid (E)-4-(4-metoksifenil)-4-okso-2-butenske kiseline (27a)**: C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>, reakcijom (E)-4-(4-metoksifenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,017 mol) i odgovarajuće količine anilina, dobija se 2,50 g **27a**, u prinosu 52,30 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 157-161 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 3,88 (*s*, 3H, *p*-OCH<sub>3</sub>); 6,95 (*d*, *J* = 9,03, 2H, aroil *m*-fenil); 7,15 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 7,35 Hz, 1H, amido *p*-fenil); 7,35 (*t*, *J*<sub>1,2</sub> = 8,16 Hz, 2H, amido *m*-fenil); 7,42 (*d*, *J* = 14,81 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 7,70 (*d*, *J* = 8,18, 2H, amido *o*-fenil); 8,04 (*d*, *J* = 9,03 Hz, 2H, aroil *o*-fenil); 8,13 (*d*, *J* = 14,81 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-); 8,87 (1H, *s*, NH-C(O)). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 55,57; 114,18; 120,25; 124,87; 129,04; 128,85; 131,46; 133,69; 135,84; 137,88; 162,43; 164,40; 188,36. HR MS (ESI): 282,1133 (M+1), Izr. 282,1134.

**3,5-Dimetoksifenilamid (E)-4-(4-metoksifenil)-4-okso-2-butenske kiseline (28a)**: C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>, reakcijom (E)-4-(4-metoksifenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,0076 mol) i odgovarajuće količine 3,5-dimetoksianilina, dobija se 0,81 g **28a**, u prinosu 31,40 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 141-143 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ = 3,76 (*s*, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 3,90 (*s*, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 6,29 (*sb*, 1H, amido *p*-fenil), 6,94 (*m*, 2H, amido *o*-fenil), 6,98 (*d*, *J* = 8,96 Hz, 2H, aroil *m*-fenil), 7,29 (*d*, *J* = 14,72 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 8,07 (*d*, *J* = 8,64 Hz, 2H, aroil *o*-fenil), 8,11 (*d*, *J* = 15,04 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 8,33 (*sb*, 1H, NH-C(O)); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 55,41; 55,60; 97,53; 98,37; 114,21; 129,86; 131,44; 134,05; 135,35; 139,44; 161,09; 162,36; 164,41; 188,05. ESI-MS HR: 342,1338 (M+1), Izr. 342,1341.

**3,5-Dimetoksifenilamid (E)-4-(4-metoksi-3,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (29a)**: C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>, reakcijom (E)-4-(4-metoksi-3,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske

kiseline (0,0076 mol) i odgovarajuće količine 3,5-dimetoksianilina, dobija se 0,93 g **29a**, u prinosu 33,02 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 160-162 °C, uz razlaganje (AcOEt). <sup>1</sup>H NMR 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ = 2,19 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,54 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 5,70 (s, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 3,88 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 6,25 (s, 1H, amido *p*-fenil), 6,67 (s, 1H, aroil *o*-fenil), 6,91 (s, 2H, amido *o*-fenil), 7,12 (d, J = 14,88 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 7,58 (s, 1H, aroil *o*-fenil), 7,89 (d, J = 14,88 Hz, 1H, C(O)-CH=CH-), 8,55 (s, 1H, NH-C(O)); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 15,77; 21,94; 55,30; 55,42; 97,46; 98,28; 113,33; 123,97; 128,92; 132,95; 134,61; 137,32; 139,53; 140,25; 160,77; 160,95; 162,62; 191,61. ESI-MS HR: 370,1649 [M+H], Izr. 369,1576.

#### 4.2.3. Sinteza i karakterizacija Majklovih adukata na amide aroilakrilnih kiselina (1b-38b)

##### 4.2.3.1. Sinteza Majklovih adukata na amide aroilakrilnih kiselina (1b-38b)

U balon od 25 ml, koji je opremljen refluks kondenzatorom i magnetnom mešalicom rastvori se 7 mmol odgovarajućeg supstituisanog amida (*E*)-4-aril-4-okso-2-butenske kiseline u 15 ml hloroforma. Zatim se doda 15 ml toluena i ekvimolarna količina odgovarajućeg sekundarnog amina (piperidina, imidazola, morfolina ili *N*-metilpiperazina). Smeša se meša na sobnoj temperaturi tokom 24 časa. Nakon završetka reakcije, smeša je ili uparena do suva i izdvojen čist proizvod, ili je izdvojeni talog proceden i sušen na sobnoj temperaturi. Dobijeni 4-aril-4-okso-*N*-fenil-2-aminilbutiramidi (**1b-38b**) su okarakterisani <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom visoke rezolucije sa elektrosprej jonizacijom.

##### 4.2.3.2. Karakterizacija Majklovih adukata na amide benzoilakrilnih kiselina (1b-38b)

***N*-(3,5-Dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamid (1b)**, C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, reakcijom 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,85 mmol) i odgovarajuće količine piperidina, dobijeno je 0,179 g **1b**, u prinosu 48,05%, kao blede žuta čvrsta supstanca, t.t. = 111-113 °C, (toluen). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,28 (d, 6H, J=7,59 Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,47 (m, 2H, piperidinil -CH<sub>2</sub>-); 1,63 (m, 4H, piperidinil -CH<sub>2</sub>-); 2,57 (*t*-like, 4H, J=5,16 Hz, piperidinil -CH<sub>2</sub>-); 2,93-3,04 (preklopljeni *m*, 2H, *i*-PrCH i ABX); 3,66 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub>=6,37 Hz, J<sub>1,3</sub>=9,40 Hz, ABX); 3,77 (s, 6H, -OCH<sub>3</sub>); 4,26 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub>=5,16 Hz, J<sub>1,3</sub>=9,41 Hz, ABX); 6,22 (signali slični *t*, 1H, J<sub>1,2</sub>=4,25 Hz, amido-*p*-fenil); 6,79 (s, 1H, amido-*o*-fenil); 6,80 (s, 1H, amido-*o*-fenil); 7,33 (d, 2H, J=8,50 Hz aroil-*m*-fenil); 7,97 (d, 2H, J=8,50 Hz aroil-*o*-fenil); 9,47 (s, 1H, amido -NH-). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 22,38; 22,58; 23,60; 23,87; 26,71; 31,85; 34,16; 44,48; 51,00; 55,35; 96,32; 97,36; 126,65; 128,51; 134,81; 139,61; 154,54; 161,04; 170,60; 198,22. ESI-MS HR: 439,2587 (M +1), Izr. 439,2597.

***N*-(3,5-Dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamid (2b)**, C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, reakcijom 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,85 mmol) i odgovarajuće količine imidazola, dobija se 0,249 g **2b**, u prinosu 69,55 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. = 150-151 °C (toluen). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,24 (*d*, 6H, *J*=6,71 Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,93 (*m*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=7,05 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=14,11 Hz, *i*-Pr-CH); 3,50 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=5,64 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=18,11 Hz, ABX); 3,66 (*s*, 6H, -OCH<sub>3</sub>); 4,08 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=7,29 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=18,11 Hz, ABX); 5,66 (*t*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>= 6,35 Hz, ABX); 6,18 (signali slični *t*, 1H, *J*<sub>1,2</sub> =2,35 Hz, amido-*p*-fenil); 6,81 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 6,82 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 7,16 (*s*, 1H, imidazolil-CH-); 7,21 (*s*, 1H, imidazolil-CH-); 7,26 (*d*, 2H, *J*=8,00 Hz aroil-*m*-fenil); 7,64 (*s*, 1H, imidazolil-CH-); 7,84 (*d*, 2H, *J*=7,86 Hz aroil-*o*-fenil); 10,30 (*s*, 1H, amido-NH-). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 23,49; 34,20; 41,73; 55,19; 56,75; 97,17; 98,12; 118,04; 126,83; 128,42; 129,44; 133,57; 137,41; 139,70; 155,60; 160,86; 166,56; 195,84. ESI-MS HR: 422,2074 (M +1), Izr. 422,2080.

***N*-(3,5-Dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)butanamid (3b)**, C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, reakcijom 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,82 mmol) i odgovarajuće količine morfolina, dobija se 0,275 g **3b**, u prinosu 76,01 %, kao blede žuta čvrsta supstanca, t.t. = 155-157 °C (toluen). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,27 (*d*, 6H, *J*=7,46 Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,64 (signali slični *t*, 4H, *J*<sub>1,2</sub>=4,00 Hz, morfolino-CH<sub>2</sub>-); 2,90-3,04 (preklopljeni *m*, 2H, *i*-PrCH i ABX); 3,64-3,86 (preklopljeni *m*, 11H, morfolino-CH<sub>2</sub>-, ABX i -OCH<sub>3</sub>); 4,27 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=5,14 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=7,14 Hz, ABX); 6,23 (signali slični *t*, 1H, *J*<sub>1,2</sub> =2,82 Hz, amido-*p*-fenil); 6,78 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 6,79 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 7,33 (*d*, 2H, *J*=8,46 Hz aroil-*m*-fenil); 7,96 (*d*, 2H, *J*=7,81 Hz aroil-*o*-fenil); 9,22 (*s*, 1H, amido-NH-). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 23,54; 32,10; 34,14; 49,96; 55,30; 65,02; 67,30; 96,45; 97,46; 129,69; 128,45; 134,59; 139,34; 157,74; 161,04; 169,73; 197,74. ESI-MS HR: 441,2389 (M +1), Izr. 441,2389.

***N*-(3,5-Dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-butanamid (4b)**, C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, reakcijom 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,82 mmol) i odgovarajuće količine 4-metilpiperazina, dobija se 0,159 g **4b**, u prinosu 42,68 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. = 120-122 °C, (toluen). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,27 (*d*, 6H, *J*=7,36 Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,32 (*s*, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 2,52 (*br*, 4H, piperazin -CH<sub>2</sub>-); 2,67 (*br*, 4H, piperazin -CH<sub>2</sub>-); 2,93-3,08 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 3,63-3,77 (preklopljeni signali, 7H, ABX i -OCH<sub>3</sub>); 4,34 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=5,10 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=6,86 Hz, ABX); 6,23 (*br*, 1H, amido-*p*-fenil); 6,79 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 6,80 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 7,32 (*d*, 2H, *J*=8,43, aroil-*m*-fenil); 7,96 (*d*, 2H, *J*=8,43, aroil-*o*-fenil); 9,30 (*s*, 1H, amido-NH-). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 23,58; 31,72; 34,16; 45,88; 55,33; 64,56; 96,28; 97,43; 126,65; 128,47; 134,70; 139,49; 154,63; 161,04; 170,04; 197,80. ESI-MS HR: 454,2707 (M +1), Izr. 454,2706.

**N-(4-Izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(R,S)-(1-piperidinil)butanamid (5b)**,  $C_{27}H_{36}N_2O_2$ , reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,74 mmol) i odgovarajuće količine piperidina, dobija se 0,188 g **5b**, u prinosu 59,90 %, kao svetlo žuta čvrsta supstanca, t.t. = 106-108 °C (toluen).  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1,22 (*d*, 6H,  $J=7,30$  Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>-fenilamid); 1,27 (*d*, 6H,  $J=7,30$  Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>-aroil); 1,46 (*m*, 2H, piperidinil -CH<sub>2</sub>-); 1,63 (*m*, 4H, piperidinil -CH<sub>2</sub>-); 2,57 (*m*, 4H, piperidinil -CH<sub>2</sub>-); 2,83-3,00 (preklopljeni *m*, 3H, *i*-PrCH i ABX); 3,71 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=6,74$  Hz,  $J_{1,3}=16,18$  Hz, ABX); 4,26 (*t*, 1H,  $J_{1,2}=5,62$  Hz, ABX); 7,16 (*d*, 2H,  $J=7,86$  Hz amido-*m*-fenil); 7,32 (*d*, 2H,  $J=7,86$  Hz aroil-*m*-fenil); 7,46 (*d*, 2H,  $J=8,41$  Hz amido-*o*-fenil); 7,97 (*d*, 2H,  $J=7,86$  Hz aroil-*o*-fenil); 9,39 (*s*, 1H, amido -NH-).  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 23,58; 23,94; 26,69; 31,87; 33,49; 34,14; 51,02; 66,78; 95,70; 119,31; 126,61; 126,76; 128,49; 134,95; 135,55; 144,55; 154,38; 170,38; 198,37. ESI-MS HR: 421,2838 (M +1), Izr. 421,2855.

**N-(4-Izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(R,S)-(1-imidazolil)butanamid (6b)**,

$C_{25}H_{29}N_3O_2$ , reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,74 mmol) i odgovarajuće količine imidazola, dobija se 0,251 g **6b**, u prinosu 83,35 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. = 164-165 °C (toluen).  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1,17 (*d*, 6H,  $J=7,45$  Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>-fenilamid); 1,24 (*d*, 6H,  $J=6,09$  Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>-aroil); 2,75-3,01 (preklopljeni *m*, 2H, *i*-PrCH); 3,49 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=5,65$  Hz,  $J_{1,3}=18,12$  Hz, ABX); 4,10 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=7,13$  Hz,  $J_{1,3}=17,24$  Hz, ABX); 5,65 (*t*, 1H,  $J_{1,2}=6,24$  Hz, ABX); 7,09 (*d*, 2H,  $J=8,48$  Hz, amido-*m*-fenil); 7,14 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 7,21 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 7,27 (*d*, 2H,  $J=8,47$ , aroil-*m*-fenil); 7,45 (*d*, 2H,  $J=8,48$  Hz, amido-*o*-fenil); 7,62 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 7,85 (*d*, 2H,  $J=8,47$ , aroil-*o*-fenil); 9,97 (*s*, 1H, amido -NH-).  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 22,53; 23,91; 33,50; 34,21; 41,75; 56,68; 95,73; 118,02; 120,19; 126,76; 128,42; 129,55; 133,66; 135,50; 137,41; 145,31; 155,53; 166,36; 195,82. ESI-MS HR: 404,2337 (M +1), Izr. 404,2338.

**N-(4-Izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(R,S)-(4-morfolinil)butanamid (7b)**,

$C_{26}H_{34}N_2O_3$ , reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,89 mmol) i odgovarajuće količine morfolina, dobija se **7b**, u kvantitativnom prinosu, kao žuta polučvrsta supstanca.  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1,22 (*d*, 6H,  $J=6,69$  Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>-fenilamid); 1,26 (*d*, 6H,  $J=7,31$  Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>-aroil); 2,64 (signali slični *t*, 4H,  $J=4,26$  Hz morfolinil-CH<sub>2</sub>-); 2,79-3,06 (preklopljeni *m*, 3H, ABX i *i*-Pr-CH); 3,66-3,77 (preklopljeni *m*, 5H, ABX i morfolinil-CH<sub>2</sub>-); 4,27 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=5,18$  Hz,  $J_{1,3}=9,44$  Hz, ABX); 7,16 (*d*, 2H,  $J=8,83$  Hz, amido-*m*-fenil); 7,31 (*d*, 2H,  $J=7,62$ , aroil-*m*-fenil); 7,44 (*d*, 2H,  $J=8,22$  Hz, amido-*o*-fenil); 7,96 (*d*, 2H,  $J=8,52$ , aroil-*o*-fenil); 9,16 (*s*, 1H, amido -NH-).  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 23,56; 23,93; 32,14; 33,47; 34,16; 50,00; 65,15; 67,31; 95,70; 119,44; 126,69; 126,83; 128,49; 135,24; 144,89; 154,69; 169,55; 197,86. ESI-MS HR: 423,2642 (M +1), Izr. 423,2648.

**N-(4-Izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(R,S)-[1-(4-metilpiperazinil)]-**

**butan-amid (8b)**,  $C_{27}H_{37}N_3O_2$ , reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-

okso-2-butenske kiseline (0,89 mol) i odgovarajuće količine 1-metilpiperazina, dobija se 0,145 g **8b**, u kvantitativnom prinosu, kao žuta polučvrsta supstanca. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,22 (*d*, 6H, *J*=7,01 Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>-fenilamid); 1,26 (*d*, 6H, *J*=7,01 Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>-aroil); 2,31 (*s*, 3H, piperazin-CH<sub>3</sub>); 2,87 (*m*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=6,72 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=13,83 Hz, *i*-PrCH); 2,87 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 2,53 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,68 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 3,70 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=7,29 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=16,34 Hz, ABX); 4,33 (signali slični *t*, *J*<sub>1,2</sub>=7,04 Hz, ABX); 7,16 (*d*, 2H, *J*=8,30 Hz, amido-*m*-fenil); 7,31 (*d*, 2H, *J*=8,30 Hz, aroil-*m*-fenil); 7,45 (*d*, 2H, *J*=8,80 Hz, amido-*o*-fenil); 7,95 (*d*, 2H, *J*=8,05, aroil-*o*-fenil); 9,21 (*s*, 1H, amido – NH). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 26,63; 23,99; 31,87; 33,55; 34,22; 45,94; 55,62; 64,80; 119,40; 126,66; 126,82; 128,50; 134,87; 135,41; 144,78; 154,54; 169,81; 198,01. ESI-MS HR: 436,2965 (M +1), Izr. 436,2964.

**N-Cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(R,S)-(1-piperidinil)butanamid (9b)**, C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reakcijom cikloheksilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,83 mmol) i odgovarajuće količine piperidina, dobija se 0,160 g **9b**, u prinosu 49,74 %, kao žuta polučvrsta supstanca. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,25 (*d*, 6H, *J*=6,71 Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,14-1,45 (preklopljeni *m*, 8H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-, piperidinil-CH<sub>2</sub>-); 1,54-1,66 (preklopljeni *m*, 6H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-, piperidinil -CH<sub>2</sub>-); 1,78-3,77 (*br*, 2H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-); 2,50 (signali slični *t*, 4H, *J*=5,97 Hz, piperidinil-CH<sub>2</sub>-); 2,84 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=5,11 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=16,48 Hz, ABX); 2,95 (*m*, 1H, *i*-PrCH); 3,63 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=7,39 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=16,19 Hz, ABX); 3,77 (*m*, 1H, cikloheksil -CH-); 4,06 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=5,69 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=9,66 Hz, ABX); 7,30 (*d*, 2H, *J*=7,96 Hz, aroil-*m*-fenil); 7,95 (*d*, 2H, *J*=8,24 Hz, aroil-*o*-fenil); 6,83 (*d*, 1H, *J*=13,14 Hz, amido-NH); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 23,58; 24,02; 24,60; 25,49; 26,60; 32,05; 32,90; 33,12; 34,14; 47,50; 50,91; 65,58; 126,56; 128,47; 135,26; 154,14; 171,06. ESI-MS HR: 385,2855 (M +1), Izr. 385,2842.

**N-Cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(R,S)-(1-imidazolil)butanamid (10b)**, C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, reakcijom cikloheksilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,83 mol) i odgovarajuće količine imidazola, dobija se 0,148 g **10b**, u prinosu 48,14 %, kao narandžasta polučvrsta supstanca. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,06-1,41 (*m*, 6H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 1,25 (*d*, 6H, *J*=7,28 Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,61 (*m*, 2H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-); 1,83 (*br*, 2H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-); 2,95 (*m*, 1H, *i*-PrCH); 3,49 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=6,68 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=17,91 Hz, ABX); 3,72 (*m*, 1H, cikloheksil-CH-); 4,02 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=6,67 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=17,90 Hz, ABX); 5,45 (signali slični *t*-, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=6,68 Hz, ABX); 6,65 (*d*, 1H, *J*=7,86 Hz, amido-NH); 7,07 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 7,12 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 7,30 (*d*, 2H, *J*=8,50 Hz, aroil-*m*-fenil); 7,71 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 7,86 (*d*, 2H, *J*=8,49 Hz, aroil-*o*-fenil); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 23,51; 24,60; 25,24; 32,48; 34,20; 41,61; 48,82; 56,39; 117,97; 126,81; 128,36; 129,31; 133,75; 137,28; 155,47; 167,34; 195,67. ESI-MS HR: 368,2336 (M +1), Izr. 368,2338.

**N-Cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(R,S)-(4-morfolinil)butanamid (11b)**, C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, reakcijom cikloheksilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,94 mmol) i odgovarajuće količine morfolina, dobija se 0,131 g **11b**, u prinosu 35,92 %, kao bledo narandžasta čvrsta supstanca, t.t. = 93-95 °C (toluen). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz,

CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,09 (*br*, 6H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-); 1,26 (*d*, 6H,  $J=11,26$  Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,64 (*br*, 2H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-); 1,86 (*br*, 2H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-); 2,58 (*t*, 4H,  $J_{1,2}=4,57$  Hz, morfolino -CH<sub>2</sub>-); 2,86-2,99 (preklopljeni *m*, 2H, *i*-PrCH i ABX); 3,59-3,76 (preklopljeni *m*, 6H, ABX, morfolino -CH<sub>2</sub>-, i cikloheksil -CH-); 4,07 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=5,10$  Hz,  $J_{1,3}=7,84$  Hz, ABX); 7,05 (*d*, 1H,  $J=7,84$  Hz, amido-NH-); 7,31 (*d*, 2H,  $J=8,43$ , aroil-*m*-fenil); 7,94 (*d*, 2H,  $J=8,43$ , aroil-*o*-fenil). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 23,60; 24,66; 25,46; 32,43; 32,92; 33,21; 34,20; 47,74; 50,02; 64,97; 67,31; 126,67; 128,47; 135,01; 154,49; 170,20; 198,31. ESI-MS HR: 387,2639 (M +1), Izr. 387,2648.

**N-Cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(R,S)-[1-(4-metilpiperazinil)butanamid (12b)**, C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, reakcijom cikloheksilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,83 mmol) i odgovarajuće količine 1-metilpiperazina, dobija se 0,045 g **12b**, u prinosu 13,46 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. = 101-103 °C (toluen). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,12-1,39 (*br*, 6H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-); 1,25 (*d*, 6H,  $J=6,97$  Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,56-1,64 (*br*, 2H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-); 1,86 (*br*, 2H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>-); 2,30 (*s*, 3H, -N-CH<sub>3</sub>); 2,42-2,51 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,60 (*d*-like, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,83-2,99 (preklopljeni *m*, 2H, *i*-Pr-CH, ABX); 3,63 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=7,94$  Hz,  $J_{1,3}=16,21$  Hz, ABX); 3,77 (*br*, 1H, cikloheksil -CH-); 4,14 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=5,16$  Hz,  $J_{1,3}=8,44$  Hz, ABX); 7,11 (*d*-like, 1H,  $J=8,21$  Hz, amido-NH); 7,30 (*d*, 2H,  $J=8,44$  Hz aroil-*m*-fenil); 7,93 (*d*, 2H,  $J=8,44$  Hz aroil-*o*-fenil); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 23,56; 24,58; 25,42; 31,90; 32,87; 33,14; 34,12; 45,81; 47,56; 55,42; 64,51; 126,54; 128,42; 135,06; 154,25; 170,40; 198,48. ESI-MS HR: 400,2959 (M +1), Izr. 400,2964.

**4-(2,4-Diizopropilfenil)-N-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(R,S)-(1-piperidinil)butanamid (13b)**, C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, reakcijom (3,5-dimetoksifenil)amida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,76 mol) i odgovarajuće količine piperidina, dobija se **13b**, u kvantitativnom prinosu, kao narandžasta čvrsta supstanca, t.t. = 99-101 °C, (toluen). <sup>1</sup>H NMR: (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,21-1,29 (preklopljeni *m*, 12H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,52 (*m*, 2H, piperidino-CH<sub>2</sub>-); 1,66 (*m*, 4H, piperidino-CH<sub>2</sub>-); 2,55 (*m*, 4H, piperidino-CH<sub>2</sub>-); 2,87-2,96 (preklopljeni *m*, 2H, *i*-PrCH i ABX); 3,45-3,52 (preklopljeni *m*, 2H, *i*-PrCH i ABX); 3,77 (*s*, 6H, -OCH<sub>3</sub>); 4,20 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=4,69$  Hz,  $J_{1,3}=8,04$  Hz, ABX); 6,22 (*t*, 1H,  $J=2,07$  Hz, amido-*p*-fenil); 6,79 (*s*, 2H, amido-*o*-fenil); 7,26-7,27 (preklopljeni *d* i *s*, 2H, aroil-*m*-fenil); 7,63 (*d*, 1H,  $J=7,79$  Hz, aroil-*o*-fenil); 9,37 (*s*, 1H, amido -NH-). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 22,85; 23,16; 23,75; 23,95; 24,42; 26,73; 29,13; 34,26; 35,99; 44,50; 55,35; 66,27; 96,37; 97,39; 98,68; 123,16; 124,72; 127,97; 136,51; 139,64; 148,34; 152,00; 161,05; 170,57; 203,13. ESI-MS HR: 481,3075 (M +1), Izr. 481,3066.

**4-(2,4-Diizopropilfenil)-N-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(R,S)-(1-imidazolil)butanamid (14b)**, C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, reakcijom (3,5-dimetoksifenil)amida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,89 mmol) i odgovarajuće količine imidazola, dobija se 0,220 g **14b**, u prinosu 52,94 %, kao narandžasta čvrsta supstanca, t.t. = 103-105 °C (toluen). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,11-1,26 (preklopljeni *m*, 12H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,91 (*m*, 1H,  $J_{1,2}=8,69$  Hz,  $J_{1,3}=14,28$  Hz, *i*-Pr-CH); 3,31-3,50 (preklopljeni *m*, 2H, *i*-PrCH and ABX); 3,68 (*s*, 6H, -



OCH<sub>3</sub>); 3,98 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=7,45$  Hz,  $J_{1,3}=18,25$  Hz, ABX); 5,66 (*t*, 1H,  $J_{1,2}=7,19$  Hz, ABX); 6,20 (*br*, 1H, amido-*p*-fenil); 6,81 (*s*, 1H, amido-*m*-fenil); 6,82 (*s*, 1H, amido-*m*-fenil); 7,01-7,10 (preklopljeni signali, 2H, aroil-*m*-fenil); 7,17 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 7,24 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 7,48 (*d*, 1H,  $J=8,39$ , aroil-*o*-fenil); 7,70 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 9,85 (*s*, 1H, amido -NH-). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 23,62; 23,96; 28,99; 34,27; 45,08; 55,24; 57,19; 97,21; 98,30; 117,97; 123,43; 124,92; 128,38; 128,93; 134,42; 137,41; 139,56; 148,99; 153,21; 160,92; 166,44; 200,50. ESI-MS HR: 464,2532 (M +1), Izr. 464,2549.

**4-(2,4-Diizopropilfenil)-N-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(R,S)-(4-morfolinil)butanamid (15b)**, C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, reakcijom (3,5-dimetoksifenil)amida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (1,00 mmol) i odgovarajuće količine morfolina, dobija se 0,235 g **15b**, u prinosu 48,08 %, kao narandžasta čvrsta supstanca, t.t. = 126-128 °C (toluen). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,23-1,29 (preklopljeni *m*, 12H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,64 (signali slični *t*, 4H,  $J_{1,2}=3,90$  Hz, morfolino-CH<sub>2</sub>-); 2,88-2,98 (preklopljeni *m*, 2H, ABX and *i*-PrCH); 3,41-3,65 (overlapped *m*, 2H, ABX and *i*-PrCH); 3,77 (preklopljeni signali, 10H, -OCH<sub>3</sub>, imorfolino-CH<sub>2</sub>-); 4,24 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=3,89$  Hz,  $J_{1,3}=7,24$  Hz, ABX); 6,23 (*br*, 1H, amido-*p*-fenil); 6,80 (*s* *br*, 2H, amido-*o*-fenil); 7,12 (*d*, 1H,  $J=8,08$ , aroil-*m*-fenil); 7,28 (*s*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,65 (*d*, 1H,  $J=7,79$ , aroil-*o*-fenil); 9,22 (*s*, 1H, amido -NH-). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 23,69; 24,14; 24,33; 29,11; 34,23; 36,01; 43,72; 49,98; 55,31; 64,71; 65,66; 67,31; 96,50; 97,44; 103,18; 123,23; 124,77; 128,01; 136,19; 139,38; 148,42; 152,25; 161,08; 169,67; 179,76; 194,87; 196,56; 202,57. ESI-MS HR: 483,2845 (M +1), Izr. 483,2859.

**4-(2,4-Diizopropilfenil)-N-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(R,S)-[1-(4-metilpiperazinil)]butanamid (16b)**, C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, reakcijom (3,5-dimetoksifenil)amida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (1,00 mmol) i odgovarajuće količine 1-metilpiperazina, dobija se 0,298 g **16b**, u prinosu 59,37 %, kao narandžasta čvrsta supstanca, t.t. = 109-111 °C (toluen). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,23-1,29 (preklopljeni *m*, 12H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,33 (*s*, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 2,57 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,67 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,85-2,96 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 3,42-3,58 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 3,78 (*s*, 6H, -OCH<sub>3</sub>); 4,28 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=4,59$  Hz,  $J_{1,3}=8,52$  Hz, ABX); 6,23 (signali slični *t*, 1H,  $J_{1,2}=2,24$  Hz, amido-*p*-fenil); 6,79 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 6,80 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 7,11 (*d*, 1H,  $J=8,11$ , aroil-*m*-fenil); 7,27 (*s*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,64 (*d*, 1H,  $J=8,12$ , aroil-*o*-fenil); 9,22 (*s*, 1H, amido -NH-). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 23,71; 24,18; 24,31; 29,12; 34,21; 35,83; 45,85; 55,33; 55,50; 65,20; 96,32; 97,45; 123,31; 124,70; 128,03; 163,35; 139,49; 148,32; 152,10; 161,04; 169,96; 202,81. ESI-MS HR: 496,3166 (M +1), Izr. 496,3170.

**(2,4-Diizopropilfenil)-N-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(R,S)-(1-piperidinil)butanamid (17b)**, C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,79 mmol) i odgovarajuće količine piperidina, dobija se 0,160 g **17b**, u prinosu 43,46%, kao narandžasta polučvrsta supstanca. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,20-1,30 (preklopljeni *d*, 18H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,47 (*br*, 2H, piperidinil-CH<sub>2</sub>-); 1,63 (*br*, 4H, piperidinil-CH<sub>2</sub>-); 2,56 (signali slični *t*, 4H,  $J=14,06$  Hz, piperidinil-CH<sub>2</sub>-); 2,83-2,95

(preklopljeni *m*, 3H, ABX i *i*-PrCH); 3,41-3,60 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 4,21 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=8,96$  Hz,  $J_{1,3}=17,91$  Hz, ABX); 7,09 (*d*, 1H,  $J=8,95$  Hz, aroil-*m*-fenil); 7,17 (*d*, 2H,  $J=7,68$  Hz, amido-*m*-fenil); 7,27 (*s*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,46 (*d*, 2H,  $J=8,96$  Hz, amido-*o*-fenil); 7,66 (*d*, 1H,  $J=8,96$  Hz, aroil-*o*-fenil); 9,32 (*s*, 1H, amido-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 23,71; 23,96; 24,18; 24,36; 26,69; 29,13; 33,52; 34,21; 36,13; 51,07; 66,06; 119,35; 123,19; 124,63; 126,80; 128,11; 135,61; 144,58; 148,26; 151,94; 170,35; 203,30. ESI-MS HR: 463,3322 (M +1), Izr. 463,3319.

#### 4-(2,4-Diizopropilfenil)-*N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)-

butanamid (**18b**),  $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_2$ , reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,79 mmol) i odgovarajuće količine imidazola, dobija se **18b**, u kvantitativnom prinosu, kao narandžasta polučvrsta supstanca.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,12-1,25 (preklopljeni *d*, 18H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,83-2,92 (preklopljeni *m*, 2H, *i*-Pr-CH); 3,36 (signali slični *t*, 1H,  $J_{1,2}=6,71$  Hz, *i*-Pr-CH); 3,46 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=5,25$  Hz,  $J_{1,3}=17,44$  Hz, ABX); 4,00 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=6,15$  Hz,  $J_{1,3}=17,89$  Hz, ABX); 5,69 (*br*, 1H, ABX); 7,08 (*d*, 1H,  $J=7,71$  Hz, aroil-*m*-fenil); 7,12 (*d*, 2H,  $J=8,05$  Hz, amido-*m*-fenil); 7,17 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 7,24 (*s br*, 1H, imidazolil-CH); 7,26 (*s*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,44 (*d*, 2H,  $J=7,49$  Hz, amido-*o*-fenil); 7,48 (*d*, 1H,  $J=8,05$  Hz, aroil-*o*-fenil); 7,77 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 9,32 (*s*, 1H, amido -NH-);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 23,68; 23,95; 24,07; 29,08; 33,58; 34,31; 45,12; 57,18; 117,93; 120,26; 123,51; 124,93; 126,81; 128,31; 134,48; 135,17; 145,53; 148,96; 153,18; 166,18; 200,44. ESI-MS HR: 446,2806 (M +1), Izr. 446,2808.

#### 4-(2,4-Diizopropilfenil)-*N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-

morfolinil)butanamid (**19b**),  $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3$ , reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,79 mmol) i odgovarajuće količine morfolina, dobija se **19b**, u kvantitativnom prinosu, kao narandžasta polučvrsta supstanca.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,23-1,30 (preklopljeni *d*, 18H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,64 (signali slični *t*, 4H, morfolino-CH<sub>2</sub>-); 2,84-2,97 (preklopljeni *m*, 3H, ABX i *i*-PrCH); 3,40-3,64 (preklopljeni *m*, 2H, *i*-PrCH i ABX); 3,77 (*br*, 4H, morfolino-CH<sub>2</sub>-); 4,24 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=4,43$  Hz,  $J_{1,3}=8,07$  Hz, ABX); 7,09-7,13 (signali slični *d*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,18 (*d*, 2H,  $J=8,41$  Hz,  $J=8,41$ , amido-*m*-fenil); 7,28 (*s*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,46 (*d*, 2H,  $J=8,41$  Hz, amido-*o*-fenil); 7,65 (*d*, 1H,  $J=7,84$ , aroil-*o*-fenil); 9,16 (*s*, 1H, amido-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 23,69; 23,94; 24,18; 24,29; 29,15; 33,50; 34,21; 36,20; 50,02; 65,44; 67,31; 119,42; 123,25; 124,70; 126,85; 128,13; 128,98; 135,30; 136,21; 144,89; 148,35; 152,19; 169,45; 202,72. ESI-MS HR: 465,3114 (M +1), Izr. 465,3117.

#### 4-(2,4-Diizopropilfenil)-*N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-

butanamid (**20b**),  $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_2$ , reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,79 mmol) i odgovarajuće količine 1-metilpiperazina, dobija se **20b**, u kvantitativnom prinosu, kao narandžasta polučvrsta supstanca.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,21-1,29 (preklopljeni *d*, 18H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,32 (*s*, 3H, N-CH<sub>3</sub>); 2,53 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,67 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,80-2,97

(preklopljeni *m*, 3H, ABX i *i*-PrCH); 3,38-3,61 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 4,28 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=4,53$  Hz,  $J_{1,3}=7,76$  Hz, ABX); 7,07-7,12 (signali slični *d*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,17 (*d*, 2H,  $J=8,57$  Hz, amido-*m*-fenil); 7,26 (*s*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,46 (*d*, 2H,  $J=8,57$  amido-*o*-fenil); 7,63 (*d*, 1H,  $J=8,20$  Hz, aroil-*o*-fenil); 9,16 (*s*, 1H, amido -NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 23,71; 23,96; 24,22; 24,29; 29,17; 33,50; 34,21; 36,00; 45,88; 55,52; 65,02; 119,39; 123,25; 124,63; 126,83; 128,18; 135,43; 136,39; 144,75; 148,24; 152,05; 169,75; 202,97. ESI-MS HR: 478,3429 ( $M + 1$ ), Izr. 478,3428.

***N*-Cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamid**

(**21b**),  $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_2$ , reakcijom cikloheksilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,88 mmol) i odgovarajuće količine piperidina, dobija se 0,151 g **21b**, u prinosu 40,22 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. = 105-107 °C (toluen).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,09-1,46 (preklopljeni *m*, 8H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ - i piperidinil- $\text{CH}_2$ -); 1,22-1,28 (preklopljeni *d*, 12H, *i*-Pr $\text{CH}_3$ ); 1,54-1,70 (preklopljeni *m*, 6H, piperidinil- $\text{CH}_2$ - i cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 1,84 (*br*, 2H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 2,47 (*t*-like, 4H,  $J=6,97$ Hz, piperidinil- $\text{CH}_2$ -); 2,97 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=4,65$  Hz,  $J_{1,3}=16,27$  Hz, ABX); 2,91 (*m*, 1H, *i*-PrCH); 3,35-3,53 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 3,74 (*m*, 1H, cikloheksil-CH); 4,03 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=4,59$  Hz,  $J_{1,3}=17,91$  Hz, ABX); 7,09 (*d*, 1H,  $J=7,83$ Hz, aroil-*m*-fenil); 7,24 (*s*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,66 (*d*, 1H,  $J=7,83$ Hz, aroil-*o*-fenil); i 6,75 (*d*, 1H,  $J=13,78$  Hz, amido-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,31; 22,43; 23,71; 24,00; 24,18; 24,31; 24,58; 25,47; 26,53; 29,12; 32,88; 33,14; 34,18; 36,36; 44,43; 47,41; 50,89; 65,33; 95,73; 123,17; 124,47; 128,14; 136,70; 170,96; 203,83. ESI-MS HR: 427,3323 ( $M + 1$ ), Izr. 427,3325.

***N*-Cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamid (**22b**),**

$\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_2$ , reakcijom cikloheksilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,88 mmol) i odgovarajuće količine imidazola, dobija se 0,170 g **22b**, u prinosu 47,17 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. = 123-125 °C (toluen).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,04-1,35 (preklopljeni *m*, 6H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 1,12-1,26 (preklopljeni *d*, 12H, *i*-Pr $\text{CH}_3$ ); 1,53-1,69 (*br*, 2H, cikloheksil - $\text{CH}_2$ -); 1,83 (*br*, 2H, cikloheksil - $\text{CH}_2$ -); 2,91 (*m*, 1H,  $J_{1,2}=6,67$  Hz,  $J_{1,3}=13,34$  Hz, *i*-Pr-CH); 3,25-3,45 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i -*i*-PrCH); 3,73 (*m*, 1H, cikloheksil-CH); 3,96 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=6,19$  Hz,  $J_{1,3}=17,98$  Hz, ABX); 5,40 (*t*, 1H,  $J_{1,2}=6,67$  Hz, ABX); 6,32 (*s br*, 1H, amido-NH-); 7,06-7,11 (preklopljeni *m*, 2H, aroil-*m*-fenil i imidazolil-CH); 7,24 (signali slični *d*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,46 (*d*, 1H,  $J=7,81$ , aroil-*o*-fenil); 7,57 (*s*, 1H, imidazolil-CH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 26,62; 23,94; 24,04; 24,62; 25,24; 29,01; 32,48; 34,23; 45,19; 48,80; 56,64; 95,73; 117,73; 123,39; 124,85; 128,13; 130,09; 134,70; 137,43; 148,72; 153,01; 167,34; 200,70. ESI-MS HR: 410,2813 ( $M + 1$ ), Izr. 410,2802

***N*-Cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)butanamid (**23b**),**

$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3$ , reakcijom cikloheksilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (1,00 mmol) i odgovarajuće količine morfolina, dobija se 0,372 g **23b**, u prinosu 84,55 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. = 142-144 °C, (toluen).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,11-1,41 (*br*, 6H, cikloheksil - $\text{CH}_2$ -); 1,23-1,29 (preklopljeni *d*, 12H, *i*-Pr $\text{CH}_3$ ); 1,65 (*br*, 2H, cikloheksil - $\text{CH}_2$ -); 1,86 (*br*, 2H, cikloheksil - $\text{CH}_2$ -); 2,56 (*t*-like, 4H,  $J_{1,2}=4,40$

Hz, morfolino-CH<sub>2</sub>); 2,78-2,95 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 3,35-3,58 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 3,72 (signali slični *q*, 4H,  $J_{1,2}=3,64$  Hz,  $J_{1,3}=8,80$  Hz, morfolino-CH<sub>2</sub>); 3,79 (*m*, 1H, cikloheksil-CH); 4,05 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=4,43$  Hz,  $J_{1,3}=8,07$  Hz, ABX); 7,07-7,12 (preklopljeni *m*, aroil-*m*-fenil i amido-NH); 7,24 (*br*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,64 (*d*, 1H,  $J=7,81$ , aroil-*o*-fenil); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 23,71; 24,22; 24,29; 24,64; 25,46; 29,19; 32,92; 33,25; 34,21; 36,62; 47,67; 49,96; 64,78; 67,26; 123,26; 124,57; 128,18; 136,41; 148,12; 152,03; 170,09; 203,21. ESI-MS HR: 429,3123 (M +1), Izr. 429,3112.

#### ***N*-Cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]**

**butanamid (24b)**, C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, reakcijom cikloheksilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (1,00 mmol) i odgovarajuće količine 1-metilpiperazina, dobija se 0,256 g **24b**, u prinosu 56,47 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. = 96-98 °C, (toluen). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,15-1,39 (*br*, 6H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>); 1,22-1,27 (preklopljeni *d*, 12H, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,65 (*br*, 2H, cikloheksil -CH<sub>2</sub>); 1,86 (*br*, 2H, cikloheksil -CH); 2,33 (*s*, 3H, piperazin-*N*-CH<sub>3</sub>); 2,52 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>); 2,60 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>); 2,76-2,96 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 3,34-3,55 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 3,76 (*m*, 1H, cikloheksil-CH); 4,10 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=4,50$  Hz,  $J_{1,3}=9,00$  Hz, ABX); 7,04-7,11 (preklopljeni *m*, aroil-*m*-fenil i cikloheksil-NH); 7,24 (*s*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,64 (*d*, 1H,  $J=8,04$ , aroil-*o*-fenil); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 23,67; 24,18; 24,58; 25,42; 29,15; 32,87; 33,18; 34,16; 36,36; 45,68; 47,56; 55,32; 64,31; 123,31; 124,43; 128,14; 136,54; 147,91; 151,81; 170,26; 203,41. ESI-MS HR: 442,3436 (M +1), Izr. 442,3428.

#### ***N*-(3,5-Dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)-4-(5,6,7,8-**

**tetrahidronaftalenil)-butanamid (25b)**, C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, reakcijom 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (0,82 mmol) i odgovarajuće količine piperidina, dobija se 0,239 g **25b**, u prinosu 64,61%, kao blede žuta čvrsta supstanca, t.t. = 135 °C (toluen). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,48 (signali slični *q*, 2H, piperidinil-CH<sub>2</sub>); 1,65 (signali slični *q*, 4H, piperidinil-CH<sub>2</sub>); 1,81 (*br*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>); 2,57 (signali slični *t*, 4H, piperidinil-CH); 2,82 (*br*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>); 3,00 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,06$ ,  $J_{1,3} = 16,85$ , ABX); 3,68 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 7,30$ ,  $J_{1,3} = 17,41$ , ABX); 3,77 (*s*, 6H, -OCH<sub>3</sub>); 4,25 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,06$ ,  $J_{1,3} = 6,74$ , ABX); 6,22 (signali slični *t*, 1H, amido-*p*-fenil); 6,79 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 6,80 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 7,15 (*d*, 1H,  $J = 8,99$ , aroil-*m*-fenil); 7,73 (*m*, 2H, aroil-*o*-fenil); 7,74 (*m*, 2H, aroil-*o*-fenil); 9,48 (*s*, 1H, -NH-amid). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 22,34; 22,54; 22,76; 22,89; 23,89; 26,73; 29,32; 29,55; 31,92; 44,50; 51,04; 55,33; 65,57; 96,34; 97,37; 125,30; 129,14; 129,31; 134,42; 137,39; 139,65; 143,16; 161,06; 170,71; 198,40. ESI-MS HR: 451,2594 (M +1), Izr. 451,2591.

***N*-(3,5-Dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-butanamid (26b)**, C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, reakcijom 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (0,82 mmol) i odgovarajuće količine imidazola, dobija se 0,279 g **26b**, u prinosu 78,49 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. = 166 °C. <sup>1</sup>H NMR: (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,80 (*br*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>); 2,78 (*br*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>); 3,48 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,33$ ,  $J_{1,3} = 17,69$ , ABX); 3,73 (*s*, 6H, -OCH<sub>3</sub>); 4,07 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 7,58$ ,  $J_{1,3}$

= 17,41, ABX); 5,58 (signali slični *t*, 1H, ABX); 6,17 (*sb*, 1H, amido-*p*-fenil); 6,76 (*sb*, 2H, amido-*o*-fenil); 6,98 (*s*, 1H, imidazolil-CH); 7,07 (*d*, 1H,  $J=8,43\text{Hz}$ , aroil-*m*-fenil); 7,17(*s*, 1H, imidazolil-CH); 7,58 (*br*, 2H, aroil-*o*-fenil); 7,77 (*s*, 1H, imidazolil-CH-); 9,99 (*s*, 1H, amido-NH-).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,47; 22,62; 29,08; 29,46; 41,41; 55,10; 56,63; 96,95; 98,05; 117,87; 124,98; 128,80; 128,94; 129,40; 133,06; 136,94; 137,59; 139,40; 144,27; 160,75; 196,22. ESI-MS HR: 434,2084 (M +1), Izr. 434,2074.

***N*-(3,5-Dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)-4-(5,6,7,8-**

**tetrahidronaftalenil)butanamid (27b)**,  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$ , reakcijom 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (1,00 mmol) i odgovarajuće količine morfolina, dobija se 0,261 g **27b**, u prinosu 52,69 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. = 179-181 °C (toluen).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,81 (*br*, 4H, tetralinoil- $\text{CH}_2$ -); 2,65 (signali slični *t*, 4H,  $J_{1,2}=4,41$  Hz, morfolino- $\text{CH}_2$ -); 2,81 (*br*, 4H, tetralinoil- $\text{CH}_2$ -); 3,04 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=4,99$  Hz,  $J_{1,3}=16,75$  Hz, ABX); 3,64-3,89 (preklopljeni signali, 11H, ABX,  $-\text{OCH}_3$  i morfolino  $-\text{CH}_2$ -); 4,24 (signali slični *t*, 1H,  $J_{1,2}=5,06$  Hz, ABX); 6,23 (signali slični *t*, 1H,  $J_{1,2}=2,29$  Hz, amido-*p*-fenil); 6,78 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 6,79 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 7,15 (*d*, 1H,  $J=9,00$  Hz aroil-*m*-fenil); 7,72 (*br*, 2H, aroil-*o*-fenil); 9,22 (*s*, 1H, amido -NH-).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,73; 22,87; 29,32; 29,57; 32,16; 50,02; 55,35; 66,02; 67,35; 95,73; 96,48; 97,46; 125,27; 129,14; 129,38; 134,21; 137,48; 139,40; 143,42; 161,08; 169,82; 197,86. ESI-MS HR: 453,2387 (M +1), Izr. 453,2389.

***N*-(3,5-Dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-4-(5,6,7,8-tetrahidro-**

**naftalenil)butanamid (28b)**,  $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$ , reakcijom 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (0,82 mmol) i odgovarajuće količine 1-metilpiperazina, dobija se 0,247 g **28b**, u prinosu 64,42 %, kao blede žuta čvrsta supstanca, t.t. = 106-108 °C (toluen).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,81 (*br*, 4H, tetralinoil- $\text{CH}_2$ -); 2,34 (*s*, 3H, piperazin-*N*- $\text{CH}_3$ -); 2,55 (*br*, 4H, piperazin- $\text{CH}_2$ -); 2,69 (*br*, 4H, piperazin- $\text{CH}_2$ -); 2,81 (*br*, 4H, tetralinoil- $\text{CH}_2$ -); 3,03 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=4,96$  Hz,  $J_{1,3}=17,37$  Hz, ABX); 3,67 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=7,14$  Hz,  $J_{1,3}=17,37$  Hz, ABX); 3,77 (*s*, 6H,  $-\text{OCH}_3$ ); 4,31 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=4,96$  Hz,  $J_{1,3}=9,31$  Hz, ABX); 6,23 (*br*, 1H, amido-*p*-fenil); 6,79 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 6,80 (*s*, 1H, amido-*o*-fenil); 7,14 (*d*, 1H,  $J=8,57$  Hz, aroil-*m*-fenil); 7,71-7,73 (preklopljeni signali, 2H, aroil-*o*-fenil); 9,29 (*s*, 1H, amido-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,73; 22,87; 29,30; 29,55; 31,86; 45,76; 55,35; 55,50; 64,51; 96,30; 97,50; 125,25; 129,14; 129,33; 134,30; 137,41; 139,52; 143,31; 161,06; 170,07; 198,04. ESI-MS HR: 466,2707 (M +1), Izr. 466,2706.

***N*-(4-Izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-**

**butanamid (29b)**  $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2$ , reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (0,86 mmol) i odgovarajuće količine piperidina, dobija se 0,373 g **29b**, u kvantitativnom prinosu, kao žuta polučvrsta supstanca.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,22 (*d*, 6H,  $J = 7,09$ , 4-*i*-Pr $\text{CH}_3$ ); 1,47 (*q*, 2H,  $J_{1,2} = 5,38$ ,  $J_{1,3} = 10,75$ , piperidinil- $\text{CH}_2$ -); 1,64 (*q*, 4H,  $J_{1,2} = 5,37$ ,  $J_{1,3} = 10,75$ , piperidinil- $\text{CH}_2$ -); 1,80 (*br*, 4H, tetralinoil- $\text{CH}_2$ -); 2,57 (*t*, 4H,  $J_{1,2} = 5,07$ , piperidinil- $\text{CH}_2$ -); 2,80 (*br*, 5H, tetralinoil- $\text{CH}_2$ - i 4-*i*-Pr-CH); 2,96 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,02$ ,  $J_{1,3} = 19,07$ , ABX); 3,68 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 6,91$ ,  $J_{1,3} = 16,57$ ,

ABX); 4,25 (*t*, 1H,  $J_{1,2} = 5,56$ , ABX); 7,14 (*d*, 1H,  $J = 8,51$ , aroil-*m*-fenil); 7,16 (*d*, 2H,  $J = 8,06$ , amido-*m*-fenil); 7,46 (*d*, 1H,  $J = 8,51$ , amido-*o*-fenil); 7,73 (*s*, 1H, aroil-*o*-fenil); 7,76 (*s*, 1H, aroil-*o*-fenil); 9,40 (*s*, 1H, amido -NH-).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,76; 22,89; 23,94; 26,69; 29,30; 29,53; 31,96; 33,49; 51,04; 65,71; 95,70; 119,29; 125,30; 126,76; 129,13; 134,53; 135,57; 137,34; 143,02; 144,53; 170,44; 198,59. ESI-MS HR: 433,2868 (M +1), Izr. 433,2849.

***N*-(4-Izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-butanamid (30b)**,  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$ , reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (0,86 mmol) i odgovarajuće količine imidazola, dobija se 0,100 g **30b**, u prinosu 28,00 %, kao žuta čvrsta supstanca, t.t. 92 °C.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,17 (*d*, 6H,  $J_{1,2} = 7,31$ , *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,78 (*br*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-); 2,75-2,78 (5H, preklapljeni signali, 4-*i*-Pr-CH- and tetralinoil-CH<sub>2</sub>-); 3,48 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,61$ ,  $J_{1,3} = 17,97$ , ABX); 4,08 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 7,30$ ,  $J_{1,3} = 17,41$ , ABX); 5,64 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,61$ ,  $J_{1,3} = 7,30$ , ABX); 7,08 (*d*, 2H,  $J = 8,43$ , amido-*m*-fenil); 7,13 (*br*, 2H, imidazolil-CH-); 7,20 (*s*, 1H, aroil-*m*-fenil); 7,44 (*d*, 2H,  $J = 8,42$ , amido-*o*-fenil); 7,60 (*br*, 1H, imidazolil-CH-); 7,62 (*br*, 2H, aroil-*o*-fenil); 9,95 (*s*, 1H, amido-NH-).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,615; 22,761; 23,908; 29,224; 29,588; 33,503; 41,751; 56,699; 118,057; 120,169; 125,122; 126,761; 129,091; 129,492; 133,279; 135,500; 137,394; 137,648; 144,185; 145,277; 166,452; 196,130. ESI-MS HR: 416,2342 (M +1), Izr. 416,2333.

***N*-(4-Izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-butanamid (31b)**,  $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$ , reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (0,86 mmol) i odgovarajuće količine morfolin, dobija se 0,365 g **31b**, u prinosu 97,28 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. 129-131 °C (toluen).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,22 (*d*, 6H,  $J=6,52$  Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,81 (*br*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-); 2,65 (signali slični *t*, 4H,  $J_{1,2}=4,53$  Hz, morfolino-CH<sub>2</sub>-); 2,81 (*br*, 5H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>- i *i*-PrCH); 3,33 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=5,00$  Hz,  $J_{1,3}=16,92$  Hz, ABX); 3,65-3,77 (preklapljeni *m*, 5H, morfolino-CH<sub>2</sub>- i ABX); 4,27 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=5,72$  Hz,  $J_{1,3}=9,05$  Hz, ABX); 7,12-7,19 (preklapljeni *d*, 3H, amido-*m*-fenil i aroil-*m*-fenil); 7,42 (*d*, 2H,  $J=8,61$  Hz, amido-*o*-fenil); 7,72 (*br*, 2H, aroil-*o*-fenil); 9,17 (*s*, 1H, amido -NH-).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,73; 22,85; 23,93; 29,28; 29,53; 32,21; 33,49; 50,04; 65,09; 67,33; 119,39; 125,25; 126,81; 129,34; 134,30; 135,30; 137,43; 143,31; 144,86; 169,56; 198,02. ESI-MS HR: 435,2654 (M +1), Izr. 435,2648.

***N*-(4-Izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamid (32b)**,  $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_2$ , reakcijom 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (1,15 mmol) i odgovarajuće količine 1-metilpiperazina, dobija se 0,432 g **32b**, u prinosu 83,83 %, kao narandžasta polučvrsta supstanca.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,22 (*d*, 6H,  $J=6,60$ , *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,81 (*br*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-); 2,32 (*s*, 3H, piperazin-N-CH<sub>3</sub>); 2,52 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,68 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,80 (*br*, 4H, tetralinoil-CH<sub>2</sub>-); 2,96 (signali slični *t*, 1H,  $J_{1,2}=2,73$ , ABX); 2,96 (*m*, 1H, *i*-PrCH); 3,68 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=7,16$  Hz,  $J_{1,3}=16,93$  Hz, ABX); 4,33 (*dd*, 1H,

$J_{1,2}=5,16$  Hz,  $J_{1,3}=7,04$ , ABX); 7,13 (*d*, 1H,  $J=8,11$ , aroil-*m*-fenil); 7,17 (*d*, 2H,  $J=8,52$ , amido-*m*-fenil); 7,46 (*d*, 2H,  $J=8,52$ , amido-*o*-fenil); 7,72 (*s*, 1H, aroil-*o*-fenil); 7,73 (*d*, 1H,  $J=5,41$ , aroil-*o*-fenil); 9,24 (*s*, 1H, amido -NH-).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,76; 22,91; 23,98; 29,31; 29,57; 31,88; 33,52; 44,30; 45,92; 55,59; 64,67; 119,37; 125,28; 126,83; 129,16; 129,33; 134,44; 135,44; 137,39; 143,20; 144,75; 168,89; 198,27. ESI-MS HR: 448,2966 ( $M+1$ ), Izr. 448,2964.

***N*-Cikloheksil-4-okso-2-*(R,S)*-1-piperidinil-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamid (33b)**,  $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2$ , reakcijom (*E*)-*N*-cikloheksil-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenamida (0,96 mmol) i odgovarajuće količine piperidina, dobija se 0,200 g **33b**, u prinosu 52,35 %, kao blede žuta čvrsta supstanca, t.t. 78 °C.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,19 (*m*, 2H, ax C2, cikloheksil-CH-); 1,36 (*m*, 2H, ax C3, cikloheksil-CH-); 1,44 (*m*, 1H, ax C4, cikloheksil -CH-); 1,55 (*m*, 4H, C3, piperidin- $\text{CH}_2$ -); 1,60 (*m*, 1H, eq C4, cikloheksil -CH-); 1,62 (*m*, 2H, C4, piperidin- $\text{CH}_2$ -); 1,68 (*m*, 2H, eq C3, cikloheksil-CH-); 1,80 (signali slični *d*, 4H,  $\beta$ -tetralinil); 1,86 (*m*, 2H, eq C2, cikloheksil -CH-); 2,49 i 2,54 (*mb*, 4H, C2, piperidin-CH-); 2,80 (signali slični *d*, 4H,  $\beta$ -tetralinil); 2,87 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,31$ ,  $J_{1,3} = 16,26$ , ABX); 3,60 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 7,19$ ,  $J_{1,3} = 16,26$ , ABX); 3,75 (signali slični *d*, 1H, cikloheksil-CH-); 4,06 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,32$ ,  $J_{1,3} = 7,04$ , ABX); 7,13 (*d*, 1H,  $J = 8,29$ , aroil-*m*-fenil); 7,28 (*sb*, 1H, amido-NH-); 7,72 (preklopljeni *d* i *s*, 2H, aroil-*o*-fenil);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,61; 22,84; 22,88; 22,96; 24,06; 24,63; 25,44; 25,54; 26,65; 29,35; 29,57; 32,12; 32,94; 33,16; 44,66; 47,50; 50,95; 65,45; 125,28; 129,08; 129,21; 134,82; 137,26; 142,78; 171,08; 199,07. ESI-MS HR: 397,2866 ( $M+1$ ), Izr. 397,2849.

***N*-Cikloheksil-4-okso-2-*(R,S)*-1-imidazolil-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamid (34b)**,  $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$ , reakcijom (*E*)-*N*-cikloheksil-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenamida (0,96 mmol) i odgovarajuće količine imidazola, dobija se 0,210 g **34b**, u prinosu 57,64 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. 98 °C.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,00-1,42 (*m*, 6H, 3,4-cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 1,48-1,73 (*m*, 4H, 2- cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 1,79 (*br*, 4H, tetralinoil- $\text{CH}_2$ -); 2,78 (*br*, 4H, tetralinoil- $\text{CH}_2$ -); 3,47 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,80$ ,  $J_{1,3} = 17,88$ , ABX); 3,61-3,83 (*m*, 1H, 1-cikloheksil-CH-); 4,02 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 8,21$ ,  $J_{1,3} = 18,84$ , ABX); 5,42 (*t*, 1H,  $J_{1,2} = 5,65$ , ABX); 6,80 (signali slični *d*, 1H, amido-NH-); 7,09 (*d*, 1H,  $J = 7,20$ , aroil-*m*-fenil); 7,14-7,29 (*m*, 3H, imidazolil-CH-); 7,62 (*br*, 2H, aroil-*m*-fenil).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,58; 22,73; 24,60; 25,22; 29,17; 29,53; 32,47; 41,59; 48,74; 56,28; 95,70; 117,89; 125,05; 128,98; 129,40; 129,64; 133,39; 137,25; 137,57; 144,00; 167,42; 195,96. ESI-MS HR: 380,2337 ( $M+1$ ), Izr. 380,2332.

***N*-Cikloheksil-2-*(R,S)*-4-morfolinil-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamid (35b)**,  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$ , reakcijom (*E*)-*N*-cikloheksil-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenamida (0,96 mmol) i odgovarajuće količine morfolina, dobija se 0,250 g **35b**, u prinosu 65,12 %, kao bela čvrsta supstanca, t.t. 106-108 °C (toluen).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,14-1,24 (*m*, 3H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 1,32-1,40 (*m*, 3H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 1,58-1,62 (*m*, 1H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 1,65-1,71 (*m*, 3H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 1,81 (*m*, 4H,  $\beta$ -tetralinil); 1,87 (*m*, 2H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 2,58 (*m*, 4H, morfolinil- $\text{CH}_2$ -); 2,80 (*m*, 4H,  $\beta$ -

tetralinil); 2,92 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,16$ ,  $J_{1,3} = 16,64$ , ABX); 3,63 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 7,08$ ,  $J_{1,3} = 16,45$ , ABX); 3,68 (*m*, 1H, cikloheksil-CH-); 3,74 (*m*, 4H, morfolinil-CH<sub>2</sub>-); 4,06 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,16$ ,  $J_{1,3} = 7,07$ , ABX); 7,23 (*m*, 1H, amido-NH); 7,70-7,71 (preklopljeni *s* i *d*, 2H, aroil-*o*-fenil); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 22,83; 22,96; 24,69; 25,50; 29,37; 29,61; 32,52; 32,97; 33,26; 47,74; 50,07; 64,85; 67,35; 125,27; 128,20; 129,01; 129,09; 129,31; 134,59; 137,38; 143,11; 170,21; 198,46. ESI-MS HR: 399,2640 (M + 1), Izr. 399,2648.

***N*-Cikloheksil-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-4-okso-4-(5,6,7,8-**

**tetrahidronaftalenil)butanamid (36b)**, C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, reakcijom (*E*)-*N*-cikloheksil-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenamida (0,96 mmol) i odgovarajuće količine *N*-metilpiperazina, dobija se 0,130 g **36b**, u prinosu 32,79 %, kao bledo narandžasta čvrsta supstanca, t.t. 93-94 °C (toluen). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,18 (*m*, 2H, ax C2, cikloheksil-CH-); 1,35 (*m*, 2H, ax C3, cikloheksil-CH-); 1,37 (*m*, 1H, ax C4, cikloheksil-CH-); 1,58 (*m*, 1H, eq C4, cikloheksil-CH-); 1,67 (*m*, 2H, eq C3, cikloheksil-CH-); 1,80 (signali slični *d*, 4H,  $\beta$ -tetralinil); 1,86 (*m*, 2H, eq C2, cikloheksil-CH-); 2,31 (*s*, 3H, piperazin-N-CH<sub>3</sub>); 2,50 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,61 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,80 (signali slični *d*, 4H,  $\beta$ -tetralinoil); 2,90 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 4,99$ ,  $J_{1,3} = 16,29$ , ABX); 3,60 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 7,59$ ,  $J_{1,3} = 16,69$ , ABX); 3,75 (*m*, 1H, cikloheksil-CH-); 4,12 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,00$ ,  $J_{1,3} = 7,25$ , ABX); 7,09 (*d*, 1H,  $J = 8,67$  Hz, amido-NH-); 7,12 (*d*, 1H,  $J = 9,20$ , aroil-*m*-fenil); 7,69 (*s*, 1H, aroil-*o*-fenil); 7,70 (*s*, 1H, aroil-*o*-fenil); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 22,83; 22,96; 24,67; 25,52; 29,35; 29,58; 32,15; 32,96; 33,23; 45,85; 47,64; 55,50; 125,24; 129,07; 129,23; 134,69; 137,28; 142,92; 170,43; 198,64. ESI-MS HR: 412,2951 (M + 1), Izr. 412,2964.

**2-(*R,S*)-(4-Benzilpiperidinil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-*N*-fenilbutanamid (37b)**,

C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reakcijom fenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,7 mmol) i odgovarajuće količine 4-benzilpiperidina, dobija se **37b**, u kvantitativnom prinosu, kao žuta polučvrsta supstanca. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,26 (*d*, 6H,  $J = 7,06$  Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 1,41 (*m*, 1H, piperidin-CH); 1,72 (signali slični *t* 4H,  $J = 13,63$  Hz, piperidin-CH<sub>2</sub>-); 2,21 (signali slični *t*, 1H,  $J = 11,68$  Hz, benzil-CH<sub>2</sub>-); 2,45 (signali slični *t*, 1H,  $J = 11,19$  Hz, benzil-CH<sub>2</sub>-); 2,56 (*m*, 4H, piperidin-CH<sub>2</sub>-); 2,94 (preklopljeni *m*, 2H, ABX i *i*-PrCH); 3,68 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 6,81$  Hz,  $J_{1,3} = 16,30$  Hz, ABX); 4,29 (*dd*, 1H,  $J_{1,2} = 5,35$  Hz,  $J_{1,3} = 6,30$  Hz, ABX); 7,08 (*t*, 1H,  $J = 7,50$  Hz, benzil-*p*-CH); 7,13 (*d*, 2H,  $J = 7,80$  Hz, benzil-*m*-fenil); 7,19 (*t*, 1H,  $J = 6,37$  Hz, amido-*p*-fenil); 7,26 (*d*, 2H,  $J = 7,50$  Hz, aroil-*m*-fenil); 7,29-7,32 (preklopljeni *m*, 4H, amido-*m*-fenil i benzil-*o*-fenil); 7,53 (*d*, 2H,  $J = 7,50$  Hz, amido-*o*-fenil); 7,94 (*d*, 2H,  $J = 8,35$  Hz, aroil-*o*-fenil); 9,39 (*s*, 1H, amido-NH-). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 21,42; 23,64; 30,68; 31,93; 32,85; 33,11; 34,21; 37,18; 37,57; 43,05; 45,12; 48,01; 52,75; 65,48; 119,29; 123,95; 125,91; 126,65; 128,21; 128,50; 128,94; 129,02; 134,90; 137,77; 140,24; 154,47; 170,47; 198,28. ESI-MS HR: 469,2852 (M + 1), Izr. 469,2855.

***N*-(3,5-Dimetoksifenil)-2-(*R,S*)-[4-(2-dimetilaminoetil)-1-piperazinil]-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-butanamid (38b)**: C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, reakcijom 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,57 mmol) i odgovarajuće količine 4-(2-dimetilaminoetil)-1-piperazina, dobija se **38b**, u kvantitativnom prinosu, kao žuta polučvrsta supstanca. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1,27 (*d*, 6H,  $J = 7,33$  Hz, *i*-PrCH<sub>3</sub>); 2,24



(*s*, 6H, *N*-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2,43 (*m*, 2H, linker-CH<sub>2</sub>-); 2,48 (*m*, 2H, linker-CH<sub>2</sub>-); 2,59 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,67 (*br*, 4H, piperazin-CH<sub>2</sub>-); 2,97 (*m*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=6,60 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=13,56 Hz, *i*-PrCH); 3,01 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=5,13 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=17,23 Hz, ABX); 3,68 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=6,96 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=17,23 Hz, ABX); 3,77 (*s*, 6H, -OCH<sub>3</sub>); 4,31 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=4,77 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=7,33 Hz, ABX); 6,22 (*t*, 1H, *J*=2,19 Hz, amido-*p*-fenil); 6,78 (*s*, 2H, amido-*o*-fenil); 7,32 (*d*, 2H, *J*=8,14, aroil-*m*-fenil); 7,94 (*d*, 2H, *J*=8,46, aroil-*o*-fenil); 9,29 (*s*, 1H, amido-NH). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 23,60; 31,85; 45,61; 54,16; 55,36; 56,47; 56,82; 64,55; 96,36; 97,49; 126,64; 128,15; 128,45; 128,96; 134,73; 139,48; 154,59; 161,04; 170,06; 197,72. ESI-MS HR: 511,3283 (M +1), Izr. 511,3284.

#### 4.1.4. Sinteza i karakterizacija jedinjenja 151c, 152c i 156c

*Sinteza 9-Hlor-1,2,3,4-tetrahidroakridina*: U dvogrli balon od 250 ml, opremljen ledenim kupatilom i refluks kondenzatorom stavi se 2,1 g antranilne kiseline (2-aminobenzoeva kiselina, 15 mmol) i ekvimolarna količina cikloheksanona. Zatim se pažljivo kapalicom doda 16 ml fosforoksihlorida. Nakon ovoga balon se uroni u uljano kupatilo i reakciona smeša se zagreva uz refluks na 125 °C tokom 2 sata. Nakon toga, fosforoksihlorid se ukloni pod sniženim pritiskom. Kada se smeša ohladi, polučvrsti smolasti ostatak, koji sadrži sirov proizvod se izlije u ledenu vodu, a pH se podese natrijum-karbonatom na 8,5. Vodeni rastvor se ekstrahuje etilacetatom, organski sloj se odvoji i upari pod sniženim pritiskom. Dobijeni sirovi proizvod se prekrystalise iz acetona.

**9-Hlor-1,2,3,4-tetrahidroakridin**: <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,83-1,96 (*m*, 4H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 2,93 (*t*, 2H, *J*=5,63 Hz, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 3,08 (*t*, 2H, *J*=6,35 Hz, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 7,47 (*t*, 1H, *J*=7,06 Hz, *m*-fenil); 7,62 (*t*, 1H, *J*=6,77 Hz, *m*-fenil); 7,95 (*t*, 1H, *J*=8,19 Hz, *o*-fenil); 8,09 (*t*, 1H, *J*=7,06 Hz, *m*-fenil). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 12,42; 22,45; 27,28; 33,96; 123,46; 125,16; 126,17; 128,49; 129,05; 146,50; 159,26.

**Sinteza N-(1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)-oktan-1,8-diamina (158c)**: U jednogrlu balon od 25 ml, opremljen refluks kondenzatorom i magnetnom mešalicom stavi se 1g (4,61 mmol) 9-hlor-1,2,3,4-tetrahidroakridina, 1,99 g (13,8 mmol) 1,8-diaminooktana i 5 ml 1-*n*-pentanola. Smeša se refluktuje 18 sati na 160 °C. Nakon hlađenja do sobne temperature, smeša se razblaži dodatkom 50 ml etilacetata. Rastvor se ispere 10%-tnim rastvorom natrijum-hidroksida u vodi, u levku za odvajanje, i dva puta destilovanom vodom. Rastvor se suši preko noći anhidrovanim magnezijum-sulfatom i nakon toga cedi. Rastvarač se upari, a dobijena polučvrsta supstanaca prečisti hromatografijom na koloni u sistemu rastvarača CHCl<sub>3</sub> : MeOH : NH<sub>4</sub>OH = 7 : 3 : 0,07.

***N*-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-il)-oktan-1,8-diamina (159c):**  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,13-1,19 (preklopljeni *m*, linker- $\text{CH}_2$ -); 1,28 (*br*, 2H, linker- $\text{CH}_2$ -); 1,47 (*br*, 2H, linker- $\text{CH}_2$ -); 1,74 (*br*, 2H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 2,52 (*br*, 2H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 2,92 (*br*, 2H, linker- $\text{CH}_2$ -); 3,03 (*br*, 2H, amino- $\text{NH}_2$ -); 3,30 (*br*, 2H, linker- $\text{CH}_2$ -); 3,84 (*br*, 1H, amino-NH-); 7,18 (*t*, 1H,  $J=7,14$  Hz, *m*-fenil); 7,38 (*t*, 1H,  $J=7,52$  Hz, *m*-fenil); 7,78-7,82 (preklopljeni *m*, 2H, *o*-fenil).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,31; 22,58; 24,31; 26,36; 28,80; 31,22; 32,66; 33,52; 41,39; 48,91; 115,26; 119,75; 122,42; 122,98; 127,67; 128,15; 146,99; 150,27; 157,87;

*Sinteza heterodimera takrina i fenilamida benzoilakrilnih kiselina 151c, 152c i 156c*

U balon od 25 ml, opremljen magnetnom mešalicom i refluks kondenzatorom, rastvori se 7 mmol odgovarajućeg supstituisanog amida (*E*)-4-aril-4-oxo-2-butenske kiseline u 15 ml hloroforma. Zatim se doda 15 ml toluena i ekvimolarna količina *N*-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-il)-oktan-1,8-diamina. Smeša se meša na sobnoj temperaturi tokom 24 časa. Nakon završetka reakcije, rastvarač se upari. Po potrebi, dobijena polučvrsta supstanaca se može prečistiti hromatografijom na koloni u sistemu rastvarača  $\text{CHCl}_3$  : MeOH :  $\text{NH}_4\text{OH}$  = 7 : 3 : 0,07. Dobijeni proizvodi su okarakterisani  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom visoke rezolucije sa elektrosprej jonizacijom.

**4-(4-Izopropilfenil)-4-okso-*N*-fenil-2-[8-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-ilamino)oktil-amino]butanamid (151c):**  $\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_2$ , reakcijom fenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,70 mmol) i odgovarajuće količine *N*-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-il)-oktan-1,8-diamina, dobija se **151c**, u kvantitativnom prinosu, kao narandžasta polučvrsta supstanca.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,23-1,25 (preklopljeni *m*, 8H, uključuje je *d*, 2H,  $J=7,09$  Hz, *i*-Pr $\text{CH}_3$ ); 1,31-1,37 (preklopljeni *m*, 8H, linker - $\text{CH}_2$ -); 1,57 (*m*, 2H, linker- $\text{CH}_2$ -); 1,64 (*m*, 2H, linker- $\text{CH}_2$ -); 1,90 (*m*, 4H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 2,69 (*m*, 4H, cikloheksil- $\text{CH}_2$ -); 2,95 (*b*, 1H,  $J_{1,2}=6,59$  Hz,  $J_{1,3}=13,78$  Hz, *i*-PrCH); 3,05 (*br*, 2H, linker- $\text{CH}_2$ -); 3,28 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=8,19$  Hz,  $J_{1,3}=17,38$  Hz, ABX); 3,47 (*t*, 2H,  $J=7,39$  Hz, amino-NH); 3,62 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=3,20$  Hz,  $J_{1,3}=17,39$  Hz, ABX); 3,70 (*dd*, 1H,  $J_{1,2}=3,64$  Hz,  $J_{1,3}=8,71$  Hz, ABX); 7,09 (*t*, 1H,  $J=7,47$  Hz, amido-*p*-fenil); 7,29-7,34 (preklopljeni *m*, 6H, amido-*m*-fenil, amido-*o*-fenil i takrin-*m*-fenil); 7,58 (*d*, 2H,  $J=7,64$  Hz, aroil-*m*-fenil); 7,91 (*d*, 2H,  $J=8,28$  Hz, takrin-*o*-fenil); 7,95 (*d*, 2H,  $J=8,28$  Hz, aroil-*o*-fenil); 9,60 (*s*, 1H, amido-NH).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 22,70; 22,96; 23,55; 24,71; 26,82; 27,08; 29,26; 30,15; 31,69; 33,86; 34,21; 40,04; 48,37; 49,44; 59,45; 115,72; 119,24; 120,12; 122,82; 123,52; 124,04; 126,77; 128,27; 128,41; 128,52; 128,94; 134,12; 137,73; 147,31; 150,80; 155,21; 158,30; 171,90; 196,18. ESI-MS HR: 310,2046 (M +2), Izr. 310,2045.

**4-(3,4-Dimetilfenil)-4-okso-N-fenil-2-[8-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-ilamino)oktil-amino]butanamid (152c):** C<sub>39</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, reakcijom fenilamida (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (0,70 mmol) i odgovarajuće količine *N*-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-il)-oktan-1,8-diamina, dobija se **152c**, u kvantitativnom prinosu, kao narandžasta polučvrsta supstanca. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,25-1,37 (preklopljeni *m*, 8H, linker-CH<sub>2</sub>-); 1,50 (*m*, 2H, linker-CH<sub>2</sub>-); 1,64 (*m*, 2H, linker-CH<sub>2</sub>-); 1,90 (*m*, 4H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 2,29 (*s*, 3H, -CH<sub>3</sub>); 2,30 (*s*, 3H, -CH<sub>3</sub>); 2,69 (*m*, 4H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 3,06 (*m*, 4H, linker-CH<sub>2</sub>-); 3,26 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=8,70 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=17,40 Hz, ABX); 3,47 (*t*, 2H, *J*=7,15 Hz, amino-NH-); 3,62 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=4,35 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=17,39 Hz, ABX); 3,68 (*dd*, 1H, *J*<sub>1,2</sub>=4,35 Hz, *J*<sub>1,3</sub>=8,70 Hz, ABX); 7,09 (*t*, 1H, *J*=7,14 Hz, amido-*p*-fenil); 7,13-7,25 (preklopljeni *m*, 3H, amid-*m*-fenil, aroil-*m*-fenil); 7,32 (*m*, 2H, amid-*o*-fenil); 7,53 (*t*, 1H, *J*=6,88 Hz, takrin-*m*-fenil); 7,59 (*d*, 1H, *J*=8,35 Hz, aroil-*o*-fenil); 7,70 (*t*, 1H, *J*=7,37 Hz, takrin-*m*-fenil); 7,74 (*s*, 1H, aroil-*o*-fenil); 7,91 (*d*, 1H, *J*=8,35 Hz, takrin-*o*-fenil); 7,95 (*d*, 1H, *J*=7,86 Hz, takrin-*o*-fenil); 9,59 (*s*, 1H, amido-NH). <sup>13</sup>C NMR (125 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 19,70; 20,00; 21,39; 22,70; 22,99; 24,71; 26,77; 27,09; 29,27; 30,16; 31,69; 33,87; 40,12; 48,38; 49,44; 59,50; 115,70; 119,23; 120,11; 122,79; 123,54; 124,03; 125,23; 125,88; 128,57; 128,94; 129,25; 129,91; 134,17; 137,05; 137,76; 143,25; 147,27; 150,82; 158,25; 171,95; 198,39. ESI-MS HR: 605,3830 (M +1), Izr. 605,3856; 303,1967 (M+2), Izr. 303,1967.

**4-N-Difenil-4-okso-2-[8-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-ilamino)oktilamino]butanamid (156c):** C<sub>37</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, reakcijom fenilamida (*E*)-4-okso-4-fenil-2-butenske kiseline (0,70 mmol) i odgovarajuće količine *N*-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-il)-oktan-1,8-diamina, dobija se **156c**, u kvantitativnom prinosu, kao narandžasta polučvrsta supstanca. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,01-1,20 (preklopljeni *m*, 8H, linker-CH<sub>2</sub>-); 1,50 (*br*, 2H, linker-CH<sub>2</sub>-); 1,72 (*br*, 2H, linker-CH<sub>2</sub>-); 2,51 (*br*, 4H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 2,90 (*br*, 4H, cikloheksil-CH<sub>2</sub>-); 3,33-3,40 (preklopljeni *m*, 7H, linker-CH<sub>2</sub>- i ABX); 3,56-3,61 (*m*, 1H, ABX); 4,34 (*m*, 1H, ABX); 4,34 (*m*, 1H, ABX); 4,56 (*s*, amino-NH-); 4,89 (*s*, amino-NH-); 6,89-7,56 (preklopljeni *m*, takrin-*m*-fenil, amido-*p*-fenil, amido-*m*-fenil, aroil-*p*-fenil i aroil-*m*-fenil); 7,79-7,86 (preklopljeni *m*, 4H, aroil-*o*-fenil, amido-*o*-fenil i takrin-*o*-fenil); 9,54 (*s*, 1H, amido-NH). <sup>13</sup>C NMR (50 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 21,18; 22,23; 22,60; 24,35; 26,55; 26,84; 20,97; 29,90; 30,55; 31,37; 32,96; 41,57; 41,97; 43,05; 59,10; 61,38; 64,33; 67,15; 114,93; 119,13; 119,60; 122,03; 123,43; 124,34; 125,05; 126,67; 127,91; 128,78; 130,17; 135,99; 137,05; 137,56; 141,38; 142,14; 141,28; 151,10; 157,38; 170,15; 171,80; 196,49; 198,37. ESI-MS HR: 577,3529 (M +1), Izr. 577,3537; 289,1807 (M+2), Izr. 289,1805.

## 4.2. Ispitivanje biološke aktivnosti jedinjenja

### 4.2.1. Ispitivanje biološke aktivnosti amida aroilakrilnih kiselina (1a-29a)

#### 4.2.1.1. Ispitivanje citotoksičnosti amida aroilakrilnih kiselina (1a-29a)

##### *Rastvori jedinjenja*

Osnovni rastvori ispitivanih jedinjenja (**1a-29a**) su napravljeni u dimetilsulfoksidu (Fluka Chemie AG Buch, Switzerland) u koncentraciji 20 mM i proceđeni su kroz Milipor filtere (0,22  $\mu\text{m}$ ) pre upotrebe. Radne koncentracije rastvora jedinjenja su napravljene razblaživanjem sa RPMI-164 hranljivim medijumom (Sigma Chemical Co. St Louis, MO) u koji je dodato: 3 mmol/L L-glutamina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomicina, 100 IU/mL penicilina, 10% termalno deaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (FBS – Sigma Chemical Co.) i 25 mM Hepes pufera, podešenog na pH 7,2 rastvorom bikarbonata.

##### *Tretman ćelija*

Ćelije su zasejane u mikrotitratske ploče sa 96 bunara, i to 2000 ćelija po bunaru u 0,1 mL hranljivog medijuma. Nakon 20 časova, pet različitih koncentracija ispitivanih jedinjenja (**1a-29a**) je dodato u bunare (osim u one koji su služili kao kontrola). Sve koncentracije su primenjene u triplicatu. Hranljivi medijum sa odgovarajućim koncentracijama ispitivanih jedinjenja je korišćen kao „slepa proba”.

##### *Određivanje citotoksičnosti prema FemX, HeLa i K562 ćelijama*

Citotoksičnost je određena MTT testom prema metodi Mosmanna,<sup>312</sup> koju su modifikovali Ohno i Abe.<sup>313</sup> Citotoksičnost je određena 72 časa nakon dodatka ispitivanih jedinjenja. 20  $\mu\text{L}$  Rastvora MTT (koncentracije 5 mg/mL u fosfatnom puferu) je dodato u svaki bunar. Ćelije su inkubirane 4 časa na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Nakon toga je u svaki bunar dodato 100  $\mu\text{L}$  10%-tnog SDS-a. Apsorbanca je merena na 500 nm. Citotoksičnost je izračunata kao količnik apsorbance uzorka ćelija koje su inkubirane sa ispitivanim jedinjenjima i apsorbance kontrolnog uzorka (ćelije koje nisu inkubirane sa ispitivanim jedinjenjima) od kojih je oduzeta apsorbanca slepe probe. Eksperimentalno dobijene IC<sub>50</sub> vrednosti predstavljaju srednje vrednosti najmane tri nezavisna merenja.

### *Analiza ćelijskog ciklusa*

Alikvoti koji su sadržavali  $2,5 \times 10^5$  ćelija kontrolnog uzorka ili uzorka ćelija tretiranih ispitivanim jedinjenjima tokom 24 h (u koncentracijama koje odgovaraju  $2IC_{50}$ ,  $4IC_{50}$  i  $8IC_{50}$ ) su fiksirani u 70% etanolu tokom 1h, na ledu, a zatim na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  tokom jedne nedelje. Ćelije su zatim izdvojene centrifugiranjem. Peleti su tretirani RN-azom ( $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  tokom 30 minuta, a zatim inkubirani sa propidijum-jodidom (PI,  $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) tokom 30 min. Sadržaj DNK i raspodela ćelija u odgovarajućim fazama ćelijskog ciklusa su analizirani Becton Dickinson FAC-Scan protočnim citometrom. Protočna citometrijska analiza je urađena korišćenjem CellQuestR (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) na najmanje 10 000 ćelija po uzorku.<sup>314</sup>

#### *4.2.1.2. Ispitivanje inhibicije polimerizacije tubulina i inhibicije vezivanja kolhicina za tubulin*

Ispitivanje inhibicije polimerizacije tubulina i inhibicije vezivanja [ $^3\text{H}$ ]-kolhicina za tubulin su urađeni sa elektroforetski homogenim tubulinom iz goveđeg mozga.<sup>315</sup> Biološki test inhibicije polimerizacije tubulina<sup>316</sup> je urađen u medijumu koji se sastojao iz:  $10\text{ }\mu\text{M}$  tubulina,  $0,8\text{ M}$  natrijum-glutamata (pH 6,6 sa HCl u  $2,0\text{ M}$  osnovnom rastvoru),  $0,4\text{ mM}$  GTP-a i  $4\text{ }\%$  (v/v) dimetilsulfoksida (korišćen da se rastvore ispitivana jedinjenja). Tubulin i različite koncentracije jedinjenja su inkubirane bez GTP-a, tokom 15 minuta na  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uzorci su zatim uronjeni u led i dodat je GTP, pa su na  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  preneti u kivete spektrofotometra Beckman DU7400 ili Beckman DU 7500, opremljene elektronskim kontrolorima temperature. Nakon uspostavljanja baznih linija na  $350\text{ nm}$ , temperatura je povećana na  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (za manje od 1 min) i turbiditet uzorka je meren tokom 20 min.  $IC_{50}$  Vrednost predstavlja onu koncentraciju jedinjenja koja smanjuje turbiditet uzorka za 50% tokom 20 min očitavanja, u odnosu na kontrolnu reakcionu smešu bez ispitivanih jedinjenja.

Metoda ispitivanja inhibicije vezivanja kolhicina za tubulin je detaljno opisana u literaturi.<sup>317</sup> Reakciona smeša sadrži puferski sistem za stabilizaciju tubulina i  $1,0\text{ }\mu\text{M}$  tubulina,  $5,0\text{ }\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-kolhicina (Perkin Elmer, Boston MA) i ispitivana jedinjenja u koncentracijama  $5,0$  i  $50\text{ }\mu\text{M}$ . Konačna koncentracija dimetilsulfoksida u smeši nije prelazila  $5\text{ v/v}$ . Reakciona smesa je inkubirana tokom 10 minuta na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vremenski interval od 10 minuta je dovoljan da se 50% kolhicina veže za tubulin, u odsustvu inhibitora vezivanja.

Nakon ovog vremena reakcije su zaustavljene sa 3 mL vode (na 0 °C) i smeše su procedene kroz dva DEAE-celulozna filtera (Whatman). Količina radioobeležnog kolhicina, adsorbovanog na filterima određena je scintilacionim brojanjem.

#### 4.2.1.3. Test akutne toksičnosti derivata **23a**

Korišćeni su muški albino miševi (NMRI Hann), težine 18-22 g, iz instituta “Vivarijum-Galenika a.d.” (Beograd, Srbija), izabrani nasumičnim uzorkovanjem. Životinje su čuvane u standardnim uslovima, na  $23 \pm 2$  °C, 50% vlažnosti vazduha uz slobodan pristup hrani i vodi. Studija je urađena uz poštovanje nacionalnih („Zakon o postupanju sa eksperimentalnm životinjama”, Republika Srbija) i evropskih (Directive 2010/63/EU; *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*) zakonskih regulativa i propisa. Testovi akutne toksičnosti su urađeni u skladu sa OECD-423 normama. Eksperimenti su odobreni od strane Etičkog Komiteta za Životinje – Galenika a.d. (dozvola br. 3/12)

Jedinjenje **23a** (20 mg) je rastvoreno u 10 mL dimetilsulfoksida. Testirana supstanca (u dozi 10 mg/kg telesne težine) je data miševima oralno. Ukoliko mortalitet nije primećen, procedura se ponavlja sa višim dozama jedinjenja od 20, 30, 40 ili 50 mg/kg telesne težine. Ukoliko je primećen mortalitet kod 2 ili 3, od 6 eksperimetalnih životinja, primenjena doza je uzeta kao toksična. Ukoliko je mortalitet uočen kod jedne eksperimentalne životinje, supstanca se primenjuje opet u istoj dozi da bi se potvrdila toksična doza. Ponašanje životinja je praćeno 72 časa nakon primene jedinjenja.

#### 4.2.2. Ispitivanje biološke aktivnosti jedinjenja **1b-38b**, **151c**, **152c** i **156c**

##### 4.2.2.1. Određivanje $IC_{50}$ vrednosti derivata **1b-38b** i **151c**, **152c** i **156c** prema AChE i BChE

Korišćeni rastvori:

Fosfatni pufer, 0,1 M, pH = 8,00

Rastvor indikatora (DTNB). Pravi se rastvor koncentracije 0,6 mM, u fosfatnom puferu.

Finalna koncentracija DTNB-a pri merenju je 0,3 mM.

*Rastvor supstrata, acetilthiobolin-jodida, ASCh.* Pravi se rastvor koncentracije 11,8 mM u destilovanoj vodi. Finalna koncentracija ASCh pri određivanju treba da bude 0,28 mM.

*Rastvor supstrata, butiriltiobolin-jodida, BSCh.* Pravi se rastvor koncentracije 21,0 mM. Finalna koncentracija BSCh pri određivanju treba da bude 0,5 mM.

*Rastvori enzima, ACbE i BCbE.* Odmeri se 0,0028 g enzima i rastvori u 10 ml destilovane vode (rastvor enzima 1). Zatim se 1 ml ovog rastvora razblaži do 100 ml fosfatnim puferom (rastvor enzima 2).

*Rastvori inhibitora.* Pravi se rastvor koncentracije  $1 \times 10^{-2}$  M. Ostali rastvori nižih koncentracija dobijaju se razblaživanjem ovog rastvora 50% smešom metanola i vode.

#### *Spektrofotometrijsko određivanje $IC_{50}$ vrednosti*

U epruvete za termostatiranje rastvora doda se 0,1 ml rastvora inhibitora odgovarajuće koncentracije i 1,8 ml rastvora enzima (najmanje u triplikatu), odnosno u kontrolnu epruvetu se doda 0,1 ml metanola. Epruvete se 35 minuta termostatiraju na 25 °C, a zatim se za svaku koncentraciju inhibitora određuje enzimski aktivnost. U kivetu spektrofotometra stavi se 0,95 mL inkubacione smese, 1,0 mL rastvora DTNB-a i 0,05 mL rastvora supstrata. Na spektrofotometru se prati promena apsorbance s vremenom (min). Enzimski aktivnost se izračunava prema formuli:

$$EA/mL = \Delta A / 13,6$$

EA aktivnost je definisana kao broj mikromolova supstrata koje enzim hidrolizuje u min.

Za svaku koncentraciju inhibitora, izračunavaju se srednje vrednosti aktivnosti (određene u triplikatu) i procenat inhibicije enzima u odnosu na aktivnost enzima bez prisustva inhibitora. Zatim se tako dobijene vrednosti uklapaju metodom najmanjih kvadrata u pravu zavisnosti procenta inhibicije enzimski aktivnosti prema logaritmu koncentracije inhibitora (% inhibicije / log [inhibitora]). Sa tako dobijene prave se očitava  $\log(IC_{50})$  inhibitora, za 50 % inhibicije enzimski aktivnosti.

#### 4.2.2.2. Određivanje tipa inhibicije derivata **17b** prema AChE

Priprema svih potrebnih rastvora i sam eksperiment se izvode na potpuno analogan način kao i određivanje IC<sub>50</sub> vrednosti s tim što se snima serija krivih zavisnosti enzimske aktivnosti od različitih koncentracija supstrata u odsustvu inhibitora, i u prisustvu različitih (najmanje dve) koncentracija inhibitora. Položaj preseka ovih krivih pokazuje tip inhibicije (videti deo Rezultati i diskusija).

### 4.3. Metode molekuskog modelovanja

#### 4.3.1. Molekulsko modelovanje vezano za amide benzoilakrilnih kiselina (1a-29a)

Oblik i farmakoforna svojstva jedinjenja **1a-3a**, **6a**, **8a**, **9a**, **17a**, **21a**, **20a**, **23a-27a** su upoređeni sa ligandima kokristalisanim sa tubulinom. Konformacije jedinjenja korišćenih za poređenje sa E70 (*N*-{2-[(4-hidroksifenil)amino]piridin-3-il}-4-metoksibenzensulfonamid i N16 ((3*Z*, 5*S*)-5-benzil-3-[1-(fenilamino)etiliden]pirolidin-2,4-dion) su preuzete iz PDB fajlova (3HKC i 3HKD)<sup>318</sup> i atomi vodonika su dodati u programu VEGAZZ 2.4.0.<sup>319</sup> Strukture jedinjenja su sačuvane u mol2 formatu. Generisano je do 100 konformacija jedinjenja **1a-3a**, **6a**, **8a**, **9a**, **17a**, **21a**, **20a**, **23a-27a**, iz njihovih SMILES notacija, korišćenjem programa OMEGA,<sup>320</sup> i MMFF94s polja sila.<sup>321</sup> Da bi se dobilo 100 konformacija svakog jedinjenja, koja imaju četiri rotabilne veze u molekulu, rsmd opcija u programu OMEGA je podešena na 0,1. Set konformera za svako jedinjenje je sačuvan u mol2 formatu. Za poređenje oblika i farmakofornih svojstava jedinjenja upotrebljen je program ROCS. Korišćeno je eksplicitno Meals-Dean polje sila sa modifikacijama OpenEye-a i Tanimoto cut-off vrednost je podešena na -1. Molekulski deskriptori, izvedeni iz 3D struktura jedinjenja (površina dostupna rastvaraču, polarna površina, nepolarna površina, zapremina, virtuelna log*P* vrednost (zavisna od konformacije molekula) i ovalnost) su izračunati upotrebom VegaZZ programa i probe od 1,4 Å (voda), iz konformacija minimalne energije dobijenih OMEGA programom, sa MMFF94s poljem sila.

#### 4.3.2. Izvođenje 3D-QSAR modela za jedinjenja **1b-38b** i **1c-150c**

SMILES notacija jedinjenja **1b-38b**, koja su korišćena u modelu, je pretvorena u 3D strukture programom OMEGA, upotrebom MMFF94s polja sila (za generisanje polazne



strukture i konformera) pri čemu je generisano 50 konformacija za svako jedinjenje. Generisanje konformacija derivata **1c-156c** je opisana u daljem tekstu. Modeli su izvedeni upotrebom programa Pentacle 1.0.5. Stanje protonovanja jedinjenja pripisano je u programu, na pH 8,00, kako je opisano u originalnoj referenci. Program Pentacle koristi AMANDA algoritam za dobijanje druge generacije GRIND deskriptora (GRIND-2), koji su nezavisni od malih ili umerenih konformacionih promena. Dobijeni deskriptori (varijable) se dalje koriste da bi se izveli PCA i PLS modeli. Za pravljenje modela korišćene su probe DRY, N1, O i TIP sa rezolucijom rešetke od 0,4 Å. Za dobijanje GRIND deskriptora (enkodiranje MIF-ova) je korišćen MACC2 kriterijum. Granične vrednosti za probu bile su na njihovim preporučenim vrednostima, kao i veličina smoothing\* prozora i vrednost faktora skaliranja. Validacija modela urađena je unakrsnom validacijom upotrebom tri grupe otprilike slične veličine u koje su objekti nasumično raspoređeni. Takođe su prikazani podaci za unakrsnu validaciju LOO i LTO metodom.

#### 4.3.3. Doking studija za derivate 1b-38b

Molekulski doking je urađen na *m*AChE (PDB oznaka 2HA2, rezolucija 2,02 Å). Atomi aminokiselinskih ostataka koji su nedostajali u PDB fajlu su dodati programom SWISS PDB Viewer.<sup>322</sup> Atomi vodonika su dodati aminokiselinskim ostacima, nepolarni vodonici su spojeni sa susednim atomima i Gaštajgerove šarže su izračunate upotrebom programa AutoDock Tools.<sup>323</sup> Konformacije najniže energije jedinjenja su generisane upotrebom programa OMEGA. Program VegaZZ 2.4 je korišćen kao grafički interfejs. Jedinjenja su dokovana u odgovarajuću kristalnu strukturu programom AutoDock 4.0.1. Doking je urađen upotrebom Lamarkovog Genetskog Algoritma (LGA) kao načina za pretraživanje konfiguracija. Za svako jedinjenje je urađeno 50 izračunavanja, sa početnom populacijom od 250 individua, i maksimalnim brojem od  $1,0 \times 10^7$  procena energija. Rezultujuće doking poze (rešenja) sa RMSD manje od 0,5 Å su grupisane (klasterizovane). Svi drugi parametri zadržani su na preporučenim vrednostima. Klaster najniže energije za svako jedinjenje korišćen je za dalju analizu.

---

\* Pokazuje vrednost koja deli distance u određeni broj opsega vrednosti, korišćena je preporučena vrednost od 0,8.

#### 4.3.4 Simulacija molekulske dinamike kompleksa AChE-jedinjenje (S)-18

Za simulaciju molekulske dinamike korišćena je energetski najbolje rangirana doking poza koja pripada najviše popunjenom klasteru konformacija AChE-(S)18 kompleksa. Sistem je neutralisan u programu VegaZZ dodavanjem eksplicitnih jona natrijuma, i zatim je smešten u klaster eksplicitnih molekula vode, debljine 75 Å, koji okružuje enzim. Za simulaciju MD je korišćen program NAMD<sup>324</sup> sa CHARMM22 poljem sila i Gaštajerovim šaržama. Sistem je minimizovan tokom 30000 koraka (30 ps) algoritmom konjugovanih gradijenata i zatim zagrejan do 300 K u toku 10000 koraka (10 ps). Urađeno je 5 ns produktivne simulacije molekulske dinamike (bez ikakvih primenjenih ograničenja na kretanje atoma) na temperaturi  $300 \pm 10$  K, koja je kontrolisana Lanžvenovim algoritmom, uz upotrebu periodičnih graničnih uslova. Elektrostaticke interakcije su izračunavane Particle Mesh Ewald algoritmom. Cut-off vrednosti za van der Waalove interakcije su podešene na 12 Å, sa postepenim smanjenjem izračunatih vrednosti za ove interakcije (switching) od 8 Å, a parametar 'pair list distance' je podešen na 13,5 Å. Frejmovi trajektorije su čuvani u intervalu od 1 ps, što je dalo 5000 frejmova za celu trajektoriju. Simulacija je urađena na klasteru procesora (Intel Xeon X5560 @ 2,8 GHz) u Linux okruženju. Rezultati su analizirani programom VegaZZ u Windows okruženju.

#### 4.3.5. Dobijanje različitih konformacija jedinjenja 1c-157c

*OMEGA konformacije:* SMILES notacije struktura jedinjenja konvertovane su programom OMEGA u 3D strukture (konformacije) upotrebom MMFF94s polja sila. Korišćene su konformacije najniže energije, dobijene upotrebljenim poljem sila. Model koji je izveden na osnovu ovih konformacija minimalne energije je opisan u tekstu kao „OMEGA model“.

*ROCS konformacije:* Konformacije za drugi model („ROCS model“) dobijene su korišćenjem *bis(7)*takrina kao templata. Konformacija *bis(7)*takrina preuzeta iz kristalne strukture sa AChE (PDB oznaka 2CKM). Koordinate inhibitora su ekstrahovane iz pdb fajla i korišćene su kao predložak za poređenje sa konformacijama dualnih inhibitora (**1c-157c**) uz upotrebu programa ROCS. Za svako jedinjenje je generisano 200 konformacija programom OMEGA sa MMFF94s poljem sila. Za svako jedinjenje je programom ROCS pronađena konformacija koja je najbližnja konformaciji *bis(7)*takrina kokristalisanog sa AChE, po kriterijumu oblika molekula (shape only opcija, farmakoforna sličnost nije korišćena kao kriterijum za pretraživanje). Te konformacije su korišćene za izvođenje modela. Sličnost

konformacija je rangirana na osnovu Tanimoto funkcije sličnosti (Tanimoto cut-off je podešen na -1).

*VINA konformacije:* Za treći model konformacije su dobijene dokingom jedinjenja u kristalnu strukturu AChE (PDB oznaka 2CKM), upotrebom programa AutoDock Vina 1.0. Ligand kokristalisan sa proteinom je odstranjen, a svi molekuli vode u kristalnoj strukturi su zadržani pri izračunavanjima. Kutija koja određuje oblast enzima u koju se ligand smešta prilikom dokinga, uključuje i AS i PAS vezivno mesto AChE i manuelno je definisana programom MGLTools (veličina kutije  $26 \text{ \AA} \times 28 \text{ \AA} \times 20 \text{ \AA}$ ). Rezolucija rešetke unutar kutije je podešena na  $1 \text{ \AA}$ , opcija iscrpnosti je podešena na 20, a opseg energija (energy range) na 4. Ovaj doking protokol je skoro idealno reprodukovao položaj liganda iz kristalne strukture. Za izvođenje modela nisu nužno izabrane doking poze koje su energetski najbolje rangirane. Za inhibitore koji imaju takrinski fragment, izabrana je najbolje rangirana poza kod koje takrinski fragment interaguje sa AS AChE. Takođe je data prednost najbolje rangiranim izduženim pozama inhibitora, u odnosu na savijene. Sve izabrane poze spadale su u prve tri energetski najbolje rangirane poze. Sva izračunavanja urađena su na Linux klasteru procesora (Intel-Xeon-E5345 @ 2,33 GHz) u paralelnom ili sekvencijalnom modu.

## 5. ZAKLJUČAK

Antimitotski agensi predstavljaju važnu klasu lekova za tretman malignih oboljenja i neka od njih ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost vezujući se za tubulin, sprečavajući formiranje deobnog vretena tokom procesa mitoze. Reverzibilni inhibitori acetilholinesteraze se koriste za tretman Alchajmerove bolesti, ali je njihova primena indikovana i kod autoimune bolesti mijastenije gravis, glaukoma, i kao predtretman u slučaju intoksikacija organofosfatnim bojnim otrovima i pesticidima. U ovoj tezi su opisane strukturne modifikacije aroilakrilnih kiselina i njihovih amida koje daju molekule koji sadrže isti substrukturni motiv, ali ispoljavaju biološku aktivnost prema različitim i nesrodnim biološkim metama – tubulinu i enzimima iz grupe holinesteraza.

(*E*)-4-aril-4-okso-2-butenamidi ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost prema tri ćelijske linije humanih tumora (HeLa, FemX i K562) u niskom mikromolarnom ili submikromolarnom opsegu. Jačina antiproliferativnog dejstva svih sintetizovanih derivata (**1a-29a**) je značajno veća od jačine antiproliferativnog dejstva odgovarajuće supstituisanih aroilakrilnih kiselina. Dakle zamena karboksilne grupe cikloheksilamidnom, odnosno nesupstituisanom ili pogodno supstituisanom fenilamidnom grupom značajno povećava jačinu antiproliferativnog dejstva. Derivati supstituisani alkil-grupama na aroil-fenil-delu molekula ispoljavaju najjače antiproliferativno dejstvo. Četrnaest derivata inhibira polimerizaciju tubulina, pri čemu ovi derivati ispoljavaju i skroman efekat inhibicije vezivanja kolhicina za tubulin. Analiza ćelijskog ciklusa ćelija izloženih dejstvu derivata **1a**, **2a**, **14a** i **23a** pokazala je da samo jedinjenja **2a** i **23a** dovode do povećanja broja ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa na koncentraciono zavisani način. Prema tome, postoji najmanje još jedan mehanizam dejstva derivata **1a-29a**, kompetitivan inhibiciji polimerizacije tubulina. Najaktivniji inhibitor polimerizacije tubulina je derivat **1a**, nesupstituisan na aroil-fenil i fenilamidnom prstenu, sa  $IC_{50}=2,9 \mu M$ . Sintetizovani derivati (**1a-29a**) predstavljaju dobre vodeće strukture za dizajn nove klase antitubulinskih agenasa.

Dizajnirana je i sintetizovana kongenerna serija Majklovih adukata sekundarnih amina na amide aroilakrilnih kiselina (4-aril-4-okso-2-aminilbutanamida) u cilju dobijanja jedinjenja koja inhibiraju enzime iz grupe holinesteraza. Strukturne promene na amidnom delu molekula obuhvatile su uvođenje 3,5-dimetoksi ili 4-*i*-Pr supstituenata na fenilamidni prsten, ili zamenu fenilamidnog prstena cikloheksil-grupom, uz zadržavanje alkil-supstituenata (4-*i*-Pr, 2,4-*di-i*-Pr i  $\beta$ -teralinil) na aroil-fenil-prstenu jedinjenja; zato što je

prethodno dokazano da takva supstitucija aroil-dela molekula ima povoljan uticaj na jačinu inhibicionog dejstva. Za Majklovu adiciju na aktiviranu dvostruku vezu, upotrebljeni su sledeći ciklični amini: piperidin, imidazol, morfolin, *N*-metilpiperazin, 4-benzilpiperidin i 4-(2-*N,N*-dimetilaminoetil)-1-piperazin. Dvanaest jedinjenja, uglavnom piperidinski i imidazolski derivati, inhibira AChE u niskom mikromolarnom opsegu koncentracija. Ova jedinjenja su neaktivna prema BChE. Tri jedinjenja su inhibirala BChE u niskom mikromolarnom ili submikromolarnom opsegu. Sva tri jedinjenja imaju 2,4-di-*i*-Pr supstituisani aroil-fenil-prsten i *N*-metilpiperazinski prsten na položaju C2. Kao i kod prethodnog kongenernog seta, priroda cikloalkilamino-grupe utiče na selektivnost jedinjenja. Najaktivniji inhibitor AChE, derivat **17b**, ponaša se kao mešoviti tip inhibitora, što indicira mogućnost vezivanja jedinjenja za slobodan enzim, ali i za enzim-supstrat kompleks. Doking studija, urađena za sedam najaktivnijih inhibitora AChE, pokazala je da svi derivati mogu da formiraju vodoničnu vezu između amidne -NH- grupe i -OH grupe Tyr 124. Simulacija molekulske dinamike kompleksa AChE i jedinjenja **18b**, pokazala je da je ova vodonična veza jedna od najstabilnijih (najpostojanijih) interakcija u kompleksu, zajedno sa CH••• $\pi$  interakcijom koja se formira između metil-grupe *orto-i*-Pr supstituenta na aroil-fenil-prstenu jedinjenja **18b** i indolovog prstena Trp 286. Iako umereno aktivna, jedinjenja se mogu dalje strukturno modifikovati tako da se dobiju derivati sa većom jačinom inhibicionog dejstva prema AChE i BChE.

Da bi dizajnirali nove dualne inhibitore AChE, urađena je 3D-QSAR analiza, zasnovana na deskriptorima nezavisnim od međusobnog svrstavanja molekula (GRIND-2) na setu od 110 strukturno različitih reverzibilnih inhibitora AChE. Za sva tri modela, izvedena korišćenjem različitih konformacija ispitivanih molekula (OMEGA, ROCS i VINA), statistički parametri i prediktivnost modela dobijeni metodom unakrsne validacije su zadovoljavajući. Najvažnije varijable koje imaju veliki uticaj su prisutne u sva tri modela. Prisustvo donora i akceptora vodonične veze u strukturi molekula na određenom međusobnom prostornom rastojanju ima veliki uticaj na jačinu inhibicionog dejstva prema AChE. U ove funkcionalne grupe spadaju protonovani piridinski azot, amino-grupe na linkerima inhibitora i alkoksi-supstituenti na onim delovima molekula koji se vezuju za PAS. Međutim, metod nije bio u mogućnosti da pronade odgovarajuće specifične varijable koje bi opisivale povoljne strukturne elemente jedinjenja za vezivanje za AS odnosno PAS na AChE. Kraće varijable koje bi se mogle povezati sa povoljnom interakcijom sa AS ili PAS obično su bile eksprimovane za sva jedinjenja u setu i bile su povezane sa različitim

strukturnim elementima molekula, čak i unutar istog sabseta jedinjenja. Stoga, relativno kratke varijable su bile znatno manje informativne u objašnjavanju odnosa strukture i aktivnosti za ovaj set inhibitora. Polja molekulskih interakcija (MIF) izračunata za šupljinu aktivnog mesta AChE upotrebom N1= (protonovani piridinski azot) i DRY (hidrofobna) proba, omogućila su identifikaciju aminokiselinskih ostataka (Trp 279, Trp 84, His 440, Tyr 70) koji odgovaraju relativno dugačkim DRY-O varijablama.

Prediktivnost modela procenjena je podelom originalnog seta jedinjenja na osnovni i test set, i pomoću eksternog seta od 40 jedinjenja (test set 2) strukturno različitog od originalnog seta jedinjenja. Aktivnost nekih jedinjenja je određena na enzimu iz različitog izvora (*Hu*AChE). Prediktivnost modela za test set 2 bila je veoma osetljiva na konformacije jedinjenja koje su korišćene. Model zasnovan na VINA konformacijama dobijenim dokingom imao je superiornu prediktivnu sposobnost u odnosu na ostala dva modela, što ukazuje na potrebu da se koriste konformacije jedinjenja koje su dobijene uzimajući u obzir i geometrijska ograničenja šupljine aktivnog mesta AChE. Međutim, sva tri modela, nezavisno od varijacije njihovih statističkih parametara, pružila su isti tip informacije o povoljnim strukturnim elementima za vezivanje za AChE. Takođe, jačina inhibicionog dejstva tri sintetizovana heterodimerna inhibitora zasnovana na strukturi takrina i fenilamida aroilakrilnih kiselina je relativno dobro predviđena VINA modelom.

Do sada objavljene 3D-QSAR studije o reverzibilnim inhibitorima AChE,<sup>309</sup> su uglavnom ograničene na CoMFA/CoMSIA metode, zavisne od međusobnog prostornog svrstavanja molekula, i izvedene su za setove jedinjenja koji su obuhvatali samo neku određenu klasu jedinjenja (tetrahidroaminoakridini, *N*-benzilpiperidini i piperazini, karbamati itd.). Ovakvi modeli, uglavnom imaju veoma dobre statističke parametre i prediktivnost ( $r^2 > 0,9$  i  $q^2 > 0,7$ ), ali se ne mogu upotebiti za predviđanje jačine dejstva jedinjenja koja nisu strukturno slična sa setom jedinjenja iz kojih su modeli izvedeni. Naša studija je pokazala prednosti korišćenja deskriptora koji su nezavisni od međusobnog prostornog svrstavanja molekula. Set jedinjenja koji korišćen u ovoj studiji je do sada jedan od najvećih i strukturno najraznorodnijih setova reverzibilnih inhibitora AChE.

U zaključku, ispitane su različite modifikacije strukturnog skeleta aroilakrilnih kiselina. Amidi aroilakrilnih kiselina ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost, dok neka od ovih jedinjenja inhibiraju polimerizaciju tubulina. Majklovi adukti sekundarnih amina na amide

benzoidakrilnih kiselina inhibiraju holinesteraze (AChE i BChE) i pokazuju zanimljiv profil selektivnosti prema ova dva enzima.

Pokazano je kako jedinjenja dobijena različitim strukturnim modifikacijama, postignutim relativno jednostavnim sintetičkim procedurama, izvedena iz iste osnovne strukture, mogu da izazovu različite biološke odgovore *in vitro*.

## 6. LITERATURA

- <sup>1</sup> J.S. Carey, D. Laffan, C. Thomson, M. T. Williams, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2337.
- <sup>2</sup> A. K. Ghose, V. N. Wiswanadhan, J. J. Wendolski, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55.
- <sup>3</sup> A. W. Hofmann, *Ber.*, **1882**, *15*, 977.
- <sup>4</sup> J. Dunlap, *J. Am. Chem. Soc.* **1902**, *24*, 762.
- <sup>5</sup> Keller, *Prakt. Chem.*, **1885**, *31*, 364.
- <sup>6</sup> Verley, *Bull. Soc. Chim.*, **1893**, *9*, 691.
- <sup>7</sup> (a) G. H. Coleman, A. M. Alvarado, *Organic Syntheses*, **1941**, *1*, 3. (b) L. F. Fieser, J. E. Jones, *Organic Syntheses*, Coll. Vol. III, **1955**, 591. (c) S. R. Sandler, W. Karo, *Organic Functional Group Preparations*, **2<sup>nd</sup> ed.**, Academic Press: London, **1983**, Vol. 1, str. 315. (d) B. C. Challis, J. A. Challis, *Comprehensive Organic Chemistry*, ed. D. H. R. Barton, W. D. Ollis, Pergamon Press: Oxford, **1979**, Vol. 2, 957. (e) J. Zabicky, *The Chemistry of Amides*, ed., John Wiley & Sons: New York, **1970**. (f) S. Patai, *The Chemistry of Carboxylic Acids and Esters*, ed., Interscience Publishers: New York, **1969**.
- <sup>8</sup> M. Bodansky, Y.S. Klausner, M.A. Ondetti, *Peptide Synthesis*, **2<sup>nd</sup> ed.**, J. Wiley, New York., **1976**, str. 89.
- <sup>9</sup> J. C. Sheehan, G.P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067.
- <sup>10</sup> R. H. Lawrence, S. A. Biller, O. M. Fryszman, M.A. Poss, *Synthesis* **1997**, 553.
- <sup>11</sup> M. Bodansky, *The Peptides*, Vol. I, E. Gross, J. Meienhafer, Ed., Academic Press, New York. **1979**, str. 105.
- <sup>12</sup> H.A. Staab, W. Rohr, *Newer Methods of Preparative Organic Chemistry*, Vol. V, Verlag Chemie. Weinheim, **1967**, str.74.
- <sup>13</sup> H. Ogura, T. Kobayashi, K. Shimizu, K. Kawabe, K. Takeda, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *20*, 4745.
- <sup>14</sup> H. Ogura, S. Nagai, K. Takeda, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 1467.
- <sup>15</sup> K. Takeda, I. Sawada, A. Suzuki, H. Ogura, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 4451.
- <sup>16</sup> (a) J.C. Dourtoglou, B. Ziegler, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *19*, 1269. (b) H. Takabu, M. Yoshida, *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 589. (c) U. Schmidt, M. Diestsche, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1982**, *21*, 143. (d) M. Ueda, H. Oikawa, T. Teshirogi, *Synthesis*, **1983**, 908. (e) M. Futukawa, N. Hokawa, T. Okawata, *Synthesis*, **1983**, 42. (f) V. Dourtoglou, B. Gross, *Synthesis*, **1984**, 572. (g) W. Konig, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **1970**, 788. (h) K. Takeda, K. Tsuboyama, K. Yamaguchi, H. Ogura, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 273.
- <sup>17</sup> (a) M. Ueda, K. Seki, Y. Imai, *Synthesis*, **1981**, 991. (b) S. Ohta, A. Shimabavashi, M. Aano, M. Okamoto, *Synthesis*, **1982**, 883. (c) M. Ueda, H. Oikawa, N. Kawaharasaki, Y. Imai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, *56*, 2485. (d) M. Ueda, N. Kawaharasaki, Y. Imai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1984**, *57*, 85.
- <sup>18</sup> (a) H.W. Grimmel, A. Guenther, J.F. Morgan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, *68*, 539. (b) A.G. Jackson, G.W. Kenner, G.A. Moore, R. Ramage, W.D. Thorpe, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, *17*, 3627. (c) C.I. Chiriac, *Rev. Roum. Chim.*, **1979**, *2*, 609. (d) H. Wissman, H-J. Kleiner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1980**, *19*, 133. (e) T. Kunieda, Y. Abe, T. Higuchi, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 1257. (f) J. Cabre, A.L. Palomo, *Synthesis*, **1984**, 413. (g) C.I. Chiriac, *Rev. Roum. Chim.*, **1985**, *30*, 799. (h) M. Ueda, H. Oikawa, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 760. (i) S. Kim, S.S. Kim, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1986**, 719.
- <sup>19</sup> (a) C. D. Schaeffer, L. K. Myers, S. M. Coley, J. C. Otter, C. H. Yoder, *J. Chem. Ed.*, **1990**, *67*, 347. (b) D. H. Harris, M. F. Lappert, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1974**, 895. (c) C. D. Schaeffer, J. J. Zuckerman, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, 7160. (d) P. Foley, M. Zeldin, *Inorg. Chem.*, **1975**, *14*, 2264. (e) C. Burnell-Curty, E. J. Roskamp, *SynLett.*, **1993**, *2*, 131.
- <sup>20</sup> C. Burnell-Curty, E. J. Roskamp, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 5193.
- <sup>21</sup> (a) T. Marcelli, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6840. (b) K. Ishihara, *Tetrahedron*, **2009** (65) 1085; (c) K. Ishihara, S. Ohara, H. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4196. (d) P. Tang, *Org. Synth.* **2005**, *81*, 262. (e) R.M. Al-Zoubi, O. Marion, D.G. Hall, *Angew. Chem. Int. Edn.*, **2008**, *47*, 2876. (f) H. Charville, D. Jackson, G.Hodges, A. Whiting, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1813.
- <sup>22</sup> J.W. Bode, S.S. Sohn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13798.
- <sup>23</sup> P.-C. Chiang, Y.Kim, J.W. Bode, *Chem. Commun.* **2009**, 4566.
- <sup>24</sup> H.U. Vora, T. Rovis, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13796.



- 25 C. Gunanathan, Y. Ben-David, D. Milstein, *Science* **2007**, *317*, 790.
- 26 L.U. Nordström, H. Vogt, R. Madsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17672.
- 27 S. Muthaiah, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3002.
- 28 X. Li, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5446.
- 29 (a) J. Blake, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1981**, *17*, 273. (b) T. Rosen, I.M. Lico, D. T. W. Chu, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1580. (c) T. Messeri, D. D. Sternbach, N. C. O. Tomkinson, *Tetrahedr. Lett.* **1998**, *39*, 1669. (d) T. Messeri, D.D. Sternbach, N. C. O. Tomkinson, *Tetrahedr. Lett.* **1998**, *39*, 1673.
- 30 N. Shanguan, S. Katukojvala, R. Greenberg, L.J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7754.
- 31 (a) Y. Yuan, J. Chen, Q. A. Wan, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Biopolymers* **2010**, *94*, 373. (b) P. Wang, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17045. (c) Y. Rao, X. C. Li, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12924.
- 32 (a) R. S. Talan, A. K. Sanki, S. J. Sucheck, *Carbohydr. Res.* 344 (2009) 2048–2050. (b) D. Crich, K. Sana, S. Guo, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4423.
- 33 D. Crich, K. Sasaki, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3514.
- 34 R. Little, M. Masjedizadeh, O. Wallquist, Mcloughlin, *J. Org. React.*, **1995**, *47*, 315.
- 35 B. Mather, K. Viswanathan, K. Miller, T. Long, *Progress in Polymer Science*, **2006**, *31*, 487.
- 36 A. Michael, *Journal für Praktische Chemie*, **1887**, *35*, 349.
- 37 E. P. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1907**, *37*, 385.
- 38 E. P. Kohler, H. Potter, *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, *57*, 1316.
- 39 P. Sykes, *A guidebook to mechanism in organic chemistry*, 6<sup>th</sup> Ed,
- 40 (a) M. E. Jung, *Stabilized nucleophiles with electron deficient alkenes and alkynes*, Comprehensive organic synthesis. Oxford: Pergamon; **1991**. (b) T.C. Wabnitz, J.Q. Yu, J.B. Spencer, *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 484. (c) T.C. Wabnitz, J.B. Spencer, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 2141. (d) T.C. Wabnitz, J.Q. Yu, J.B. Spencer, *Synth. Lett.*, **2003**, *7*, 1070.
- 41 D. Wu, Y. Liu, C. He, T. Chung, S. Goh, *Macromolecules*, **2004**, *37*, 6763.
- 42 (a) J. M. Hawkins, G. C. Fu, *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 2820. (b) K. Rudolf, J. M. Hawkins, R. J. Loncharich, K. N. Houk, *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 3879. (c) J. M. Hawkins, T. A. Lewis, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 2114.
- 43 S. G. Davies, O. Ichihara, *Tetrahed. Asym.*, **1991**, *2*, 183.
- 44 S. G. Davies, O. Chihara, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1994**, 1141.
- 45 M. E. Bunnage, A. N. Chernega, S. G. Davies, C. J. Goodwin, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1994**, 2373.
- 46 J. F. Costello, S. G. Davies, O. Ichihara, *Tetrahed. Asym.*, **1994**, *5*, 1999.
- 47 S. G. Davies, D. R. Fenwick, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1109.
- 48 I. Brackenridge, S. G. Davies, D. R. Fenwick, O. Ichihara, M. E. C. Polywka, *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 533.
- 49 N. Sewald, *Amino Acids*, **1996**, *11*, 397.
- 50 E. Juaristi, *In Enantioselective Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids*, Wiley-VCH: New York, NY, **1997**, poglavlje 7.
- 51 H. Matsuyama, N. Itoh, M. Yoshida, N. Kamigata, S. Sasaki, M. Iyoda, *Chem. Lett.*, **1997**, 375.
- 52 H. Matsuyama, N. Itoh, M. Yoshida, M. Iyoda, *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **1997**, *475*, 120.
- 53 N. Asao, T. Shimada, T. Sudo, N. Tsukada, K. Yazawa, Y. S. Gyoung, T. Uychara, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 6274.
- 54 M. Liu, M. P. Sibi, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 7991.
- 55 L.-W. Xu, C.-G. Xia, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 633.
- 56 L. Falborg, K. Jørgensen, *A. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**, 2823.
- 57 (a) S.W. Baldwin, J. Aube, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 179. (b) J. E. Baldwin, L. M. Harwood, M. J. Lombard, *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 4363. (c) H. Stamm, H. Steudle, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 3607. (d) D. Keirs, D. Moffat, K. Overton, R. Tomanek, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1991**, 1041.
- 58 D. Perdicchia, K. Jørgensen, *A. J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 3565.
- 59 J. F. Liu, C. H. Heathcock, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 8263–8266.
- 60 O. Fischer, C. Rudolph, *Chem. Ber.* **1882**, *15*, 1500.
- 61 P. Friedlander, *Chem. Ber.* **1882**, *15*, 2572.

- <sup>62</sup> (a) J. M. Muchowski, M. L. Maddox, *Can. J. Chem.* **2004**, *82*, 461. Takođe videti: (b) M. P. Maguire, K. R. Sheets, K. McVety, A. P. Spada, A. Zilberstein, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2129. (c) D. Mabire, S. Coupa, C. Adelinet, A. Poncelet, Y. Simonnet, M. Venet, R. Wouters, A. S. J. Lesage, L. van Beijsterveldt, F. Bischoff, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2134. (d) D. R. Sliskovic, J. A. Picard, W. H. Roark, B. D. Roth, E. Ferguson, B. R. Krause, R. S. Newton, C. Sekerke, M. K. Shaw, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 367.
- <sup>63</sup> (a) Y. Hsiao, N. R. Rivera, N. Yasuda, D. L. Hughes, P. J. Reider, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1101. (b) N. Yasuda, Y. Hsiao, M. S. Jensen, N. R. Rivera, C. Yang, K. M. Wells, J. Yau, M. Palucki, L. Tan, P. G. Dormer, R. P. Volante, D. L. Hughes, P. J. Reider, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1959.
- <sup>64</sup> (a) G. V. Bodrin, P. S. Lempert, S. V. Matveev, P. V. Petrovskii, E. E. Nifant'ev, *Mendeleev Commun.* **2007**, *17*, 25. (b) P. S. Lempert, G. V. Bodrin, M. P. Pasechnik, A. G. Matveeva, P. V. Petrovskii, A. V. Vologzhanina, E. E. Nifant'ev, *Russ. Chem. Bull.* **2007**, *56*, 1911.
- <sup>65</sup> P. G. Dormer, K. K. Eng, R. N. Farr, G. R. Humphrey, J. C. McWilliams, P. J. Reider, J. W. Sager, R. P. Volante, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 467.
- <sup>66</sup> M. Fernandez, F. Lopez, R. Tapia, J. A. Valderrama, *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 3087.
- <sup>67</sup> X. Bu, L. W. Deady, *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 4223.
- <sup>68</sup> N. Desbois, J. -M. Chezal, F. Fauvelle, J. -C. Debouzy, C. Lartigue, A. Gueiffier, Y. Blache, E. Moreau, J.-C. Madelmont, O. Chavignon, J. -C. Teulade, *Heterocycles*, **2005**, *65*, 1121.
- <sup>69</sup> M. Bjork, S. Grivas, *Heterocycles* **2005**, *65*, 2369.
- <sup>70</sup> (a) D. L. Boger, M. Yasuda, L. A. Mitscher, S. D. Drake, P. A. Kitos, S. C. Thompson, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1918. Takođe videti: (b) A. Cappelli, M. Anzini, S. Vomero, P. G. deBenedetti, M. C. Menziani, G. Giorgi, C. Manzoni, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2910. (c) D. Q. Yang, K. L. Jiang, J. N. Li, F. Xu, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7654. (d) D. Q. Yang, W. Guo, Y. P. Cai, L. S. Jiang, K. L. Jiang, X. B. Wu, *Heteroat. Chem.* **2008**, *19*, 229 (e) M. -Z. Piao, K. J. Imafuku, *Heterocycl. Chem.* **1995**, *32*, 1373. (f) M. -Z. Piao, K. J. Imafuku, *Heterocycl. Chem.* **1996**, *33*, 389 (g) T. Mori, K. Imafuku, M. Z. Piao, K. J. Fujimori, *Heterocycl. Chem.* **1996**, *33*, 841.
- <sup>71</sup> (a) S. Chackal, R. Houssin, J. -P. Henichart, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3502. (b) C. L. Diedrich, D. Haase, J. Christoffers, *Synthesis* **2008**, 2199.
- <sup>72</sup> (a) S. Grivas, E. Ronne, *J. Chem. Res.* **1994**, (S), 268. (b) E. Gondek, I. V. Kityk, A. Danel, M. Pokladko, Sanetra, *J. Mater. Lett.* **2007**, *61*, 2018.
- <sup>73</sup> I. Takeuchi, K. Asai, Y. Hamada, K. Masuda, H. Suezawa, M. Hirota, Y. Kurono, K. Hatano, *Heterocycles*, **1996**, *43*, 2139.
- <sup>74</sup> J. Reisch, M. Scheer, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **1987**, *320*, 1174.
- <sup>75</sup> G. Jones, *Quinolines. The Chemistry of Heterocyclic Compounds; Ed.; Wiley: New York, 1977; Vol.32, Part1, p1.*
- <sup>76</sup> S. von Niementowski, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 1394.
- <sup>77</sup> R. H. Manske, *Chem. Rev.* **1942**, *30*, 113.
- <sup>78</sup> R. J. Chong, M. A. Siddiqui, V. Snieckus, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5323.
- <sup>79</sup> M. T. McKenna, G. R. Proctor, L. C. Young, A. L. Harvey, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3516.
- <sup>80</sup> E. J. Barreiro, C. A. Camara, H. Verli, L. Brazil-Mas, N. G. Castro, W. M. Cintra, Y. Aravaca, C. R. Rodriguez, C. A. M. Fraga, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1144.
- <sup>81</sup> (a) A. Martinez-Grau, J. L. Marco, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 3165. (b) J. L. Marco, C. de los Rios, M. C. Carreiras, J. E. Banos, A. Badia, N. M. Vivas, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 727. (c) J. L. Marco, C. De los Rios, M. C. Carreiras, J. E. Banos, A. Badia, N. M. Vivas, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **7** (2002) 347. (d) C. De los Rios, J. L. Marco, M. C. Carreiras, P. M. Chinchon, A. G. Garcia, M. Villarroya, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2077. (e) J. L. Marco, M. C. Carreiras, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 518. (f) J. L. Marco, C. de los Rios, A. G. Garcia, M. Villarroya, M. C. Carreiras, C. Martins, A. Eleuterio, A. Morreale, Orozco, M. F. J. Luque, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2199. (g) R. Leon, J. Marco-Contelles, A. G. Garcia, M. Villarroya, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1167. (h) J. Marco-Contelles, R. Leon, C. De los Rios, A. G. Garcia, M. G. Lopez, M. Villarroya, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8176. (i) J. Marco-Contelles, R. Leon, M. G. Lopez, A. G. Garcia, M. Villarroya, *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1464. (j) J. Marco-Contelles, R. Leon, C. De los Rios, A. Guglietta, J. Terencio, M. G. Lopez, A. G. Garcia, M. Villarroya, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7607. (k) M. C. Carreiras, A. Eleuterio, C. Dias, M. A. Brito, D. Brites, J. Marco-Contelles, E. Gomez-Sanchez,

- Heterocycles* **2007**, *71*, 2249. (l) R. Leon, C. De losRios, J. Marco-Contelles, M. G. Lopez, A. G. Garcia, M. Villarroya, *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 668. (m) R. Leon, C. De losRios, J. Marco-Contelles, O. Huertas, X. Barril, F. J. Luque, M. G. Lopez, A. G. Garcia, M. Villarroya, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7759.
- <sup>81</sup> (a) F. Aguado, A. Badia, J. E. Banos, F. Bosch, C. Bozzo, P. Camps, J. Contreras, M. Dierssen, C. Escolano, D. M. Gorbis, D. Munoz-Torrero, M. D. Pujol, M. Simon, M. T. Vazquez, N. M. Vivas, *Eur. J. Med. Chem.* **1994**, *29*, 205. (b) L. M. Rodrigues, C. S. Francisco, A. M. F. Oliveira-Campos, Salaheldin, A. M. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 4369. (c) P. Camps, R. E. Achab, M. Font-Bardia, D. M. Gorbis, J. Morral, D. Munoz-Torrero, X. Solans, M. Simon, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 5867. (d) A. Badia, J. E. Banos, P. Camps, J. Contreras, D. M. Gorbis, D. Munoz-Torrero, M. Simon, N. M. Vivas, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 427. (e) P. Camps, J. Contreras, M. Font-Bardia, J. Morral, D. Munoz-Torrero, X. Solans, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 835. (f) P. Camps, R. E. Achab, D. M. Gorbis, J. Morral, D. Munoz-Torrero, A. Badia, J. E. Banos, N. M. Vivas, X. Barril, M. Orozco, F. J. Luque, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3227. (g) P. Camps, R. E. Achab, J. Morral, D. Munoz-Torrero, A. Badia, J. E. Banos, N. M. Vivas, X. Barril, M. Orozco, F. J. Luque, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4657. (h) P. Camps, E. Gomez, D. Munoz-Torrero, M. Arno, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2909. (i) P. Camps, E. Gomez, Munoz- D. Torrero, A. Badia, N. M. Vivas, X. Barril, M. Orozco, F. J. Luque, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4733; (j) P. Camps, E. Gomez, D. Munoz-Torrero, M. Font-Bardia, X. Solans, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4143; (k) P. Camps, X. Formosa, D. Munoz-Torrero, J. Petriguet, A. Badia, M. V. Clos, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1701. (l) P. Camps, E. Gomez, D. Munoz-Torrero, A. Badia, M. V. Clos, C. Curutchet, J. Munoz-Muriedas, F. J. Luque, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6833; (m) P. Camps, X. Formosa, C. Galdeano, T. Gomez, D. Munoz-Torrero, M. Scarpellini, E. Viayna, A. Badia, M. V. Clos, A. Camins, M. Pallas, M. Bartolini, F. Mancini, V. Andrisano, J. Estelrich, M. Lizondo, A. Bidon-Chanal, F. J. Luque, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3588; (n) P. Valenti, A. Rampa, A. Bisi, V. Andrisano, V. Cavrini, L. Fin, A. Buriani, P. Giusti, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2599; (o) A. Rampa, A. Bisi, F. Belluti, S. Gobi, P. Valenti, V. Andrisano, V. Cavrini, A. Cavalli, M. Recanatini, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 497.
- <sup>82</sup> M. C. Desai, P. F. Thadeio, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5223.
- <sup>83</sup> Izvuci reference
- <sup>84</sup> J. Meisenheimer, *Liebigs Ann. Chem.* **1902**, *323*, 205.
- <sup>85</sup> B. A. Bolto, M. Liveris, J. Miller, *J. Chem. Soc.* **1956**, 750.
- <sup>86</sup> J. F. Bunnett, T. K. Brotherton, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 155.
- <sup>87</sup> R. Huisgen, J. Sauer, W. Mack, I. Ziegler, *Chem. Ber.* **1959**, *92*, 441.
- <sup>88</sup> (a) J. Savéant, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1990**, *26*, 1. (b) V. Arca, C. Paradisi, G. Scorrano, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3617. (c) J. F. Bunnett, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4477.
- <sup>89</sup> J. Sandosham, K. Undheim, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 275.
- <sup>90</sup> C. L. Liotta, D. F. Pinholster, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1969**, 1245.
- <sup>91</sup> A. J. Belfield, C. R. Brown, A. J. Foubister, P. D. Ratcliffe, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13285.
- <sup>92</sup> (a) S. M. Stein, A. V. Evstifeev, *Zh. Obshch. Khim.* **1968**, *38*, 487; (b) *Chem. Abstr.* **1968**, *69*, 58659.
- <sup>93</sup> (a) F. Effenberger, W. Streicher, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 157. (b) F. Effenberger, M. Koch, W. Streicher, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 163. (c) I. A. Khalfina, V. M. Vlasov, *J. Phys. Org. Chem.* **2007**, *20*, 369.
- <sup>94</sup> E. Koenigs, H. C. Gerdes, A. Sirot, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1928**, *61*, 1022.
- <sup>95</sup> J. Miller, K.-Y. Wan, *J. Chem. Soc.* **1963**, 3492.
- <sup>96</sup> (a) F. Sanger, *Biochem. J.* **1945**, *39*, 507. (b) F. Sanger, *Science* **1959**, *129*, 1340.
- <sup>97</sup> (a) C. W. L. Bevan, *J. Chem. Soc.* (1951) 2340. (b) N. B. Chapman, R. E. Parker, *J. Chem. Soc.* **1951** 3301. (c) A. L. Beckwith, J. Miller, G. D. Leary, *J. Chem. Soc.* **1952**, 3552. (d) G. P. Briner, J. Miller, M. Liveris, P. G. Lutz, *J. Chem. Soc.* **1954**, 1265. (e) N. B. Chapman, R. E. Parker, P. W. Soanes, *J. Chem. Soc.* **1954**, 2109. (f) G. S. Hammond, L. R. Parks, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 340. (g) Bunnett, J. F.; Garbisch, E. W.; Pruitt, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 385. (h) J. F. Bunnett, W. D. Merritt, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5967. (i) R. E. Parker, T. O. Read, *J. Chem. Soc.* **1962**, *9*. (j) R. E. Parker, T. O. Read, *J. Chem. Soc.* **1962**, 3149. (k) H. Suhr, *Chem. Ber.* **1964**, *97*, 3268.
- <sup>98</sup> M. Schlosser, T. Rausis, *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 1240.
- <sup>99</sup> M. Schlosser, J. H. Choi, S. Takagishi, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5633.

- 100 C. R. Kolder, H. J. DenHertog, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1953**, 72, 285.
- 101 J. J. DenHertog, C. Jouwersma, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1953**, 72, 44.
- 102 M. Schlosser, C. Bobbio, T. Rausis, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2494.
- 103 E. Fischer, *Liebigs Ann. Chem.* **1887**, 239, 248.
- 104 L. F. Audrieth, J. R. Weisiger, H. E. Carter, *J. Org. Chem.* **1941**, 6, 417.
- 105 C. Ainsworth, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 1636.
- 106 M. J. Hearn, E. S. Chung, *Synth. Commun.* **1980**, 10, 253.
- 107 C. Bobbio, T. Rausis, M. Schlosser, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 1903.
- 108 (a) I. Hayakawa, T. Hiramitsu, Y. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 4907; (b) S. Atarashi, S. Yokahama, K. Sakano, M. Imamura, I. Hayakawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 1896; (c) S. Radl, D. Bouzard, *Heterocycles*, **1992**, 34, 2143.
- 109 R. D. Cramer, D.E. Patterson, J. D. Bunce, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5959.
- 110 M. Clark, R. D. Cramer, *Quant. Struct. Act. Relat.* **1993**, 12, 137.
- 111 J. Cho, A. Tropsha, *J. Med. Chem* **1995**, 38, 1060.
- 112 K. Hasegawa, Y. Miyashita, K. J. Funatsh, *Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, 37, 306.
- 113 M. Baroni, G. Constantino, G. Cruciani, Riganelli, R. Valigi, S. Clementi, *Quantum Struct.-Act. Relat.* **1993**, 12, 9.
- 114 B.D. Silverman, D.E. Platt, M. Pitman, I. Rigoutsos, *Comparative molecular moment analysis (CoMMA)*, in Kubinyi, H., Folkers, G. and Martin, Y.C. (Eds.) *3D QSAR in drug design: Vol. 3*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, **1998**, str. 183.
- 115 T.W. Heritage, A.M. Ferguson, D.B. Turner, P. Willett, *EVA — a novel theoretical descriptor for QSAR studies*, In Kubinyi, H., Folkers, G. and Martin, Y.C. (Eds.) *3D QSAR in drug design: Vol. 2*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, **1998**, str. 381.
- 116 R. Todeschini, P. Gramatica, New 3D molecular descriptors: *The WHIM theory and QSAR applications*. In Kubinyi, H., Folkers, G. and Martin, Y.C. (Eds.) *3D QSAR in drug design: Vol. 2*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, **1998**, 355.
- 117 P. J. Goodford, *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 849.
- 118 Cruciani, G. (edited by), *Molecular Interaction Fields – Applications in Drug Discovery and ADME Prediction*, Wiley VCH Verlag
- 119 Bohm, M.; Sturzebecher, J.; Klebe, G.; *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 458.
- 120 H. Kubinyi, G. Folkers, Y. C. Martin, *3D QSAR in Drug Design*, Kluwer/ESCOM, Dordrecht, **1998**, Vol. 2-3.
- 121 G. Cruciani, M. Pastor, V. Guba, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 11, S29.
- 123 M. Pastor, G. Cruciani, I. McLay, S. Pickett, S. Clementi, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3233.
- 124 ALMOND 3.3.0, Molecular Discovery Ltd. (UK) i Tripos (USA), **2004**.
- 125 Pentacle 1.0.1, prerelease, Molecular Discovery Ltd. (UK), **2009**.
- 126 F. Fontaine, M. Pastor, F. Sanz, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2805.
- 127 A. Duran, G. C. Martinez, M. Pastor, *J. Chem. Inf. Mod.* **2008**, 48, 1813.
- 128 D. Riganelli, R. Valigi, G. Constantino, M. Baroni, S. Wold, *Phar. Pharmacol. Lett.* **1993**, 3, 5.
- 129 D. Lay, *Linear Algebra and Its Applications*, Addison-Wesley, New York, **2000**.
- 130 A. Hoskuldson, *J. Chemometr.* **1998**, 2, 211.
- 131 P. Geladi, B. Kowalski, *Analyt. Chim. Acta*, **1988**, 35, 1.
- 132 (a) L. A. Ligon, S. S. Shelly, M. Tokito, E. L. Holzbaur, *Mol. Biol. Cell*, **2003**, 14, 1405; (b) C. M. Galmarini, et al. *Br. J. Cancer*, **2003**, 88, 1793; (c) A. Giodini, et al. *Cancer Res.* **2002**, 62, 2462; (d) L. Cassimeris, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, 14, 18; (e) C. Spittle, S. Charrasse, C. Larroque, L. Cassimeris, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 20748; (f) T. Maney, M. Wagenbach, L. Wordeman, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 34753.
- 133 (a) L. Wordeman, T. J. Mitchison, in *Microtubules* (eds Hyams, J. S. & Lloyd, C. W.) 287–302 (Wiley–Liss, New York, 1994); (b) L. Wilson, M. A. Jordan, in *Microtubules* (eds Hyams, J. S. & Lloyd, C. W.) 59–84 (Wiley–Liss, New York, 1994); (c) J. R. McIntosh, in *Microtubules* (eds Hyams, J. S. & Lloyd, C. W.) 413–434 (Wiley–Liss, New York, 1994). (d) C. Waterman-Storer, E. D. Salmon, *Curr. Biol.* **1997**, 7, 369.
- 134 T. J. Mitchison, M. Kirschner, *Nature*, **1984**, 312, 237.

- 135 (a) R. L. Margolis, L. Wilson, *Cell*, **1978**, *13*, 1; (b) R. L. Margolis, L. Wilson, *Bioessays* **1998**, *20*, 830; (c) V. I. Rodionov, G. G. Borisy, *Science* **1997**, *275*, 215; (d) S. L. Shaw, R. Kamyar, D. W. Ehrhardt, *Science*, **2003**, *300*, 1715. (e) D. Panda, H. P. Miller, L. Wilson, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 12459.
- 136 W. Chen, D. Zhang, *Nature Cell Biol.* **2004**, *6*, 227.
- 137 L. Wilson, D. Panda, M. A. Jordan, *Cell Struct. Funct.* **1999**, *24*, 329.
- 138 (a) E. Nogales, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 397; (b) L. Wilson, M. A. Jordan, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 569. (c) H. Lodish, et al. *Molecular Cell Biology* (W. H. Freeman, New York, **1999**).
- 139 (a) D. Panda, H. Miller, L. Wilson, *Biochemistry* *41* (2002) 1609–1617. (b) M. Caplow, L. Fee, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 2122.
- 140 D. Panda, H. P. Miller, L. Wilson, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 12459.
- 141 (a) T. J. Mitchison, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1988**, *4*, 527; (b) W. M. Saxton, et al. *J. Cell Biol.* **1984**, *99*, 2175; (c) N. M. Rusan, C. J. Fagerstrom, A.-M. C. Yvon, P. Wadsworth, *Mol. Biol. Cell*, **2001**, *12*, 971.
- 142 R. Pepperkok, M. H. Bre, J. Davoust, T. E. Kreis, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 3003.
- 143 Y. Zhai, P. J. Kronebusch, P. M. Simon, G. G. Borisy, *J. Cell Biol.* **1996**, *135*, 201.
- 144 J. J. Hayden, S. S. Bowser, C. Rieder, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 1039.
- 145 M. A. Jordan, et al. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 816.
- 146 (a) E. Nogales, S.G. Wolf, A. Khan, R.F. Luduena, K. H. Downing, *Nature*, **1995**, *375*, 424; (b) E. Nogales, S. G. Wolf, K.H. Downing, *Nature*, **1998**, *391*, 199.
- 147 J. Lowe, H. Li, K. H. Downing, E. Nogales *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 1045.
- 148 E. Nogales, M. Whittaker, R.A. Milligan, K.H. Downing, *Cell*, **1999**, *96*, 79.
- 149 (a) J. Zhou, *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 799; (b) E. Hamel, D. G. Covell, *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* **2002**, *2*, 19.
- 150 (a) M. A. Jordan, *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, **2002**, *2*, 1; (b) J. Jimenez-Barbero F. Amat-Guerri, J. P. Snyder, *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*, **2002**, *2*, 91.
- 151 S.L. Wallace, **1974**, *3*, 369.
- 152 (a) S. B. Hastie, 512 (1991) 377–401; (b) D. Skoufias, L. Wilson, *Biochemistry* *31* (1992) 738–746.
- 153 R.B. Ravelli, B. Gigant, P. A. Curmi, I. Jourdain, S. Lachkar, A. Sobel, M. Knossow, *Nature* *428* (2004) 198–202.
- 154 (a) T. J. Fitzgerald, *Biochem. Pharmacol.* **1976**, *25*, 1383; (b) J. M. Andreu, M. J. Gorbunoff, J.C. Lee, S.N. Timasheff, *Biochemistry*, **1984**, *23*, 1742; (c) Y. Engelborghs, T.J. Fitzgerald, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5204; (d) M. Menendez, J. Laynez, F. J. Medrano, J. M. Andreu, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 16367; (e) G. Chakrabarti, S. Sengupta, B. Bhattacharyya, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2897.
- 155 F. Cortese, B. Bhattacharyya, J. Wolff, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1134.
- 156 B. Bhattacharyya, J. Wolff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1974**, *71*, 2627.
- 157 M. Rosner, H. G. Capraro, A. E. Jacobson, L. Atwell, A. Brossi, M. Alorio, T. H. Williams, R. H. Sik, C. F. Chignell, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 257.
- 158 (a) E. Hamel, H. H. Ho, G. J. Kang, C. M. Lin, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2445; (b) A. Brossi, P. N. Sharma, L. Atwell, A. E. Jacobson, M. Alorio, M. Molinari, C. F. Chignell, *J. Med. Chem.* **1983**, *26* 1365.
- 159 W. O. McClure, J. C. Paulson, *Mol. Pharmacol.* **1977**, *13*, 560.
- 160 C. Dumortier, Q. Yan, S. Bane, Y. Engelborghs, *Biochem. J.* **1997**, *327*, 685.
- 161 (a) M. H. Zweig, C.F. Chignell, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 2141. (b) S. B. Hastie, T. L. Macdonald, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 1271.
- 162 A. Edstrom, M. Hanson, M. Wallin, B. Cederholm, *Acta. Physiol. Scand.* **1979**, *107*, 233.
- 163 S. B. Hastie, *Biochemistry*, **1989**, *28*, 7753.
- 164 K. Nakagawa-Goto, C. X. Chen, E. Hamel, C. C. Wu, K. F. Bastow, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 235.
- 165 T.L. Nguyen, C. McGrath, A. R. Hermone, C. Burnett, D. W. Zaharevitz, B. W. Day, P. Wipf, E. Hamel, R. Gussio, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6107.
- 166 (a) K. Grosios, S. E. Holwell, A. T. McGown, G. R. Pettit, M. C. *Br. J. Cancer*, **1999**, *81*, 1318; (b) C. M. L. West, P. Price, *Anticancer Drugs*, **2004**, *15*, 179; (c) S. L. Young, D. J. Chaplin, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2004**, *13*, 1171.

- 167 R. Romagnoli, P. G. Baraldi, M. G. Pavani, M. A. Tabrizi, D. Preti, F. Fruttarolo, L. Piccagli, M. K. Jung, E. Hamel, M. Borgatti, R. Gambari, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3906.
- 168 S. L. Mooberry, *Drug Resist. Update*, **2003**, *6*, 355.
- 169 (a) P. Wipf, W. Xu, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6556; (b) P. Wipf, J. T. Reeves, B. W. Day, *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1417; (c) P. Verdier-Vinard, N. Sitachitta, J. V. Rossi, D. L. Sackett, W. H. Gerwick, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *370*, 51.
- 170 A. V. Blokhin, H. D. Yoo, R. S. Gerald, D. G. Nagle, W. H. Gerwick, et al. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 523.
- 171 T. Beckers, T. Reissmann, M. Schmidt, A. M. Burger, H. H. Fiebig, et al. *Cancer. Res.* **2002**, *62*, 3113.
- 172 (a) H. Shih, L. Deng, C. J. Carrera, S. Adachi, H. B. Cottam, et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 487; (b) X. H. Hua, D. Genini, R. Gussio, R. Tawatao, H. Shih, et al., *Cancer Res.* **2001**, *61*, 7248; (c) L. I. Kruse, D. L. Ladd, P. B. Harsch, F. L. McCabe, S. M. Mong, et al., *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 409.
- 173 M. Leoni, E. Hamel, D. Genini, H. Shih, C. J. Carrera, H. B. Cottam, D. A. Carson, *J. Natl. Cancer. Inst.* **2000**, *92*, 217.
- 174 M. R. Mejillano, B. D. Shivanna, R. H. Himes, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *336*, 130.
- 175 P. A. Friedman, E. G. Platzter, *Biochim. Biophys. Acta*, **1978**, *544*, 605.
- 176 S. Desbene, S. Giorgi-Renault, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, **2002**, *2*, 71.
- 177 (a) A. Yokoi, J. Kuromitsu, T. Kawai, T. Nagasu, N. H. Sugi, et al., *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 275; (b) T. Owa, A. Yokoi, K. Yamazaki, K. Yoshimatsu, T. Yamori, et al. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4913.
- 178 M. Bazelyanski, *Biochemistry*, **1986** *25*, 125.
- 179 L. M. C. Hall, P. Spierer, *EMBO Journal*, **1986**, 2949.
- 180 J. Massoulie, A. Anselmet, S. Bon, E. Krejci, C. Legay, N. Morel, S. Simon, *Chemico-Biological Interactions*, **1999**, *119*, 29.
- 181 K. MacPhee-Quigley, T. S. Vedvick, P. Taylor, S. S. Taylor, *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261*, 13565.
- 182 O. Lockridge, *J. Bio. Chem.* **1982**, *257*, 12012.
- 183 M. Vigny, G. R. Martin, G. R. Grotendorst, *J. Biol. Chem.* **1982**, *258*, 8794.
- 184 M. Shumacher, S. Camp, Z. Maulet, M. Newton, K. MacPhee-Quigley, S. S. Taylor, P. Taylor, *Nature*, **1986**, *319*, 407.
- 185 O. Lockridge, C. F. Bartels, T. A. Vaughan, S. E. Norton, L. L. Johnson, *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 549.
- 186 O. Lockridge, A. Chatonnet, *Biochem. J.* **1989**, *260*, 625.
- 187 O. Lockridge, C. F. Bartels, T. A. Vaughan, C. K. Wong, S. E. Norton, L. L. Johnson, *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 549.
- 188 A. Saxena, A. M. G. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, B. P. Doctor, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 14642.
- 189 Gibney, et al. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, **1990**, *870*, 7546.
- 190 A. Shafferman, et al *EMBO Journal*, **1992**, *11*, 3561.
- 191 Z. Radic, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 9760.
- 192 M. Ekholm, H. Konschin, *J. Mol. Structure*, **1990**, *467*, 161.
- 193 A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, N. Ariel, Y. Segall, B. Velan, A. Shafferman, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 19509.
- 194 (a) H. J. Kreienkamp, C. Weise, R. Raba, A. Aaviksar, F. Hucko, *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, **1991**, *88*, 6117; (b) C. Weise, H. J. Kreienkamp, R. Raba, A. Pedak, A. Aaviksar, F. Hucko, *EMBO Journal*, **1990**, *9*, 3385; (c) J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science*, **1991**, *253*, 872; (d) A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, U. Flashner, M. Leitner, Y. Segall, N. Ariel, S. Cohen, B. Velan, A. Shafferman, *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 17083.
- 195 (a) Z. Radic, V. Pickering, D. C. Vellom, S. Camp, P. Taylor, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 12074; (b) M. Harel, J. L. Sussman, E. Krejci, S. Bon, P. Chanal, J. Massoulie, I. Silman, *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, **1992**, *89*, 10827; (c) A. Saxena, N. Quian, I. M. Kovach, A. P. Kozikovski, Y. P. Pang, D. C. Vellom, Z. Radic, D. Quinn, P. Taylor, B. P. Doctor, 1994, *Protein Science*, **1994**, *3*, 1770; (d) Y. Ashani, J. Grunwald, C. Kronman, B. Velan, A. Shafferman, *Mol. Pharmac.*, **1994**, *45*, 555.
- 196 D. C. Vellom, Z. Radic, L. Ying, N. A. Pickering, S. Camp, P. Taylor, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 12.

- 197 (a) P. Taylor, N. Lappi, *Biochemistry*, **1975**, *16*, 3870; (b) D. Barak, C. Kronman, A. Ordentlich, A. Naomi, A. Bromberg, D. Marcus, A. Lazar, B. Velan, A. Shafferman, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *264*, 6296; (c) Y. Bourne, P. Taylor, Z. Radic, P. Marchot, *EMBO Journal*, **2003**, *22*, 1.
- 198 T. Y. Shen, K. Tai, R. H. Henchman, J. A. Mc Cammon, *Acc. Chem. Res.*, **2002**, *35*, 332.
- 199 P. H. Axelsen, M. Harel, I. Silman, J. L. Sussman, *Protein Sci.* **1994**, *3*, 188.
- 200 M. K. Gilson, T. P. Straasma, J. A. McCammon, D. R. Ripoll, C. H. Faerman, *Science*, **1994**, *263*, 1276.
- 201 I. M. Kovach, N. Quian, A. Bencsura, *FEBS Lett.* **1994**, *349*, 60.
- 202 K. Tai, T. Shen, U. Borjesson, M. Philippopoulos, J. A. McCammon, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 715.
- 203 Y. Xu, J. Colletier, M. Weik, H. Jiang, J. Moul, I. Silman, J. L. Sussman, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 2500.
- 204 S. Tara, T. P. Straasma, J. A. McCammon, *Biopolymers*, **1999**, *50*, 35.
- 205 C. Kronman, A. Ordentlich, D. Barak, B. Velan, A. Shafferman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27819.
- 206 C. Faerman, D. Ripoll, S. Bon, Y. Le Feuvre, N. Morel, *FEBS Lett.* **1996**, *386*, 65.
- 207 C. Bertolucci, E. Perola, L. Cellai, M. Brufani, D. Lamba, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 5714.
- 208 (a) Z. Radić, R. Duran, D. Vellom, Y. Li, C. Cervenansky, P. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11233; (b) P. Marchot, A. Khelif, Y. H. Ji, P. Mansuelle, P. E. Bougisil, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12458; (c) Z. Radić, T. Palmer, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4622.
- 209 S. Simon, A. Le Goff, Y. Frobert, J. Grass, J. Massoulie, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 27740.
- 210 S. T. Wlodek, T. W. Clark, L. R. Scott, J. A. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9513.
- 211 K. Tai, T. Shen, R. H. Henchman, Y. Bourne, P. Marchot, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6153.
- 212 Y. Bourne, P. Taylor, P.E. Bougis, P. Marchot, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2963.
- 213 N. Ariel, D. Barak, B. Velan, A. Shafferman, *Medical Defense Bioscience Review, Proceedings: Baltimore*, **1996**, 97.
- 214 H. Van Tilbereghe, M. P. Egloff, C. Martinez, N. Rugani, R. Verger, *Nature*, **1993**, *362*, 814.
- 215 D. M. Lawson, A. M. Brzozowski, G. G. Dosson, *Curr. Biol.* **1992**, *2*, 473.
- 216 B. Velan, D. Barak, N. Ariel, M. Leitner, T. Bino, *FEBS Lett.* **1996**, *395*, 22.
- 217 K. L. Davis, P. Powchik, *Lancet*, **1995**, *343*, 625.
- 218 H. M. Bryson, P. Benfield, *Drugs Aging*, **1997**, *10*, 234 i 240.
- 219 C. Gabelli, *Curr. Med. Res. Opin.* **2002**, *19*, 69.
- 220 J. J. Sramek, E. J. Franckiewicz, N. R. Cutler, *Expert. Opin. Invet. Drugs*, **2000**, *9*, 2393.
- 221 (a) M. M. Mesulam, , *Neuroscience* **1986**, *17*, 275; (b) C. Geula, , M. M. Mesulam, , *Brain Res.* **1989**, *498*, 185; (c) K. A. Carson, C. Geula, M. M. Mesulam, *Brain Res.* **1989**, *540*, 204; (d) M. A. Moran, E. J. Mufson, P. Gomez-Ramos, *Acta Neuropathol*, **1993**, *85*, 362.
- 222 N. C. Inestrosa, A. Alvarez, A. C. Perez, R. D. Moreno, M. Vicente, C. Linker, O. I. Casanueva, , C. Soto, J. Garrido, *Neuron*, **1996**, *16*, 881.
- 223 G. V. De Ferrari, M. A. Canales, I. Shin, L. M. Weiner, I. Silman, N. C. Inestrosa, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 10447.
- 224 A. Alvarez, R. Alarcon, C. Opazo, E. O. Campos, F. J. Munoz, F. H. Calderon, F. Dajas, M. K. Gentry, B. P. Doctor, F. G. De Mello, N. C. Inestrosa, *The Journal of Neuroscience*, **1998**, *18* , 3213.
- 225 (a) A. L. Guillozet, J. F. Smiley, D. C. Mash, M. M. Mesulam, *Annals of Neurology*, **1997**, *42*, 909; (b) N. Greig, T. Utsuki, Y. Quian-Sheng, X. Zhu, H. W. Holloway, T. A. Perry, B. Lee, D. K. Ingram, D. K. Lahiri, *Curr. Med. Res. Opin.* **2001**, *17*, 159; (c) A. Fisher, R. Brandeis, R. Haring, N. Bar-Ner, M. Kliger-Spaz, N. Natan, H. Sonego, I. Marcovitch, L. Pittel, *Journal of Neural Transmission*, **2002**, *62*, 189; (d) T. G. Beach, D. G. Walker, P. E. Potter, L. I. Sue, A. Fisher, *Brain Research*, **2001**, *905*, 220; (e) H. Soreq, S. Seidman, *Neuroscience*, **2001**, *2*, 294.
- 226 W. C. Wallace, V. Bragin, N. K. Robakis, K. Sambamurti, D. Vanderputten, C. R. Merrill, K. L. Davis, A. C. Santucci, V. Haroutunian, *Brain Research and Molecular Brain Research* **1991**, *10*, 137.
- 227 W. C. Wallace, I. Lieberburg, D. Schenk, C. Vigo-Pelfrey, K. L. Davis, V. Haroutunian, *Journal of Neurosciences*, **1995**, *15*, 4896.
- 228 E. Shohani, D. Kaufer, Y. Chen, S. Seidman, O. Cohen, D. Ginzberg, N. Melamed-Book, R. Yirmiya, H. Soreq, *J. Mol. Med.*, **2000**, *78*, 228.
- 229 D. Kaufer, A. Freidman, S. Seidman, H. Soreq, *Nature*, **1998**, *393*, 373.

- 230 (a) A. Robitzki, A. Mack, U. Hoppe, A. Chattonet, P. G. Layer, *Eur. J. Neurosci.*, **1997**, *9*, 2394; (b) G. Johnson, S. W. Moore, *Int. J. Devl. Neurosci.*, **2000**, *18*, 781; (c) C. Koenigsberger, S. Chiappa, S. Brimjoin, *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 1389; (d) P. G. Genever, M. A. Birch, E. Brown, T. M. Skery, *Bone*, **1999**, *24*, 297; (e) F. J. Munoz, R. Aldunate, N. C. Inestrosa, *NeuroReport*, **1999**, *10*, 3621.
- 231 T. Thomsen, B. Zendek, J. P. Fisher, H. Kewitz, *Biochemical Pharmacology*, **1991**, *41*, 131.
- 232 (a) N. Cutler, R. Hartman, J. Messina, *Biol. Psychiatry*, **2000**, *47*, 161; (b) S. Darvesh, R. Walsh, R. Kumar, A. Caines, S. Roberts, D. Magee, K. Rockwood, E. Martin, *Alzheimers Disease and Associated Disorders*, **2003**, *17*, 117; (c) S. S. Jhee, T. Shiovitz, R. D. Hartman, J. Mesina, R. Amand, J. Sramek, N. R. Cutler, *Neuropharmacology*, **2002**, *25*, 122.
- 233 J. R. Atack, E. K. Perry, J. R. Bonham, J. M. Candy, R. H. Perry, *Journal of Neurochemistry*, **1986**, *47*, 363.
- 234 E. K. Perry, R. H. Perry, G. Blaessed, B. E. Tomlinson, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **1978**, *4*, 273.
- 235 K. Barber, M. Mesulam, G. Kraft, W. Klein, *Proc. Soc. Neurosci* **1996**, *22*, 1172.
- 236 D. K. Lahiri, M. K. Harlow, N. Hintz, et al. *Acta Neurol. Scan.*, **2000**, *102*, 60.
- 237 K. T. Y. Show, T. Utsuki, J. Rogers, *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, **2001**, *98*, 7605.
- 238 M. M. Mesulam, A. Guillozet, P. Show, A. Levey, E. G. M. Duysen, O. Lockridge, *Neuroscience*, **2002**, *110*, 627.
- 239 B. Li, J. A. Stribley, A. Tieu, W. Xie, L. M. Shpfer, P. Hammond, S. Brimjoin, S. H. Hinrichs, , O. Lockridge, *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 1320.
- 240 P. G. Layer, T. Weikart, E. Willbold, *Cell tissue Research*, **1992**, *268*, 409.
- 241 A. Robitzki, A. Mack, A. Chattonet, P. G. Layer, *J. Neurochem.*, **1997**, *69*, 823.
- 242 A. Chattonet, P. Masson, *Biochimie*, **1986**, *68*, 657.
- 243 A. Guillozet, J. F. Smiley, D. C. Mash, M. M. Mesulam, *Ann. Neurol.*, **1997**, *42*, 909.
- 244 J. Saez-Valero, D. H. Small, *Brain Res.* **2001**, *889*, 247.
- 245 J. Saez-Valero, C. J. Vidal, *BBA*, **1996**, *1317*, 210.
- 246 J. Saez-Valero, G. Poza-Cisneros, C. J. Vidal, *Neurosci. Lett.* **1996**, *206*, 173.
- 247 M. S. Garcia-Ayllon, J. Saez-Valero, C. Piqueras-Perez, C. J. Vidal, *Neurosci. Lett.*, **1999**, *274*, 6.
- 248 N. Brass, A. Racz, D. Heckel, K. Remberger, G. W. Sybrecht, E. U. Meese, *Cancer Res.*, **1997**, *57*, 2290.
- 249 Y. Lapidot-Lifson, C. Prody, D. Ginzberg, D. Meytes, H. Zakut, H. Soreq, *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, **1989**, *86*, 4715.
- 250 H. Zakut, G. Erlich, A. Ayalan, C. A. Prody, G. Malinger, S. Seidman, D. Ginzberg, R. Kahlenbach, H. Soreq, *J. Clin. Invest.*, **1990**, *86*, 900.
- 251 T. R. Sidell, E. T. Takafuji, D. R. Franz, *Textbook of Military Medicine. Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Washington, D.C: Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center, **1997**: 181.
- 252 D. S. Janowsky, J. M. Davis, D. H. Overstreet, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, *77*, 337.
- 253 Y. Ashani, J. Grunwald, D. Alkalai, *Proceedings of Medical Defence Bioscience Review*, Aberdeen Proving Ground, MD, US Army Medical Research Institute of Chemical Defense, **1996**, 100.
- 254 B. M. Conti-Fine, M. Milani, H. J. Kaminski, *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2843.
- 255 M. Harel, J. L. Sussman, E. Krejci, S. Bon, P. Chanal, J. Massoulie, I. Silman, *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, **1992**, *89*, 10827.
- 256 E. H. Rydberg, B. Brumshtein, H. M. Greenblat, D. M. Wong, D. Shaya, L. D. Williams, P. R. Carlier, Y.-P. Pang, I. Silman, J. Sussman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5491.
- 257 G. Kryger, I. Silman, J. L. Sussman, *Structure*, **1999**, *7*, 297.
- 258 X. Z. Zhu, X. Y. Li, J. Liu, *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *500*, 221.
- 259 A. P. Kozikowski, W. Tuckmantel, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 641.
- 260 D. L. Bai, X. C. Tang, X. C. He, *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 355.
- 261 M. L. Raves, M. Harel, Y. P. Pang, I. Silman, A. P. Kozikowski, J. L. Sussman, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 57.
- 262 T. Thomsen, H. Kewic, *Life Sci.*, **1990**, *46*, 1553.
- 263 H. M. Greenblat, G. Kryger, T. Lewis, I. Silman, J. L. Sussman, *FEBS Letters*, **1999**, *463*, 321.
- 264 J. Vaya, P. A. Belinsky, M. Aviram, *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *23*, 302.



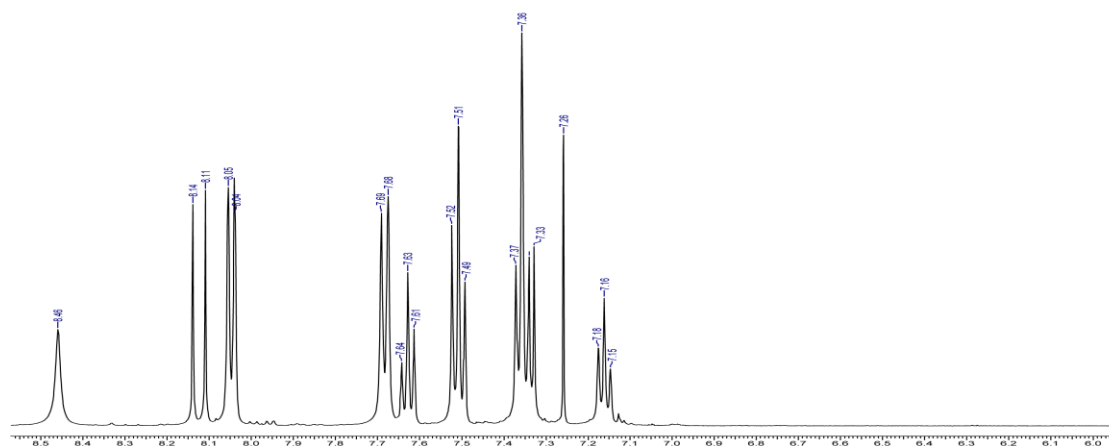
- 265 M. Chen, S. B. Christensen, L. Zhai, M. H. Rasmunssen, T. G. Theander, S. Frokajaer, B. Steffensen, J. Davidson, A. Kharazmi, *J. Infect. Dis.* **1997**, *176*, 1327.
- 266 S. F. Nielsen, S. B. Christensen, G. Cruciani, A. Kharazmi, T. Liljefors, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4819.
- 267 Y. H. Kim, J. Kim, H. Park, H. P. Kim, *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 1450-1455.
- 268 A. Boumendjel, X. Ronot, J. Boutonnat, *Curr. Drug Targets*, **2009**, *10*, 363-371.
- 269 (a) M. Cabrera, M. Simoens, G. Falchi, M. L. Lavaggi, O. E. Piro, E. E. Castellano, A. L. Vidal, A. Azqueta, A. Monge, A. Lopezde Cerain, G. Sagrera, G. Seoane, H. Cerecetto, M. Gonzalez, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3356. (b) C. Nakamura, N. Kawasaki, H. Miyataka, E. Jayachandran, I. H. Kim, K. L. Kirk, T. Taguchi, Y. Takeuchi, H. Horie, T. Satoha, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 699. (c) A. Modzelewska, C. Pettit, G. Achanta, N. E. Davidson, P. Huang, S. R. Khan, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3491. (d) X. Liu, M. Go, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 153.
- 270 H. Halbwirth, *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 595.
- 271 P. W. Snijman, E. Joubert, D. Ferreira, X. -C. Li, Y. Ding, I. R. Green, W. C. A. Gelderblom, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6678.
- 272 Videti na primer: (a) A. -M. Katsori, D. Hadjipavlou-Litina, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1062; (b) D. I. Batovski, S. P. Parushev, *Int. J. Curr. Chem.* **2010**, *1*, 217; (c) A. Boumendjel, J. Bocard, P. A. Carrupt, E. Nicolle, M. Blanc, A. Geze, L. Choisnard, D. Wouessidjewe, E. -L. Matera, C. Dumontet, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2307.
- 273 M. Bazzaro, R. K. Anchoori, M. K. R. Mudiam, O. Issaenko, S. Kumar, B. Karanam, Z. Lin, R. Isaksson Vogel, R. Gavioli, F. Destro, V. Ferretti, R. B. S. Roden, S. R. Khan, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 449.
- 274 (a) J. R. Dimmock, A. Jha, G. A. Zello, T. M. Allen, C. L. Santos, J. Balzarini, E. De Clercq, E. K. Manavathu, J. P. Stables, *Pharmazie*, **2003**, *58*, 227; (b) T.-P. Robinson, R. B. Hubbard, T. J. Ehlers, J. L. Arbiser, D. J. Goldsmith, J. P. Bowen, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4007.
- 275 (a) C. R. Yellaturu, B. Manjula, I. Neeli, G. N. Rao, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40148. (b) L. H. Jensen, A. Renodon-Corniere, I. Wessel, S. W. Langer, B. Søkilde, E. V. Carstensen, M. Sehested, P. B. Jensen, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 1235.
- 276 A. Jha, C. Mukherjee, A. J. Rolle, E. De Clercq, J. Balzarini, J. P. Stables, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4545.
- 277 (a) B. J. Leslie, C. R. Holaday, T. Nguyen, P. J. Hergenrother, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3964. (b) D. Raffa, B. Maggio, F. Plescia, S. Cascioferro, S. Plescia, M. V. Raimondi, G. Daidone, M. Tolomeo, S. Grimaudo, A. Di Cristina, R. M. Pipitone, R. Bai, E. Hamel, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2786.
- 278 a) Z. Juranić, Lj. Stevović, B. Drakulić, T. Stanojković, S. Radulović, I. Juranić, *J. Serb. Chem. Soc.* **1999**, *64*, 505. b) B. J. Drakulić, T. P. Stanojković, Ž. S. Žižak, M. M. Dabović, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3265.
- 279 D. Papa, E. Schwenk, F. Villani, E. Klingsberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 3356.
- 280 M. D. Vitorović-Todorović, A. Erić-Nikolić, B. Kolundžija, E. Hamel, S. Ristić, I. Juranić, B. Drakulić, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 40.
- 281 A. Massarotti, A. Coluccia, R. Silvestri, G. Sorba, *Chem. Med. Chem.* **2012**, *7*, 33.
- 282 V. Peyrot, D. Leynadier, M. Sarrazin, C. Briand, A. Rodriguez, J. M. Nieto, J. M. Andreu, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21296.
- 283 (a) G. Cruciani, E. Carosati, B. DeBoeck, K. Ethirajulu, C. Mackie, T. Howe, R. Vianello, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6970; (b) M. M. Ahlström, M. Ridderström, I. Zamora, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5382.
- 284 A. Dorleans, B. Gigant, R. B. G. Ravelli, P. Mailliet, V. Mikol, M. Knossow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 13775.
- 285 J. A. Grant, M. A. Gallardo, B. T. Pickup, *J. Comp. Chem.* **1996**, *17*, 1653. ROSCv3.1.1, <http://www.eyesopen.com/>.
- 286 J. E. J. Mills, P. M. Dean, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, *10*, 607.
- 287 A. Hasan, K. M. Khan, M. Sher, G. M. Maharvi, S. A. Nawaz, M. I. Choudhary, A. U. Rahman, C. T. Supuran, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2005**, *20*, 41.
- 288 (a) J. Trujillo-Ferrara, L. Montoya Cano, M. Espinoza-Fonseca, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1825; (b) J. Correa-Basurto, I. V. Alcantara, M. Espinoza-Fonseca, J. G. Trujillo-Ferrara, *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 732; (c) J. Correa-Basurto, J. Espinoza-Raya, M. Gonzalez-May, M. Espinoza-

- Fonseca, J. G. Trujillo-Ferrara, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2006**, *21*, 133; (d) J. Correa-Basurto, C. Flores-Sandoval, J. Marin-Cruz, A. Royo-Dominguez, M. Espinoza-Fonseca, J. Trujillo-Ferrara, *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 10.
- <sup>289</sup> (a) C. Jr. Viegas, V. S. Bolzani, L. S. B. Pimentel, N. G. Castro, R. F. Cabral, R. S. Costa, C. Floyd, M. S. Rocha, M. C. M. Young, E. J. Barreiro, C. A. M. Fraga, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4184; (b) Y. E. Kwon, J. Y. Park, K. T. No, J. H. Shin, S. K. Lee, J. S. Eun, J. H. Yang, T. Y. Shin, D. K. Kim, B. S. Chae, J. Leem, K. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6596; (c) C. T. Sadashiva, J. N. N. S. Chandra, K. C. Ponnappa, T. V. Gowda, K. S. Rangappa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3932; (d) N. Toda, K. Tago, S. Marumoto, K. Takami, M. Ori, N. Yamada, K. Koyama, S. Naruto, K. Abe, R. Yamazaki, T. Hara, A. Aoyagi, Y. Abe, T. Kaneko, H. Kogen, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1935; (e) M. I. Rodriguez-Franco, M. I. Fernandez-Bachiller, C. Perez, A. Castro, A. Martinez, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6795.
- <sup>290</sup> M. D. Vitorovic-Todorovic, I. O. Juranic, Lj. M. Mandic, B. J. Drakulic, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, *18*, 1181.
- <sup>291</sup> G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comp. Chem.* **2009**, *16*, 2785.
- <sup>292</sup> (a) G. L. Warren, C. W. Andrews, A. -M. Capelli, B. Clarke, J. LaLonde, M. H. Lambert, M. Lindvall, N. Nevins, S. F. Semus, S. Senger, G. Tedesco, I. D. Wall, J. M. Woolven, C. E. Peishoff, M. S. Head, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5912; (b) G. Schneider, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 273.
- <sup>293</sup> A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *Prot. Eng.* 1995, *8*, 127.
- <sup>294</sup> M. D. Vitorovic-Todorovic, I. N. Cvijetic, B. J. Drakulic, I. O. Juranic, *J. Mol. Graph. Mod.* **2012**, *38*, 194.
- <sup>295</sup> A. Samadi, M. Chioua, I. Bolea, C. Rios, J. Iriepa, J. Moraled, A. Bastida, G. Esteban, M. Unzeta, E. Galvez, J. Marco-Contelles, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4665.
- <sup>296</sup> X. Chen, J. G. Tikhonova, M. Decker, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1222.
- <sup>297</sup> M. Decker, B. Kraus, J. Heilmann, *Biorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4252.
- <sup>298</sup> (a) P. Kapkova, N. Stiefl, U. Surig, B. Engels, K. Baumann, U. Holzgrabe, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2003**, *336*, 523; (b) P. Kapkova, V. Alptuzun, P. Frey, E. Erciyas, U. Holzgrabe, *Biorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 472.
- <sup>299</sup> (a) D. Silva, M. Chioua, A. Samadi, M. C. Carreiras, M. L. Jimeno, E. Mendes, C. Rios, A. Romero, M. Villaroya, M. G. Lopez, J. Marco-Contelles, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4676; (b) W. Luo, Y. Li, Y. He, S. Huang, D. Li, L. Gu, Z. Huang, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2609; (c) W. Luo, Y. Li, Y. He, S. Huang, J. Tan, T. Ou, D. Li, L. Gu, Z. Huang, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 763.
- <sup>300</sup> L. Fang, S. Jumpertz, Y. Zhang, D. Apenroth, C. Fleck, K. Mohr, C. Trankle, M. Decker, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2094.
- <sup>301</sup> S. Martin-Santamaria, J. Munoz-Muriedas, F. J. Luque, F. Gago, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4471.
- <sup>302</sup> M. L. Bolognesi, A. Minarini, M. Rosini, V. Tumiatti, C. Melchiorre, *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 960.
- <sup>303</sup> Y.-P. Pang, P. Quiram, T. Jelacic, F. Hong, S. Brimijoin, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23646.
- <sup>304</sup> (a) M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabattier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P. Axelsen, I. Silman, J. L. Sussman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 9031; (b) E. H. Rydberg, B. Brunstein, H. M. Greenblatt, D. M. Wong, D. Shaya, L. D. Williams, P. R. Carlier, Y. Pang, I. Silman, J. L. Sussman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5491.
- <sup>305</sup> ADMET Predictor, version 6.0; Simulations Plus, Inc.; **2012**; [www.simulations-plus.com](http://www.simulations-plus.com).
- <sup>306</sup> A. Golbraikh, A. Tropsha, *J. Mol. Graph. Model.* **2002**, *20*, 269.
- <sup>307</sup> P. Bernard, D. B. Kireev, J. R. Chretien, P. L. Fortier, L. Coppet, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1999**, *13*, 355.
- <sup>308</sup> I. V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V. A. Palyulin, E. V. Radchenko, N. S. Zefirov, A. S. Makarenko, V. Y. Tanchuk, V. V. Prokopenko, *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **2005**, *19*, 453.
- <sup>309</sup> R. Todeschini, V. Consonni, (2000). Handbook of Molecular Descriptors. Wiley-VCH, Weinheim (Germany).
- <sup>310</sup> H. Kubinyi, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 625. <http://www.kubinyi.de/bilin-program.html>
- <sup>311</sup> G. H. Lushington, J. X. Guo, M. M. Hurley, *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 57.

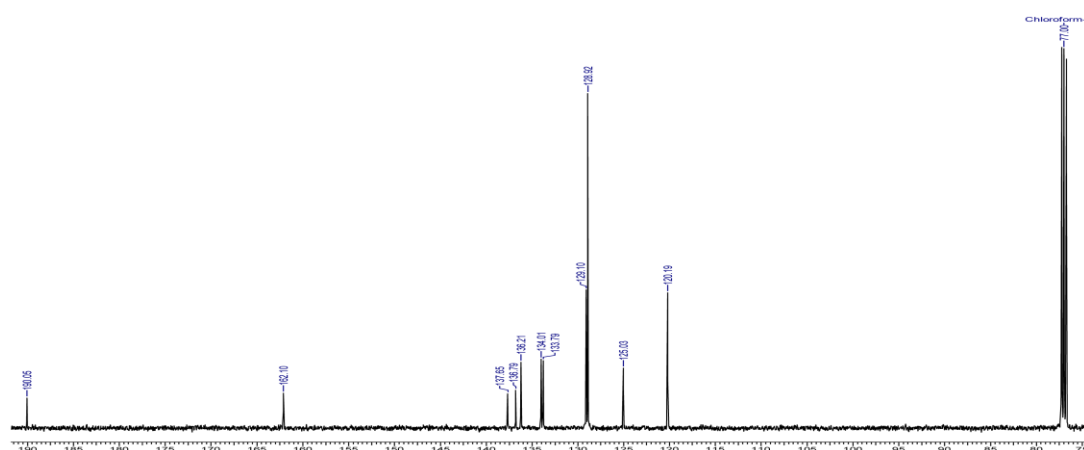
- <sup>312</sup> T. Mosmann, *J. Immunol Meth.* **1983**, *65*, 55.
- <sup>313</sup> M. Ohno, T. J. Abe, *J. Immunol. Meth.* **1991**, *145*, 199.
- <sup>314</sup> R.H. Clothier, *Methods Mol. Biol.* **1995**, *43*, 109.
- <sup>315</sup> E. Hamel, C. M. Lin, *Biochemistry*, **1984**, *23*, 4173.
- <sup>316</sup> E. Hamel, *Cell Biochem. Biophys.* **2003**, *38*, 1.
- <sup>317</sup> P. Verdier-Pinard, J.-Y. Lai, H.-D. Yoo, J. Yu, B. Marquez, D. G. Nagle, M. Nambu, J. D. White, J. R. Falck, W. H. Gerwick, B. W. Day, E. Hamel, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *53*, 62.
- <sup>318</sup> A. Dorleans, B. Gigant, R. B. G. Ravelli, P. Mailliet, V. Mikol, M. Knossow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 13775.
- <sup>319</sup> A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli, *J. Comp. Aided Mol. Des.* **2004**, *18*, 167, <http://www.ddl.unimi.it>.
- <sup>320</sup> (a) J. Boström, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2002**, *15*, 1137; (b) J. Boström, J. R. Greenwood, J. Gottfries, *J. Mol. Graph. Model.* **2003**, *21*, 449; OMEGA version 2.2.1, [www.eyesopen.com](http://www.eyesopen.com).
- <sup>321</sup> T. A. Halgren, *J. Comp. Chem.* **1999**, *20*, 720.
- <sup>322</sup> N. Guex, M.C. Peitsch, *Electrophoresis*, **1997**, *18*, 2714-2723.
- <sup>323</sup> Sanner, M. F. *J. Mol. Graphics Mod.* **1999**, *17*, 57; AutoDock Tools 1.5.4
- <sup>324</sup> J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten, *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781; <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>

## 7. PRILOZI

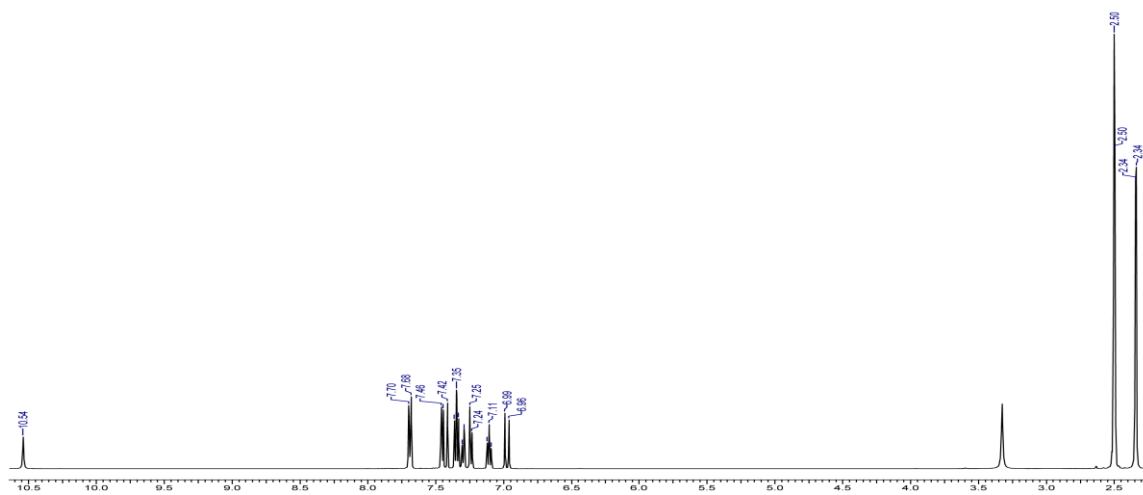
### Prilog 1. $^1\text{H}$ i $^{13}\text{C}$ NMR spektri amida benzoilakrilnih kiselina (1a-29a)



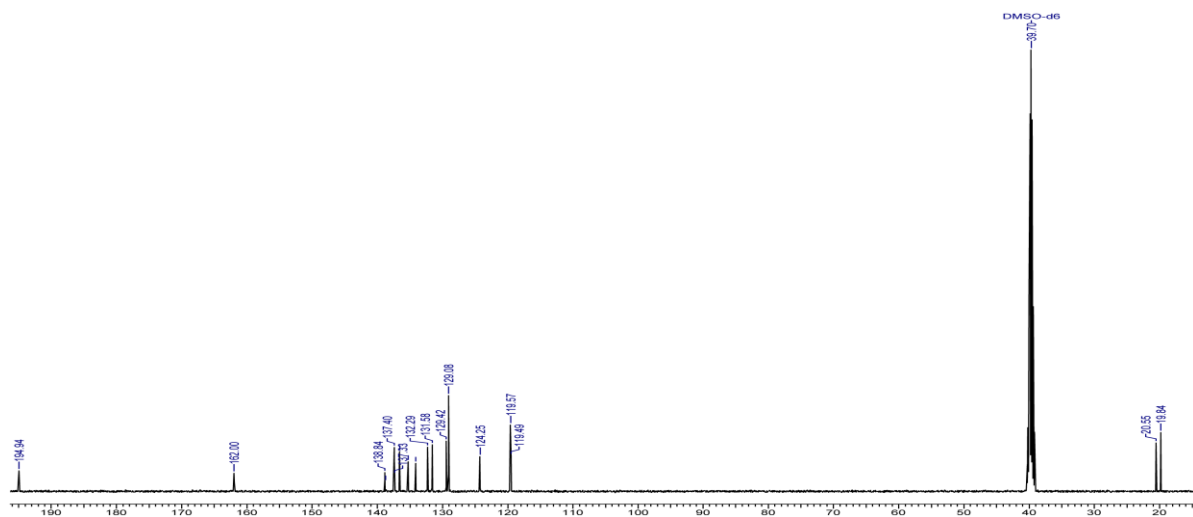
$^1\text{H}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-okso-4-fenil-2-butenske kiseline (1a).



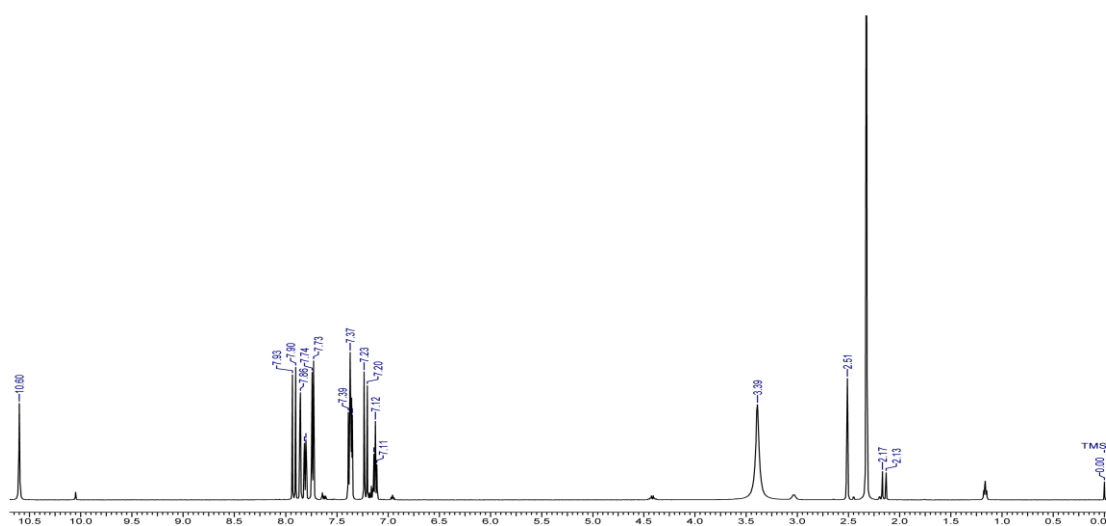
$^{13}\text{C}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-okso-4-fenil-2-butenske kiseline (1a).



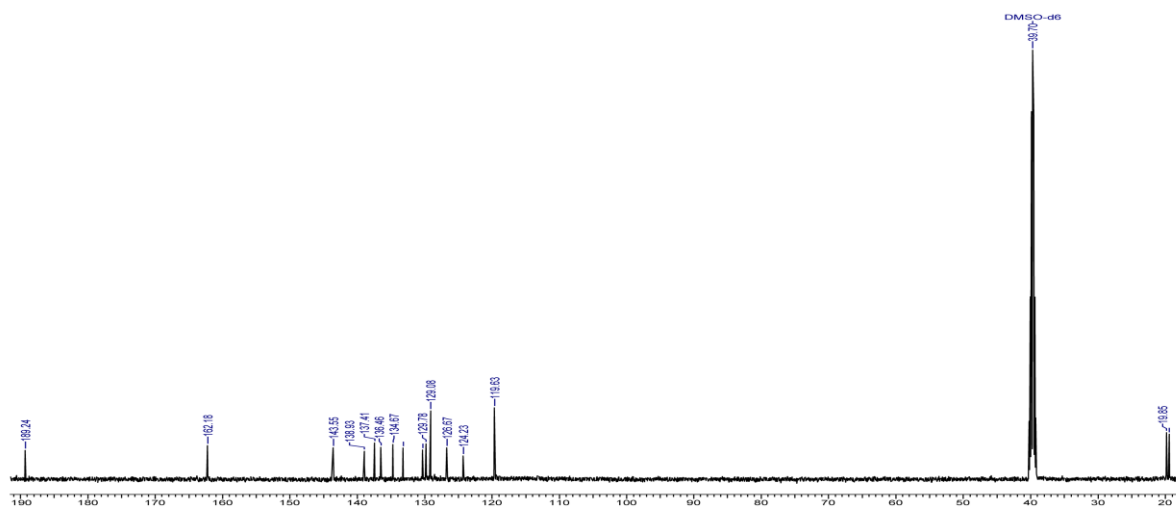
$^1\text{H}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(2,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (2a).



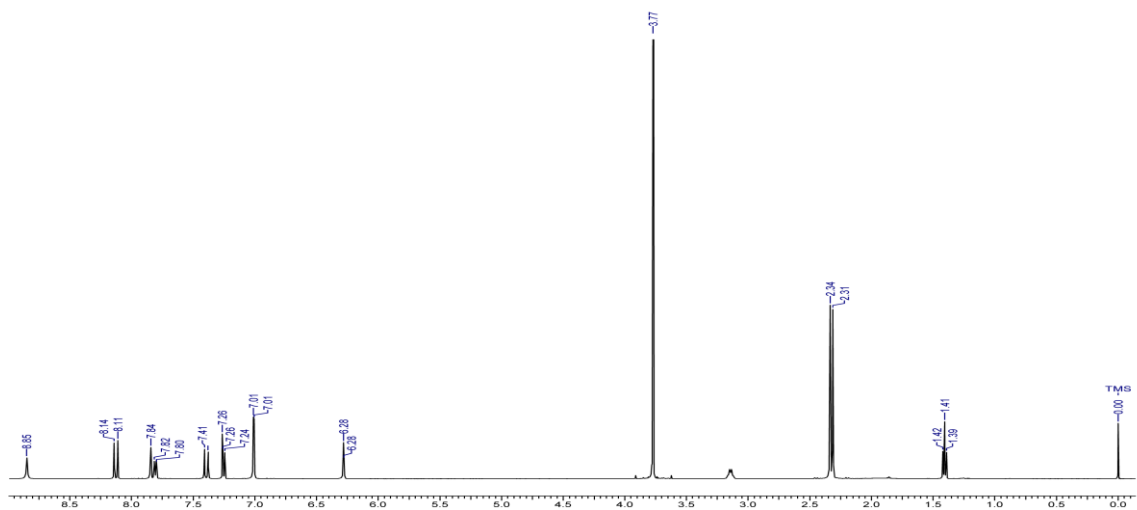
$^{13}\text{C}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(2,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**2a**).



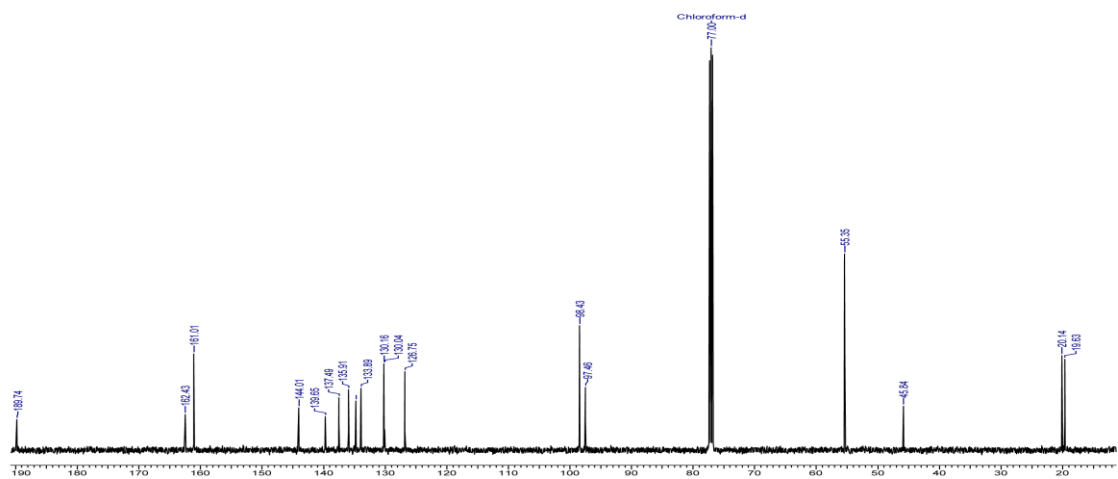
$^1\text{H}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**3a**).



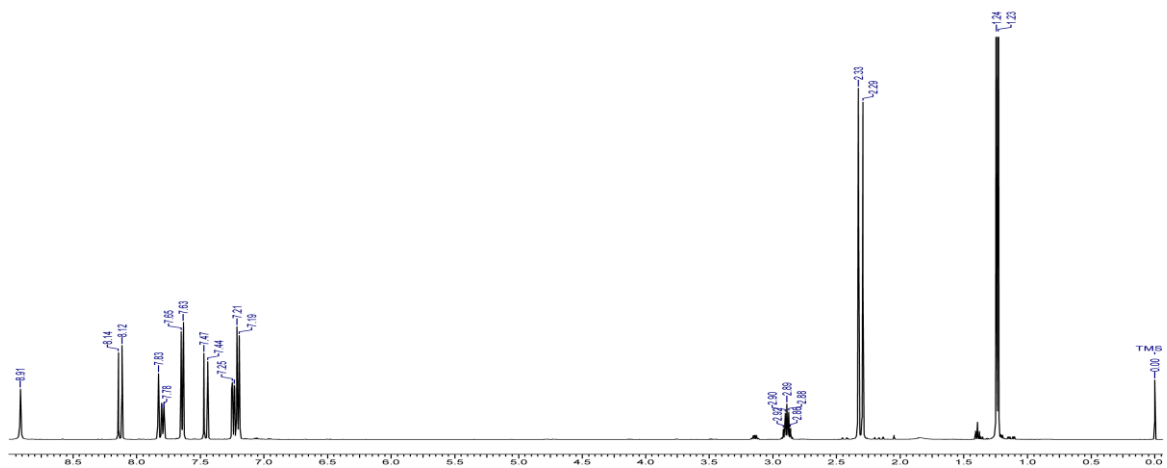
$^{13}\text{C}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**3a**).



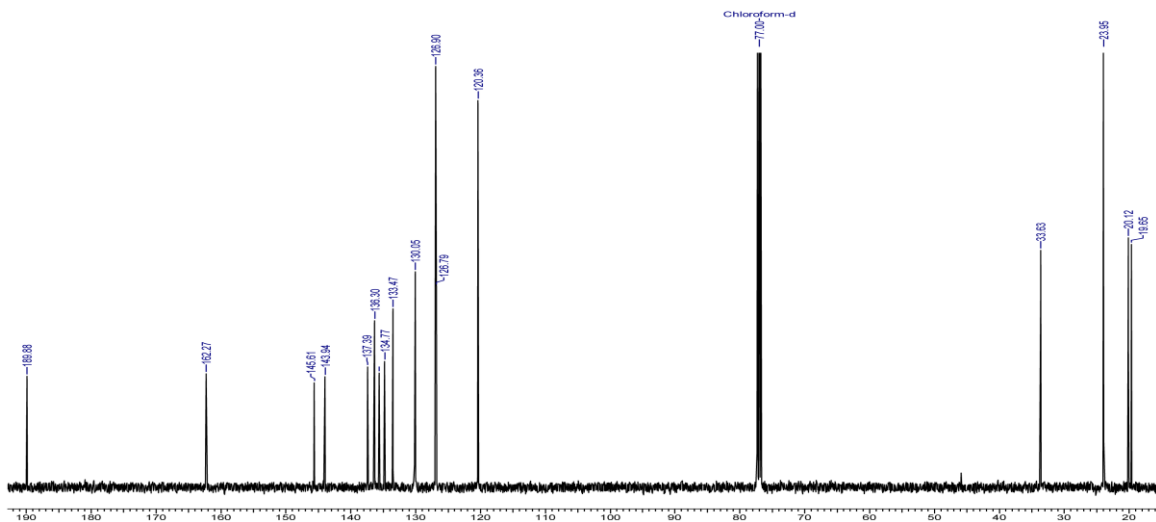
$^1\text{H}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**4a**).



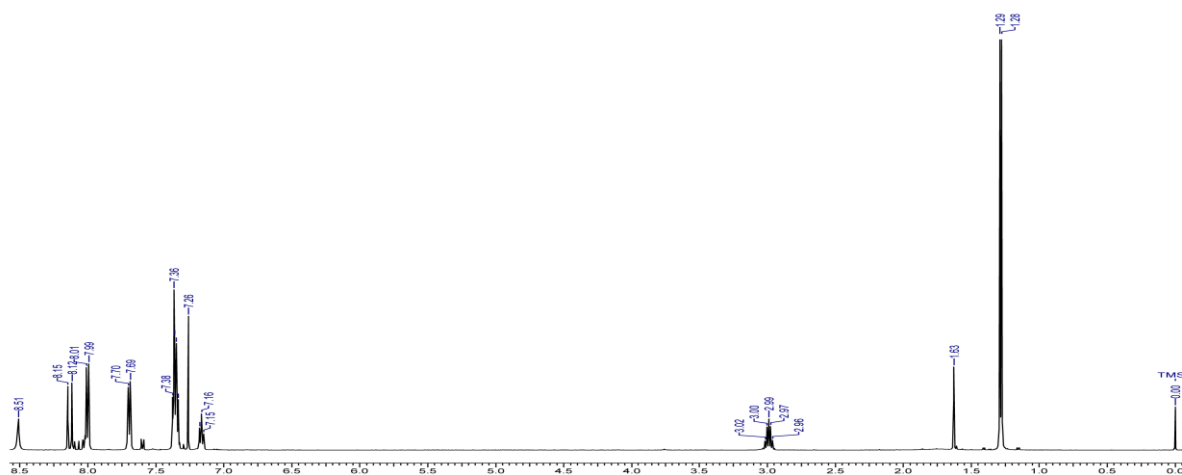
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**4a**).



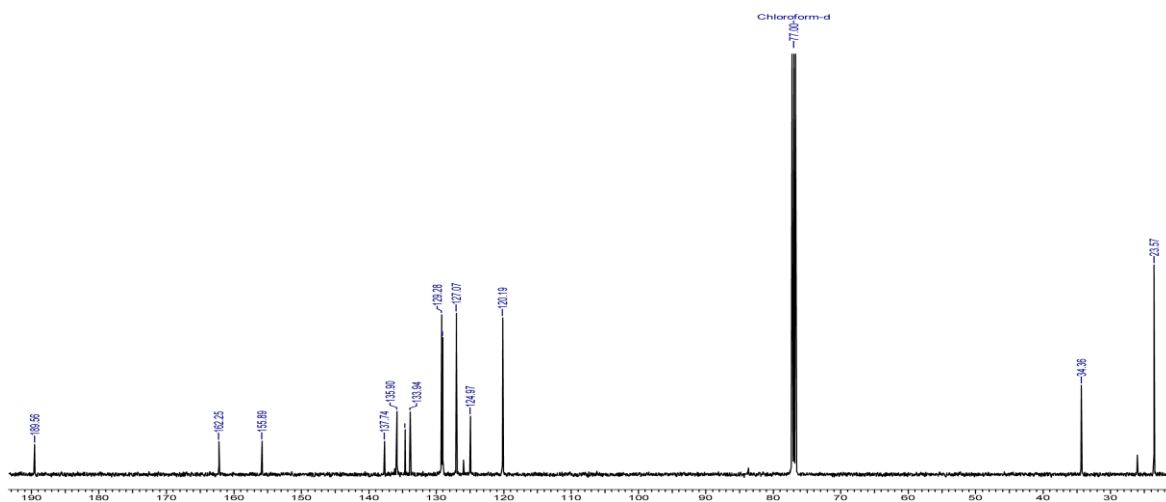
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**5a**).



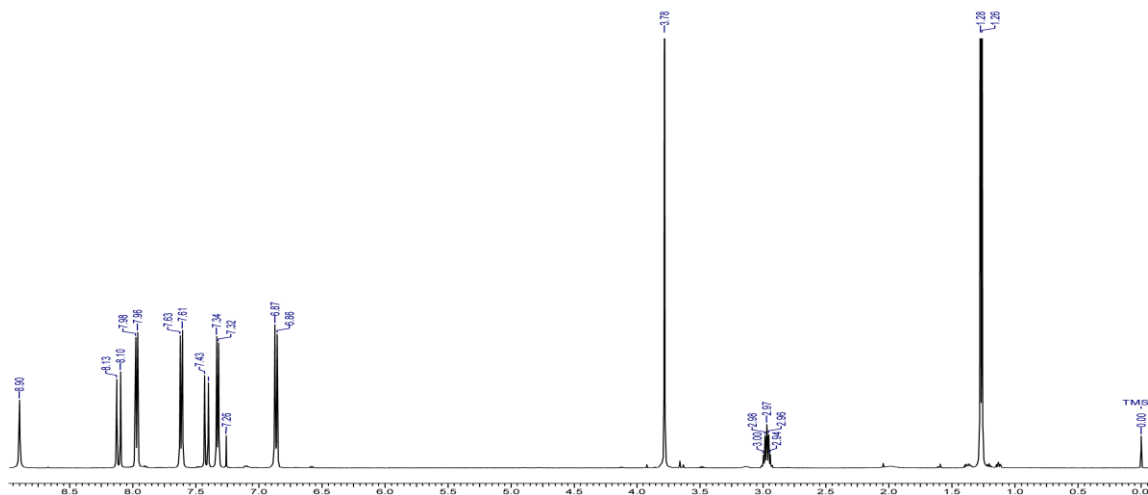
<sup>13</sup>C NMR spektar 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**5a**).



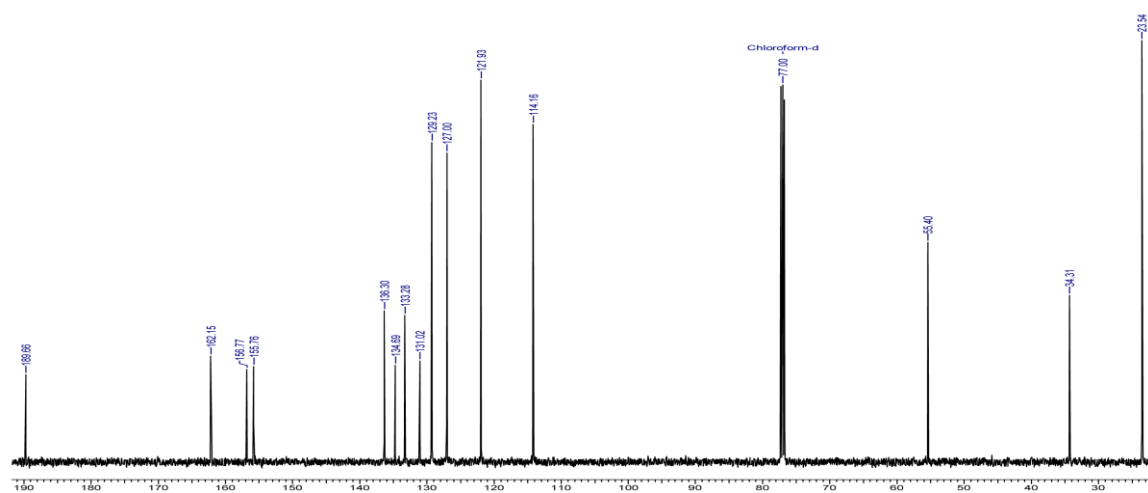
<sup>1</sup>H NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**6a**).



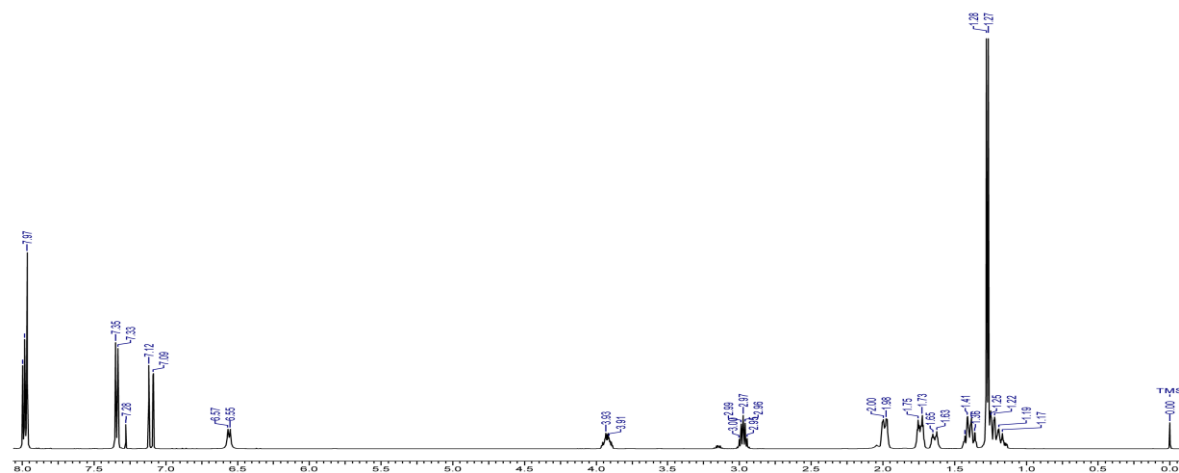
<sup>13</sup>C NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**6a**).



$^1\text{H}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**7a**).

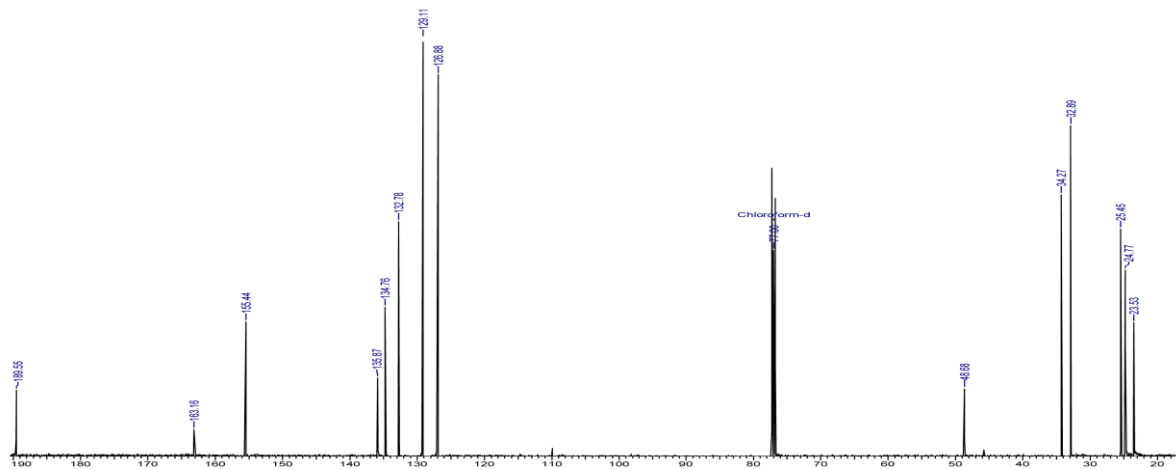


$^{13}\text{C}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**7a**).

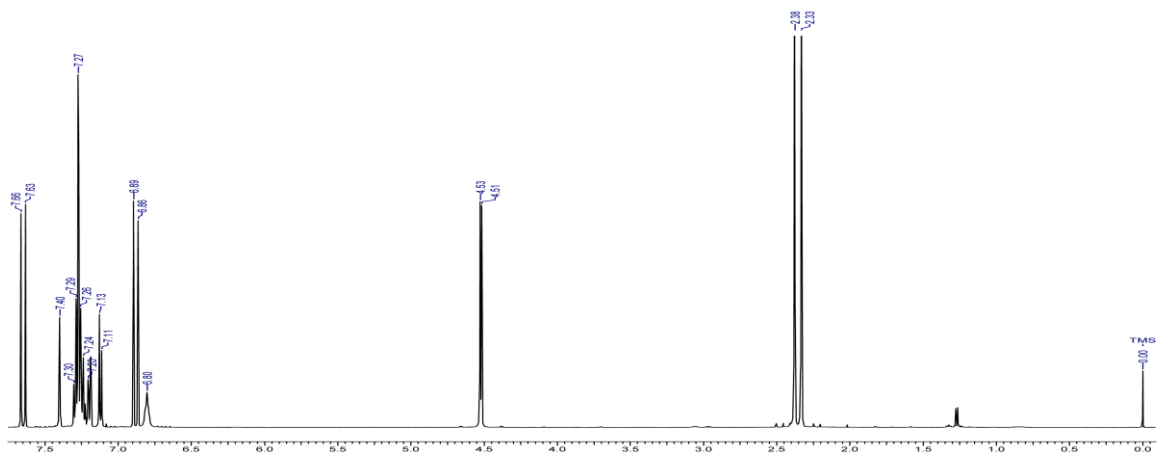


$^1\text{H}$  NMR spektar cikloheksilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**8a**).

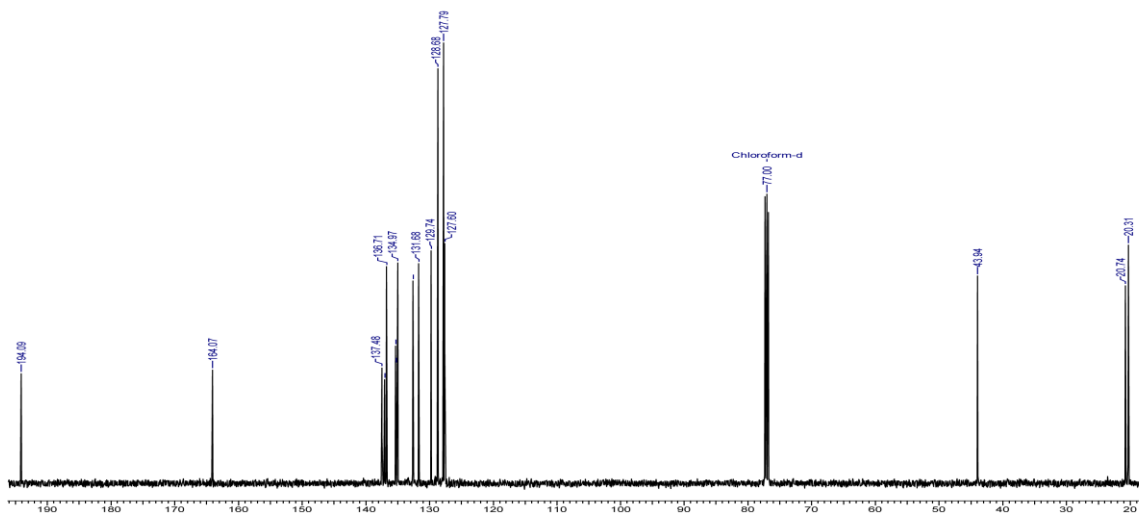




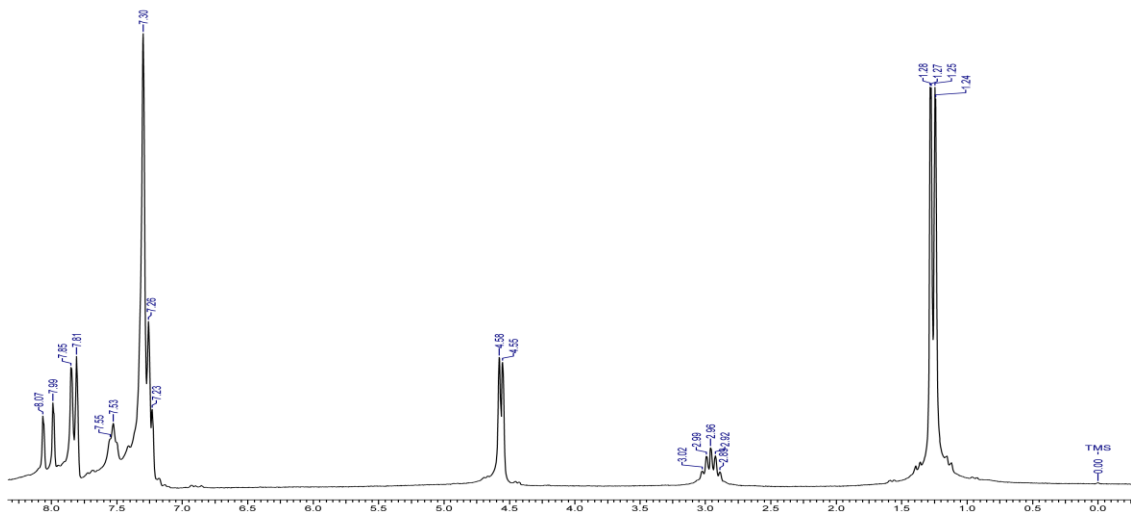
$^{13}\text{C}$  NMR spektar cikloheksilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**8a**).



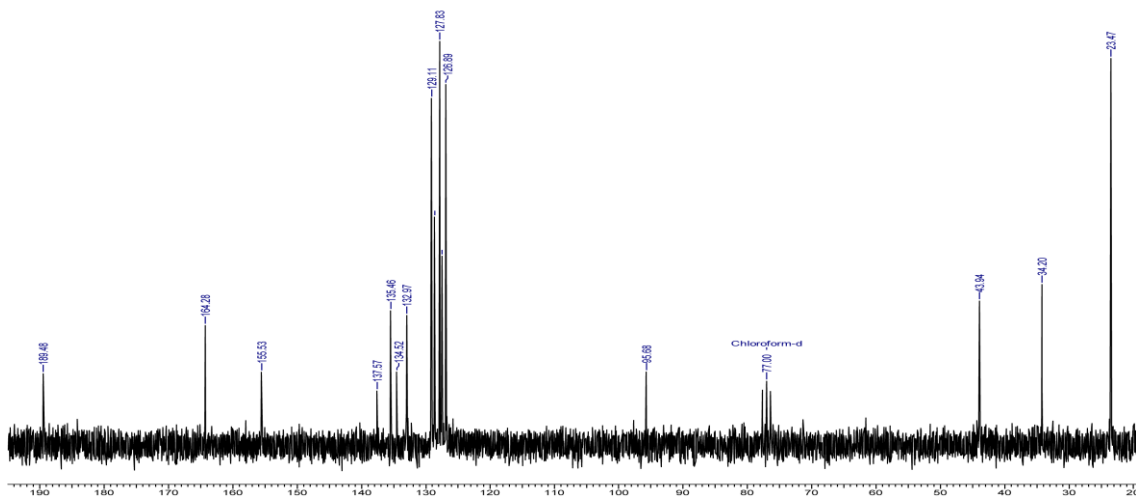
$^1\text{H}$  NMR spektar benzilamida (*E*)-4-(2,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**9a**).



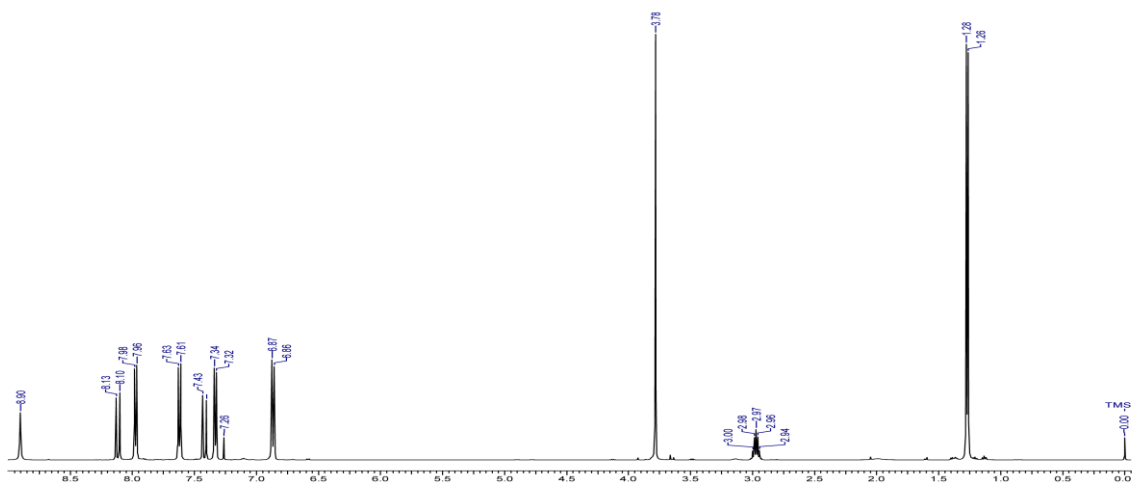
$^{13}\text{C}$  NMR spektar benzilamida (*E*)-4-(2,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**9a**).



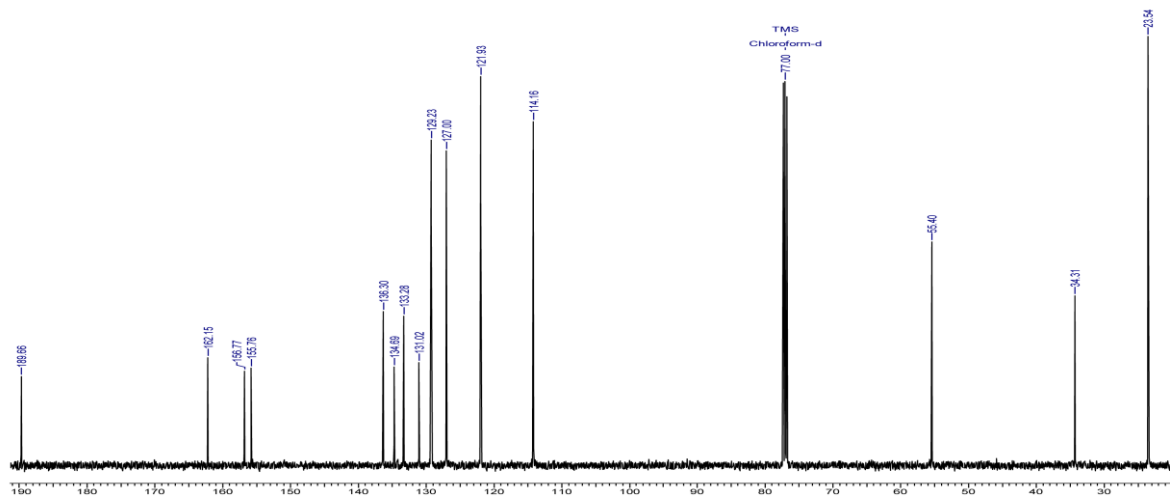
$^1\text{H}$  NMR spektar benzilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**10a**).



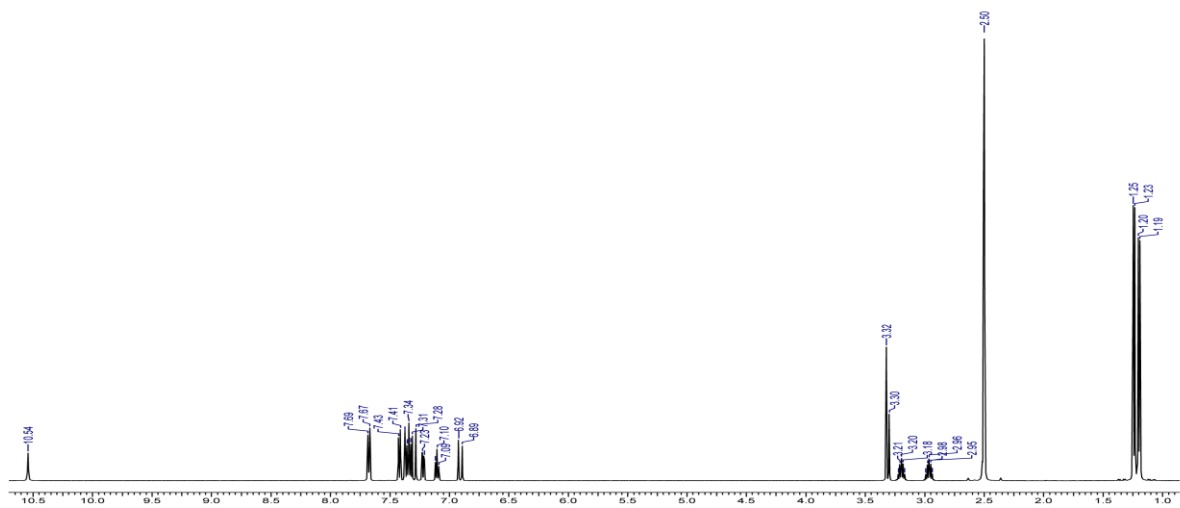
$^{13}\text{C}$  NMR spektar benzilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**10a**).



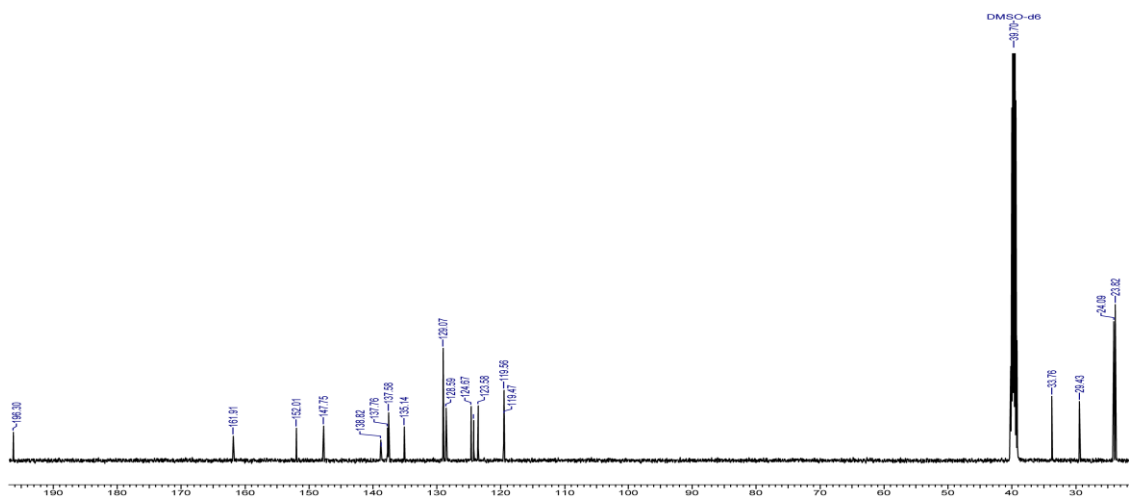
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-metoksifenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**11a**).



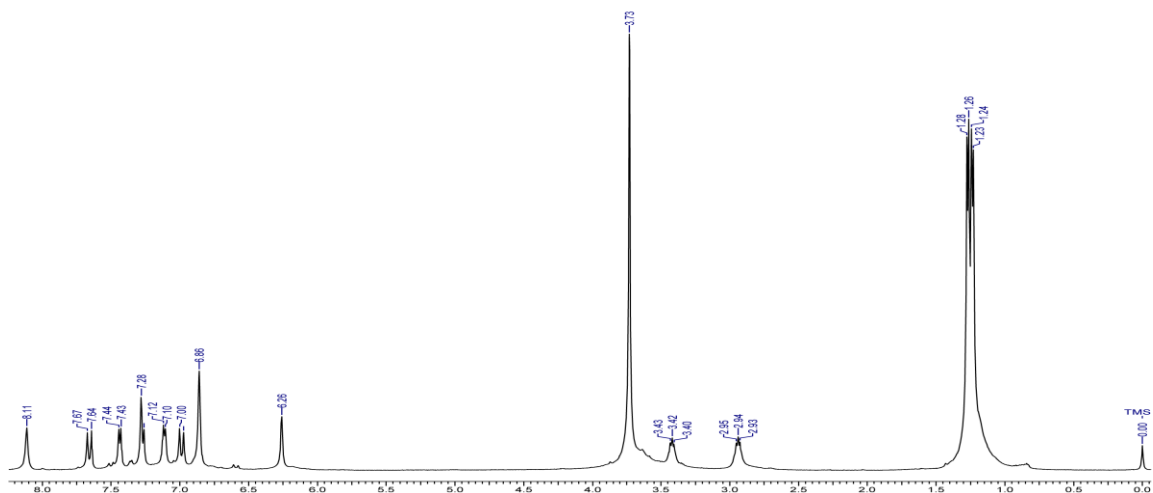
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-metoksifenilamida (*E*)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**11a**).



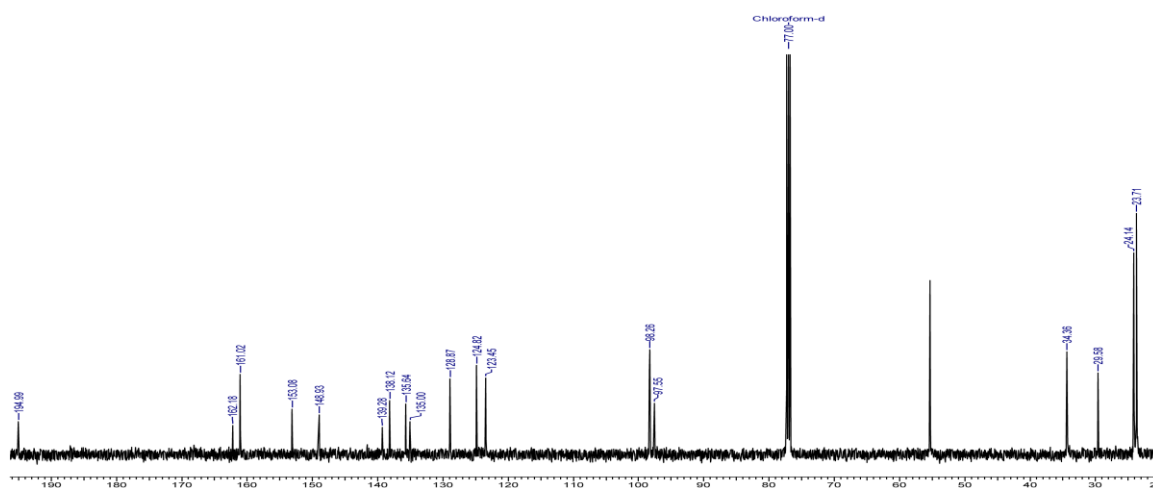
$^1\text{H}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**12a**).



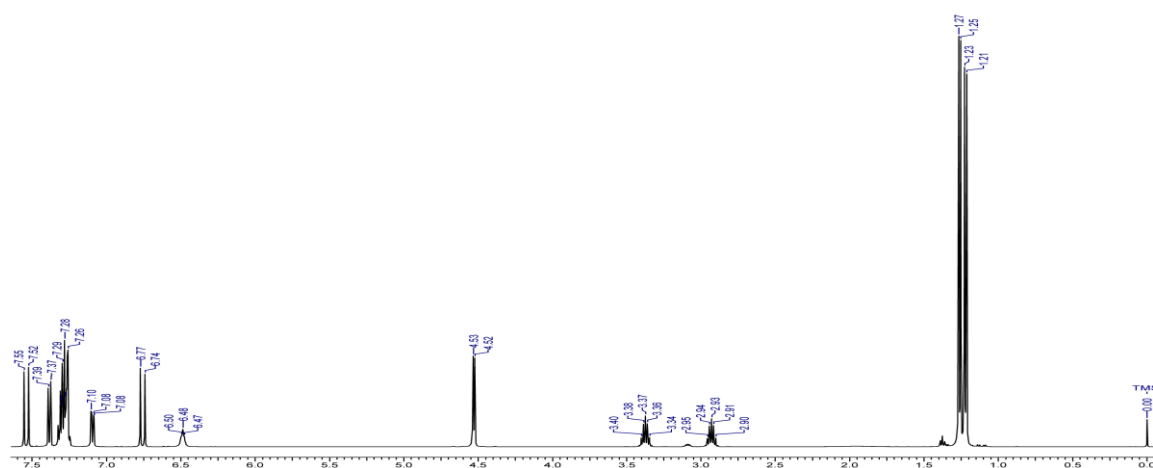
$^{13}\text{C}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**12a**).



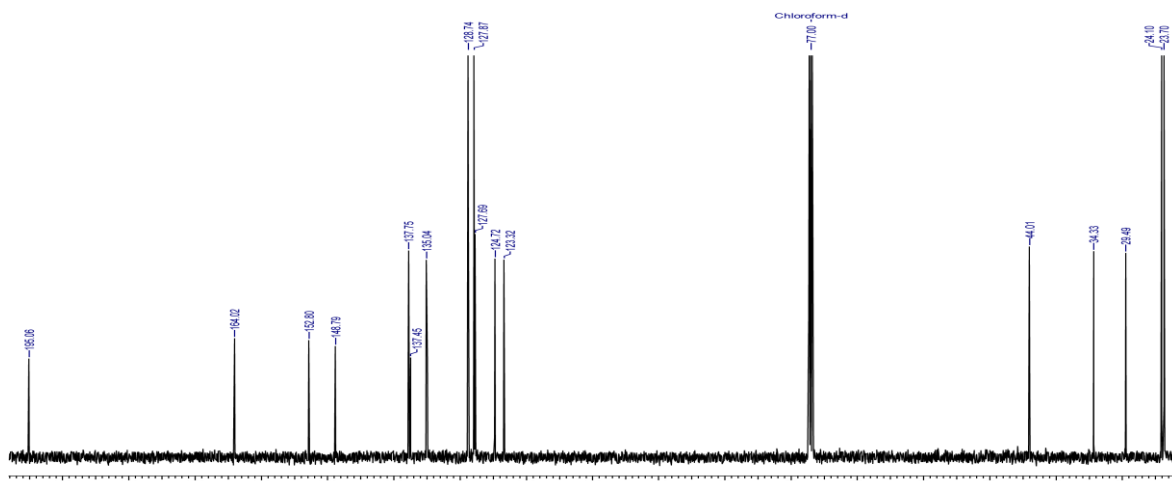
$^1\text{H}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**13a**).



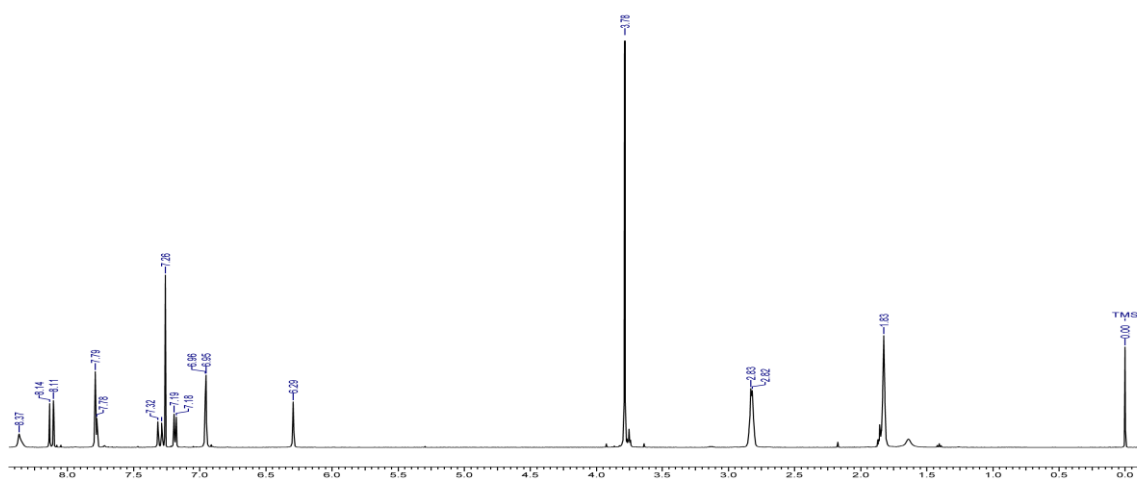
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**13a**).



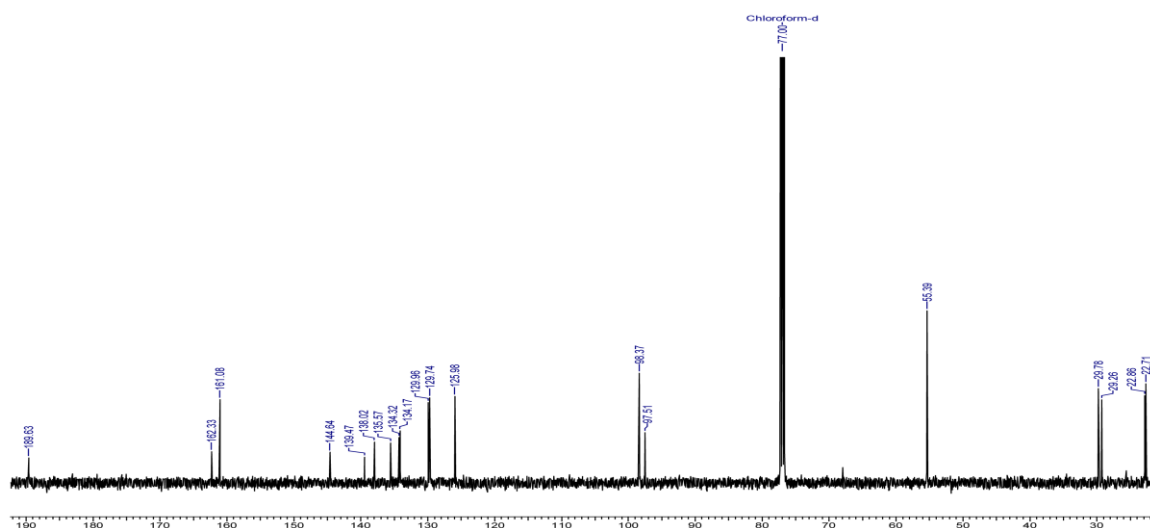
$^1\text{H}$  NMR spektar benzilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**15a**).



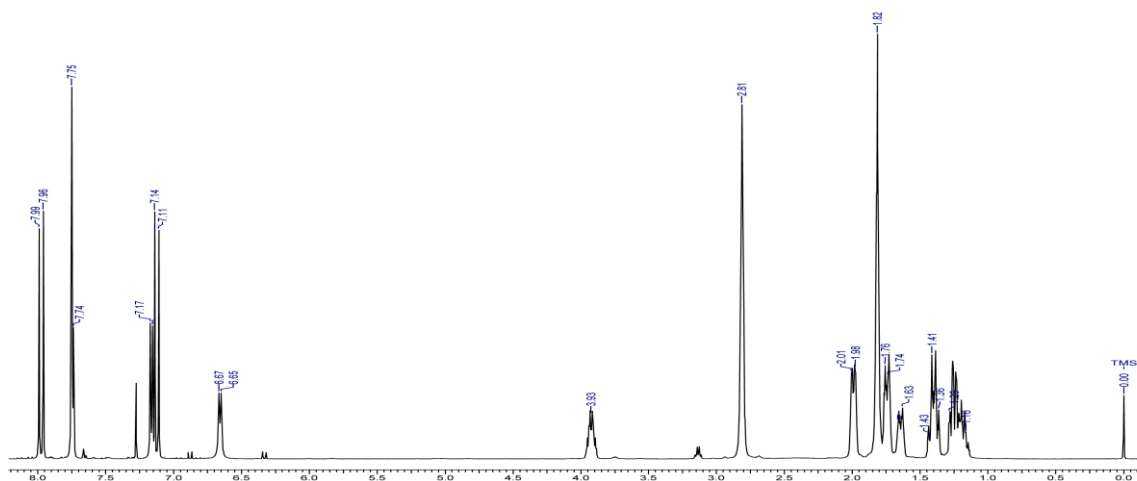
$^{13}\text{C}$  NMR spektar benzilamida (*E*)-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**15a**).



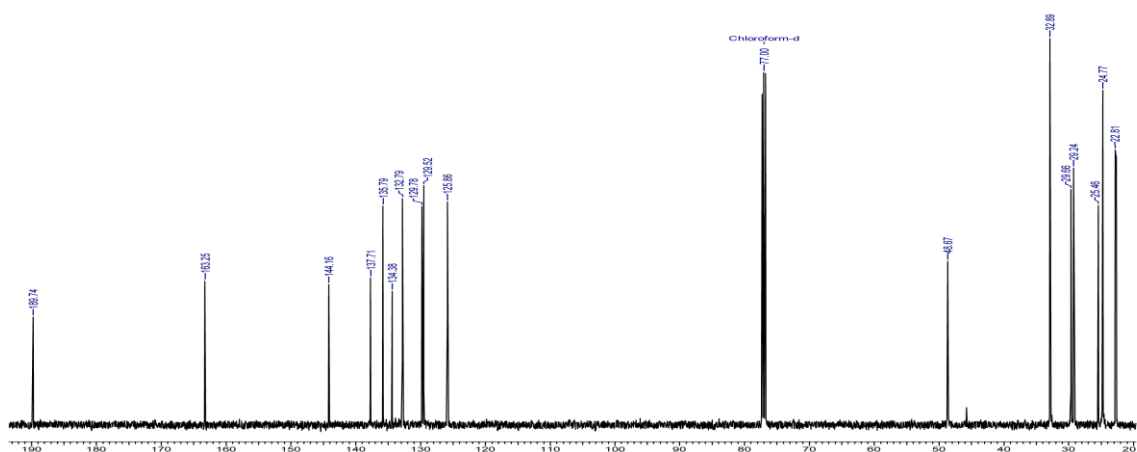
$^1\text{H}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (**16a**).



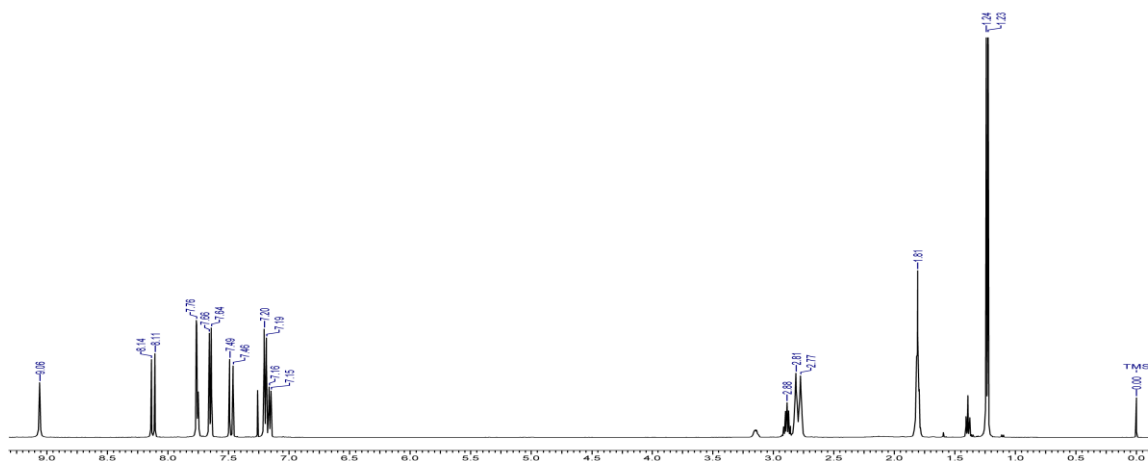
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (**16a**).



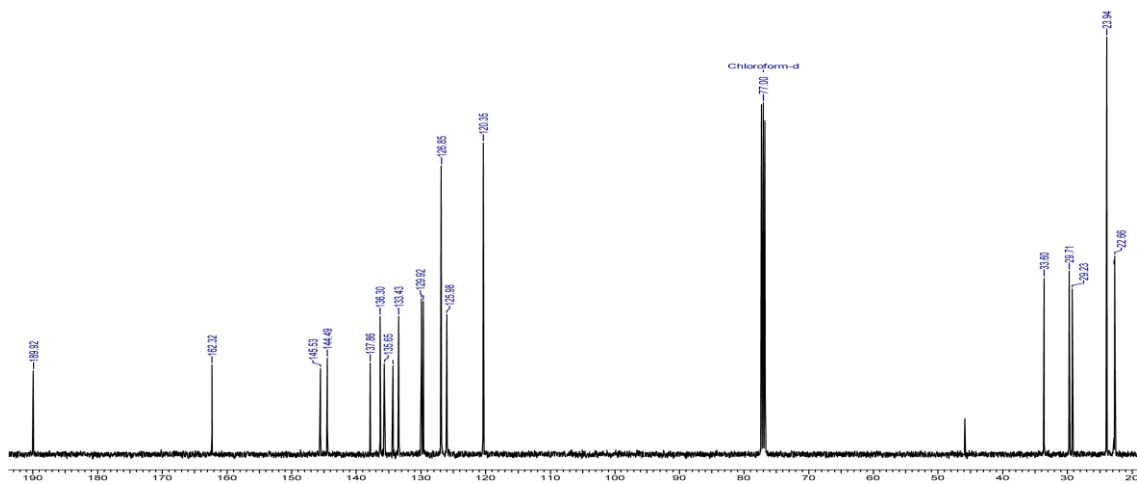
$^1\text{H}$  NMR spektar cikloheksilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8- tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (**17a**).



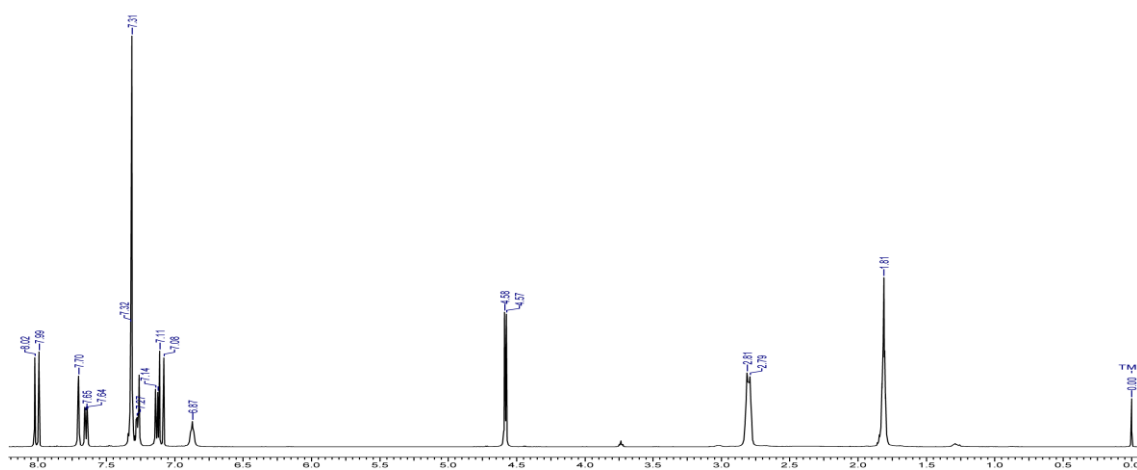
$^{13}\text{C}$  NMR spektar cikloheksilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8- tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (**17a**).



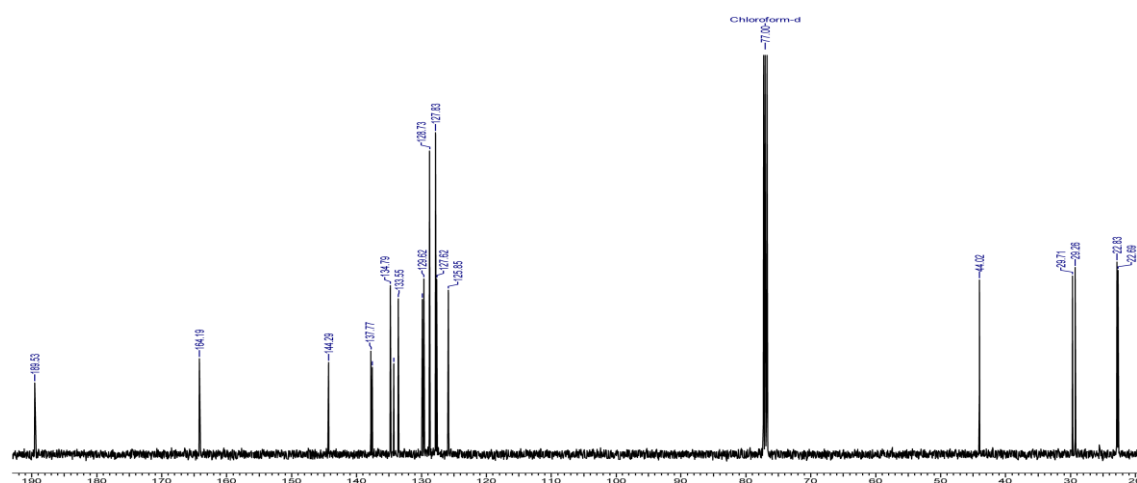
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-2-butenske kiseline (**18a**).



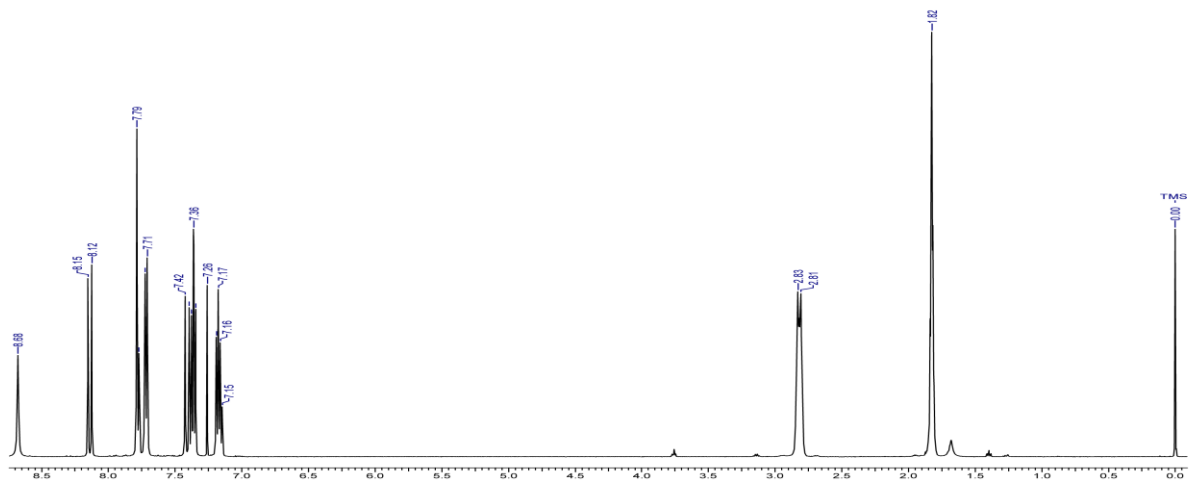
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-izopropilfenilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahydronaftalenil)-2-butenske kiseline (**18a**).



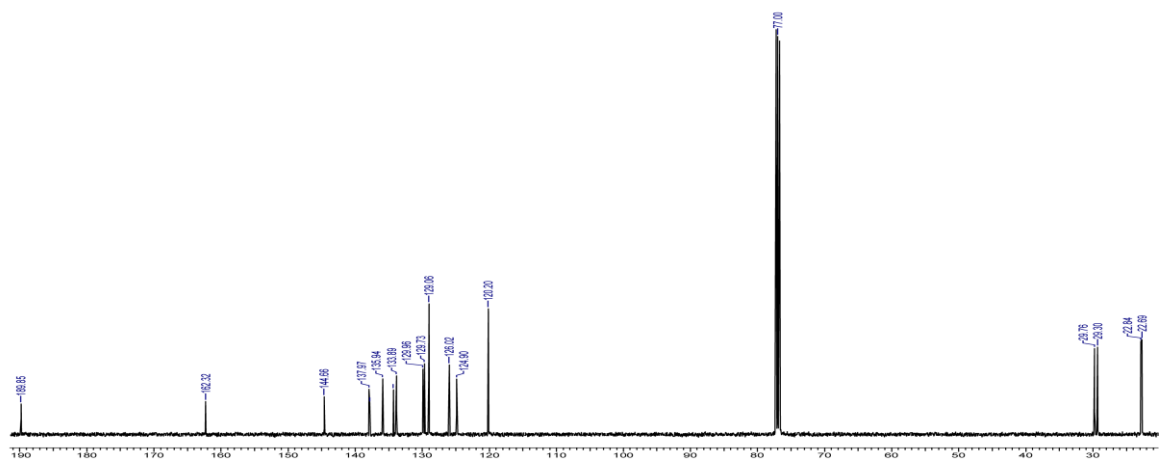
$^1\text{H}$  NMR spektar benzilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahydronaftalenil)-2-butenske kiseline (**19a**).



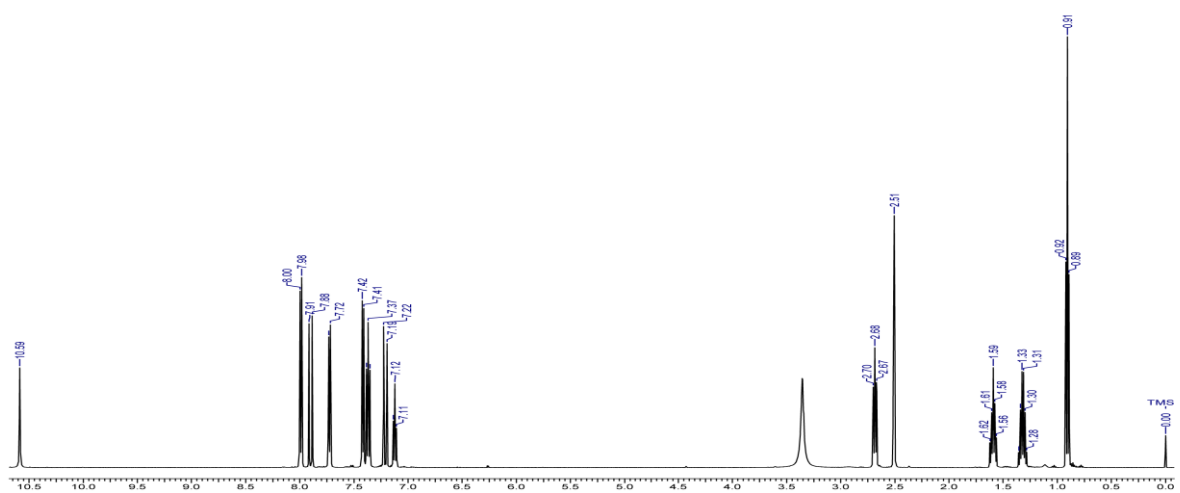
$^{13}\text{C}$  NMR spektar benzilamida (*E*)-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahydronaftalenil)-2-butenske kiseline (**19a**).



$^1\text{H}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**20a**).

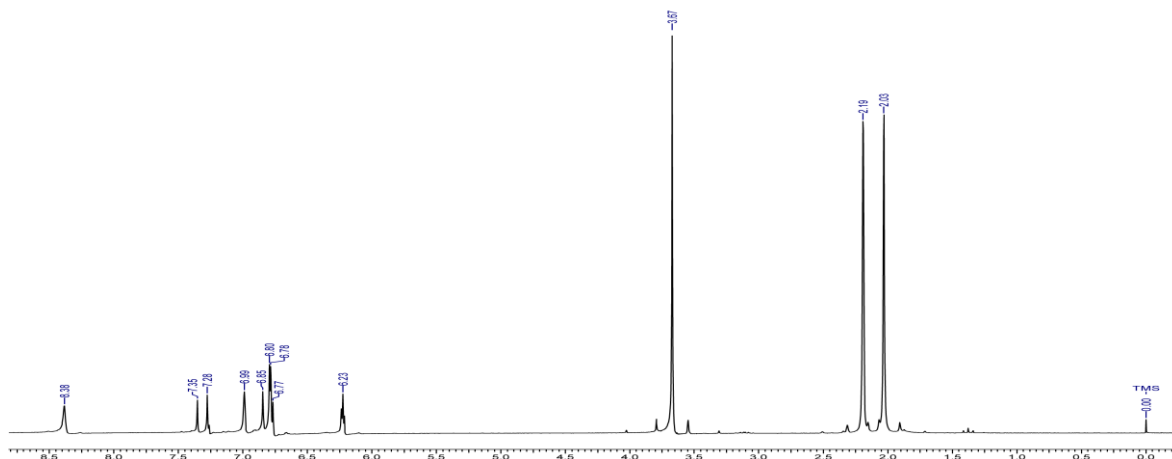


$^{13}\text{C}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**20a**).

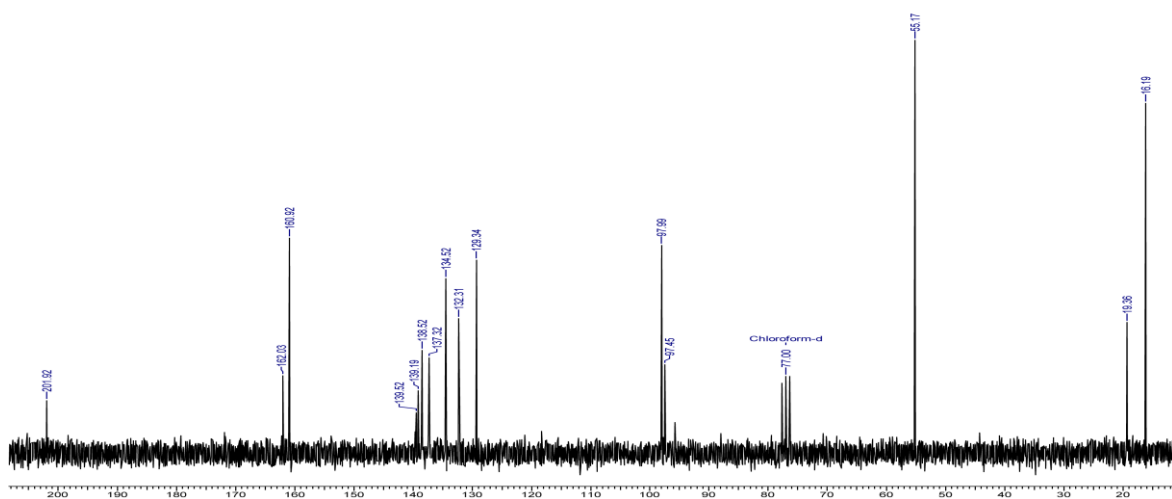


$^1\text{H}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(4-*n*-butilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**21a**).

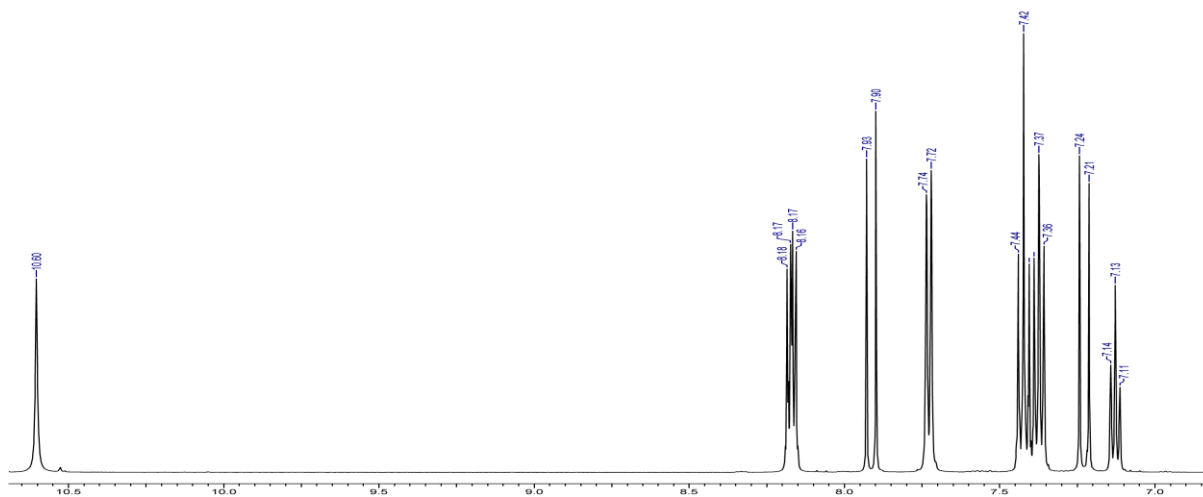




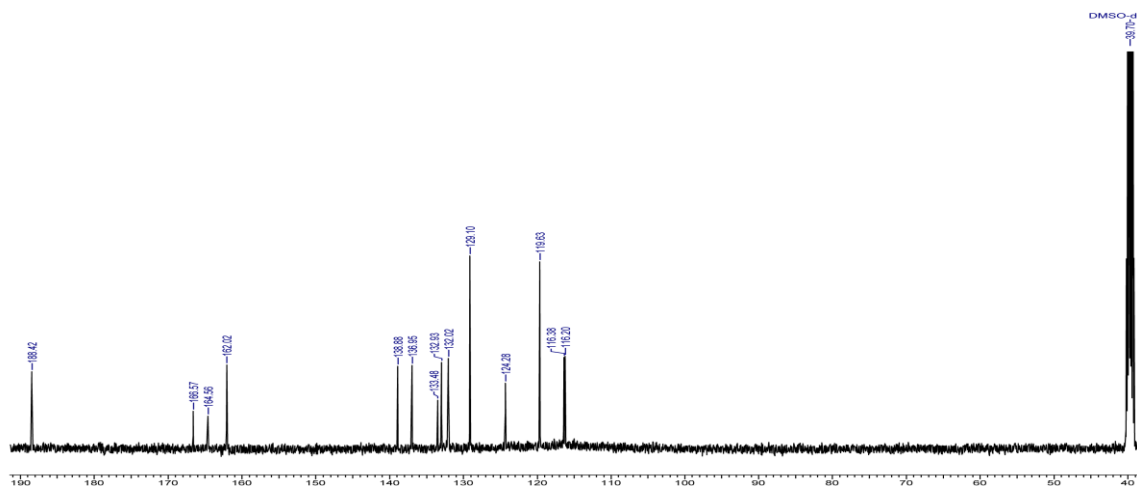
$^1\text{H}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(2,3,5,6-tetrametilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**22a**).



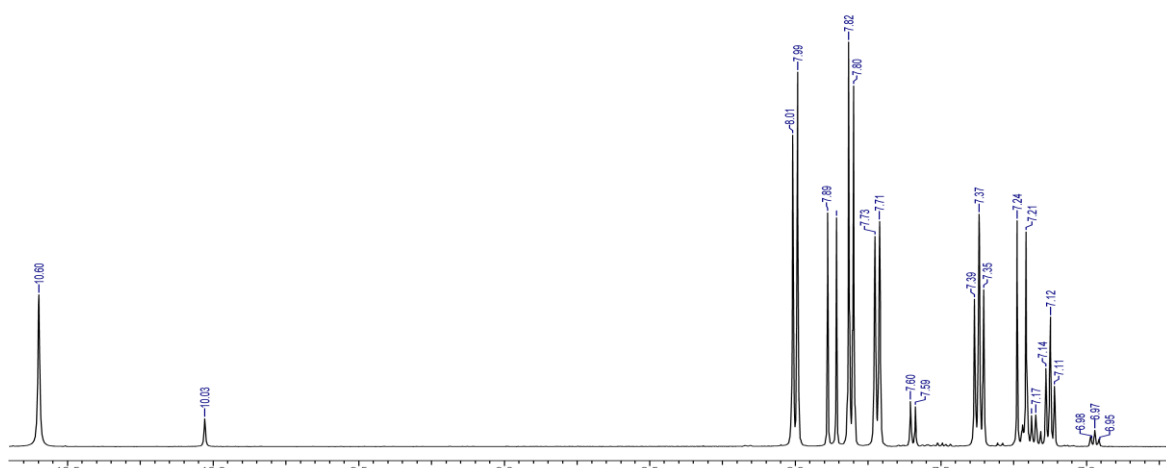
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(2,3,5,6-tetrametilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**22a**).



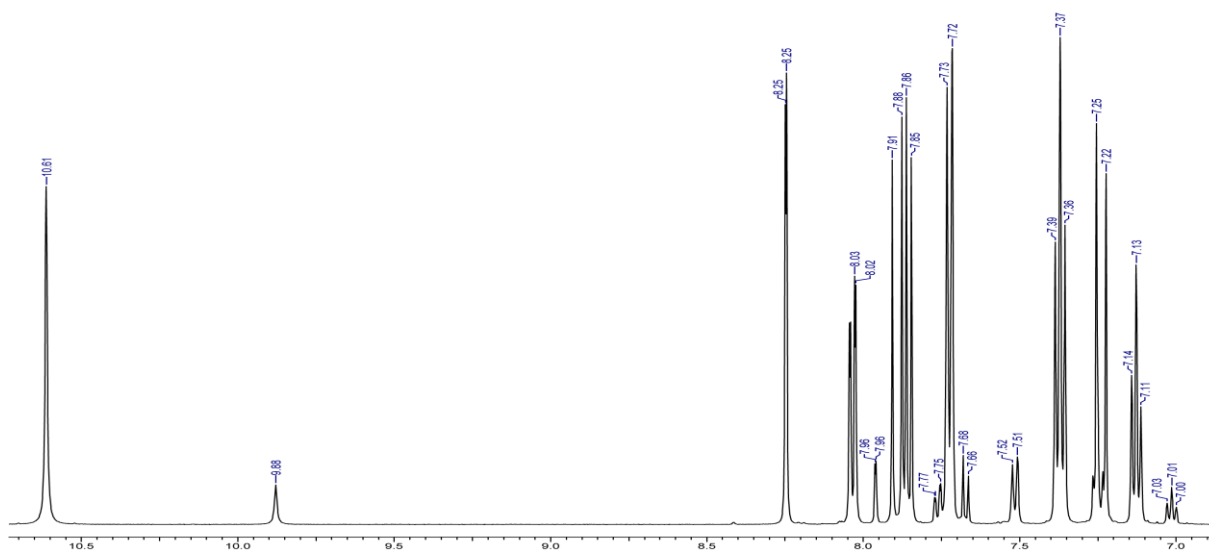
$^1\text{H}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(4-fluorofenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**23a**).



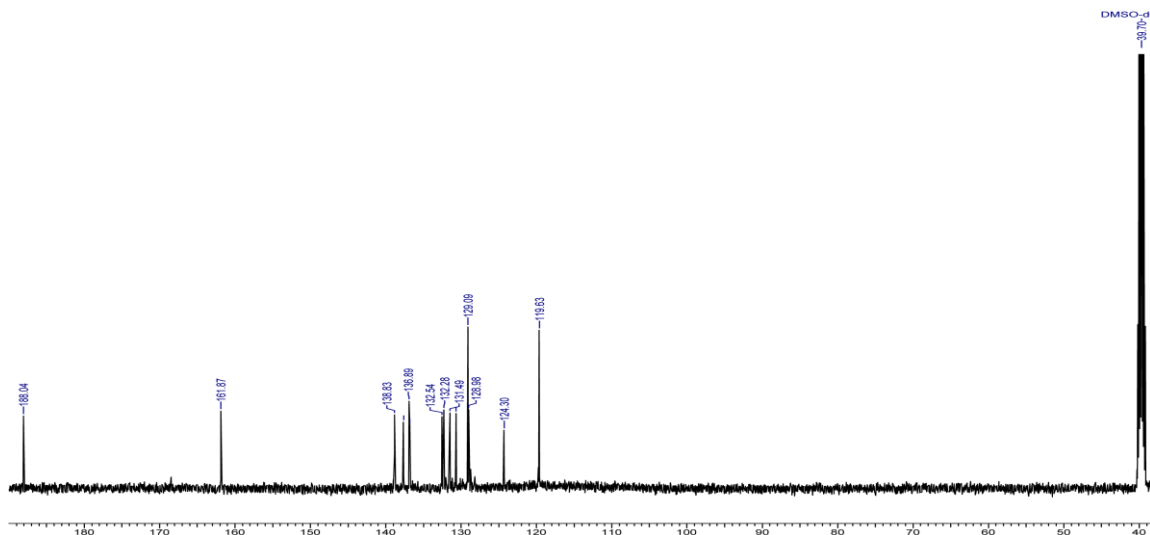
<sup>13</sup>C NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(4-fluorofenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**23a**).



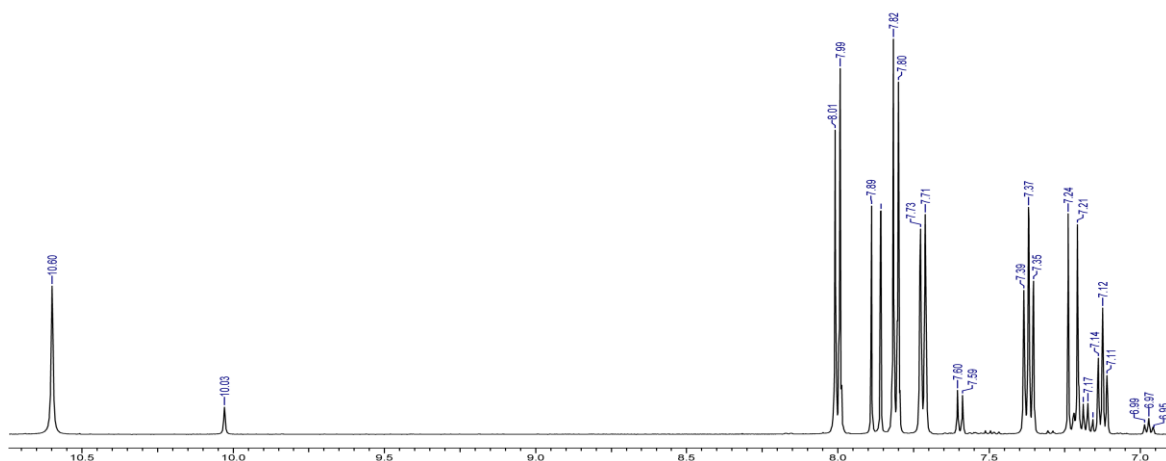
<sup>1</sup>H NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(4-hlorofenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**24a**).



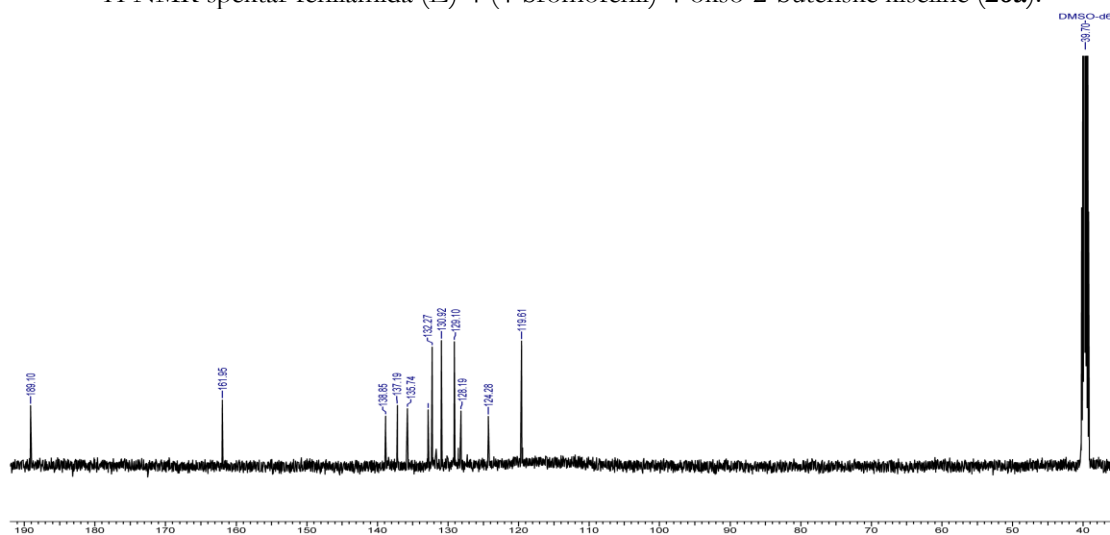
<sup>1</sup>H NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(3,4-dihlorofenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**25a**).



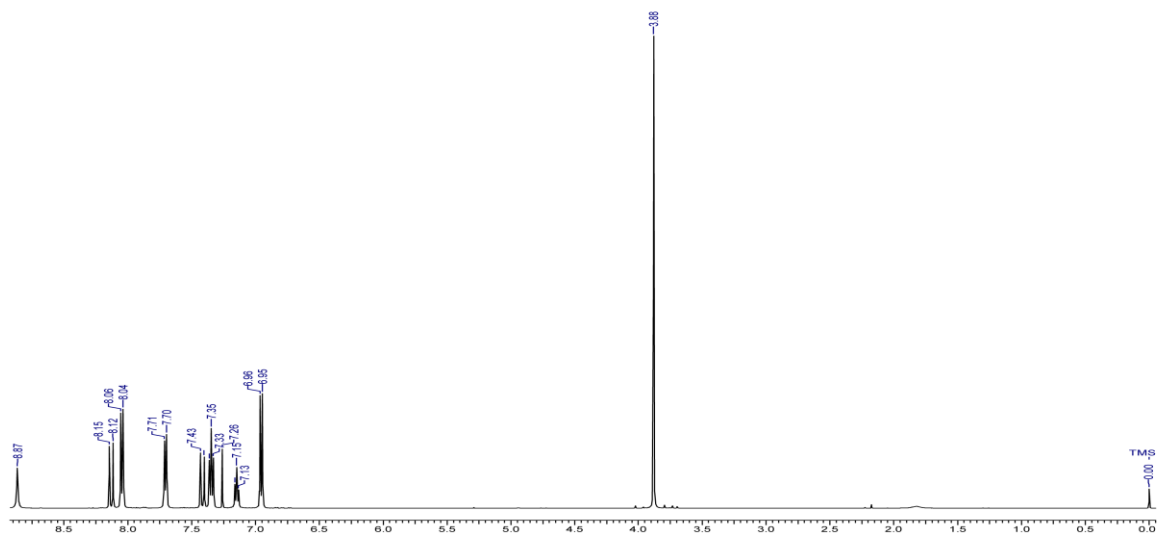
<sup>13</sup>C NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(3,4-dihlorofenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**25a**).



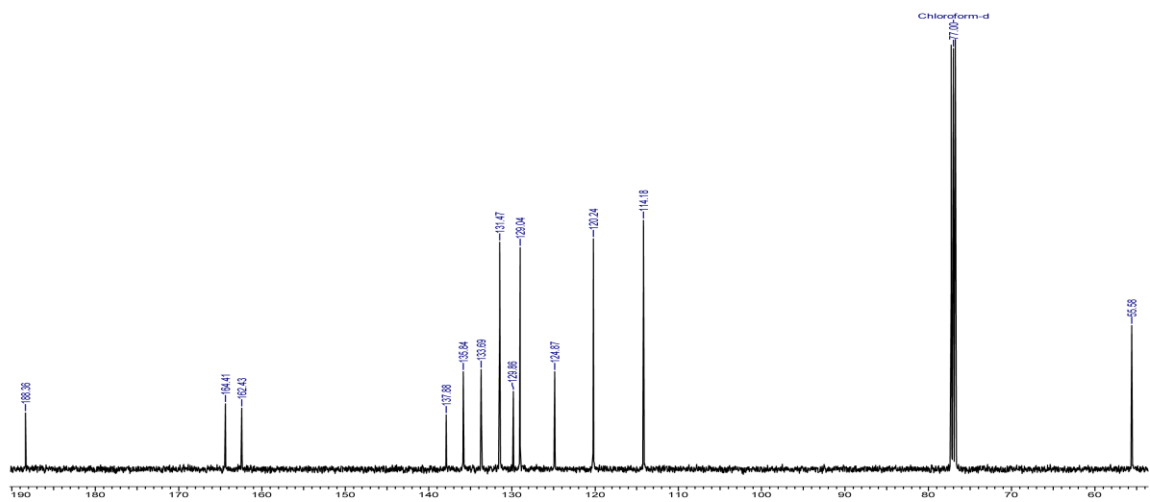
<sup>1</sup>H NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(4-bromofenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**26a**).



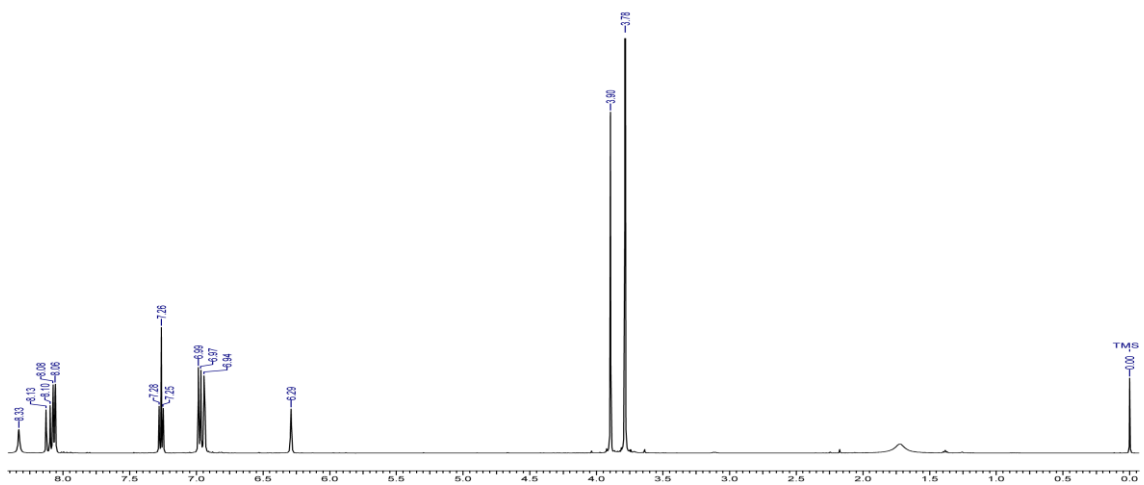
<sup>13</sup>C NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(4-bromofenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**26a**).



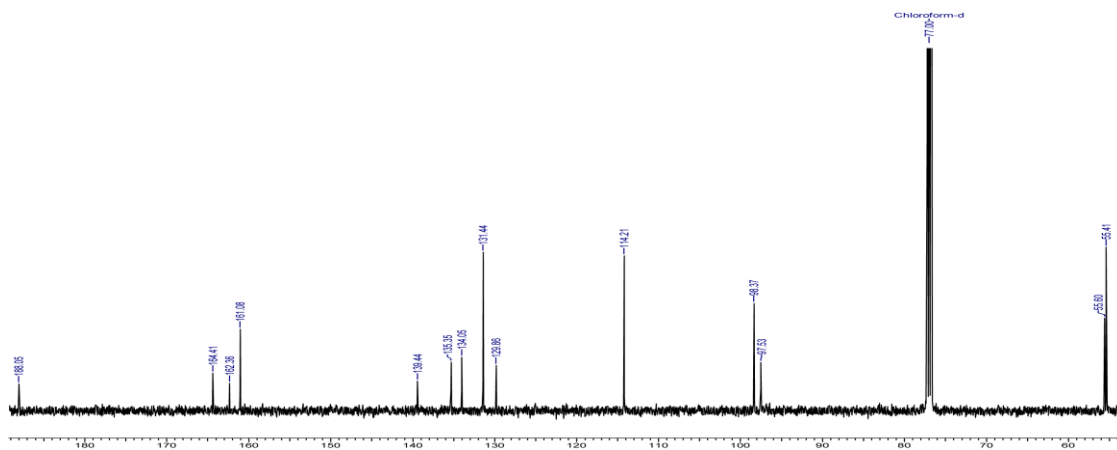
$^1\text{H}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(4-metoksifenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**27a**).



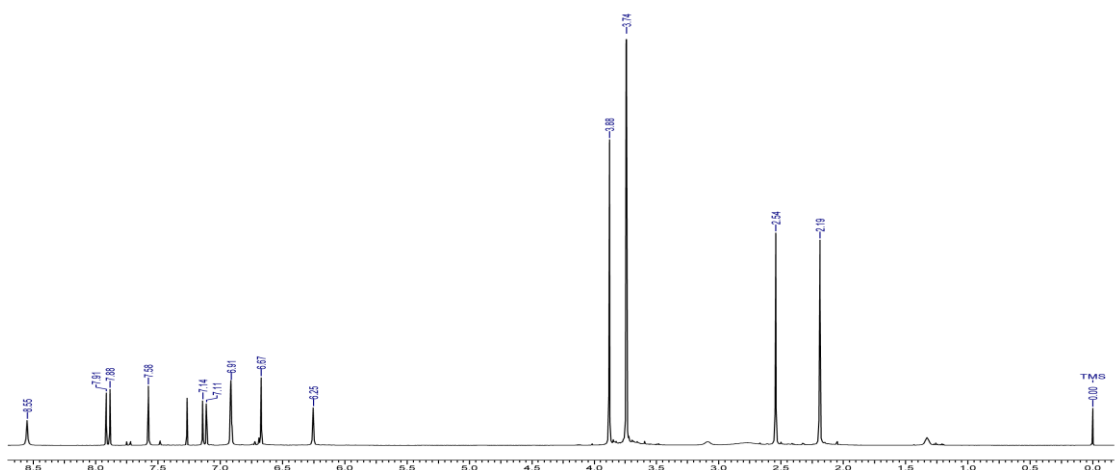
$^{13}\text{C}$  NMR spektar fenilamida (*E*)-4-(4-metoksifenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**27a**).



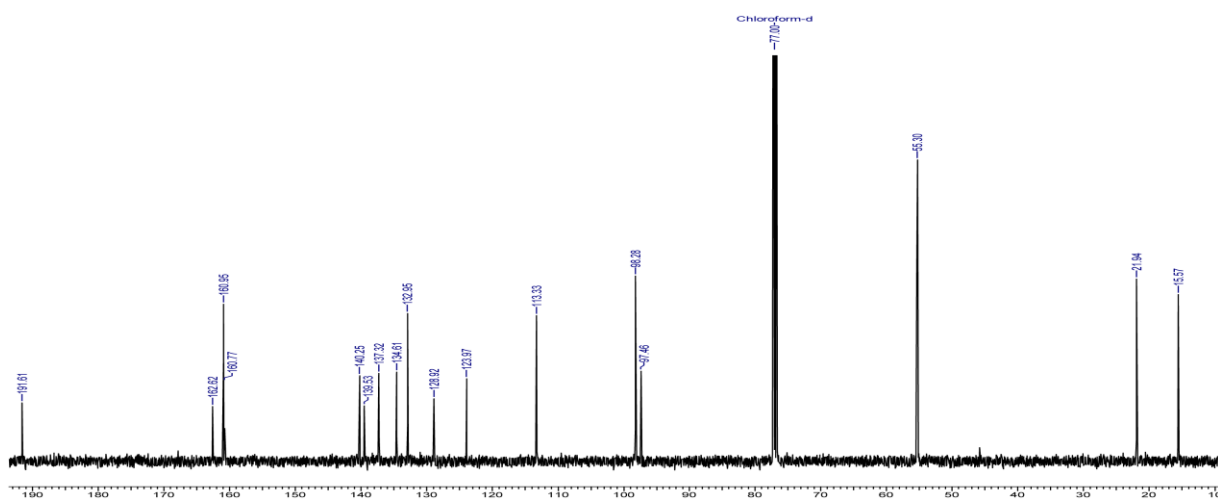
$^1\text{H}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(4-metoksifenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**28a**).



$^{13}\text{C}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(4-metoksifenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**28a**).

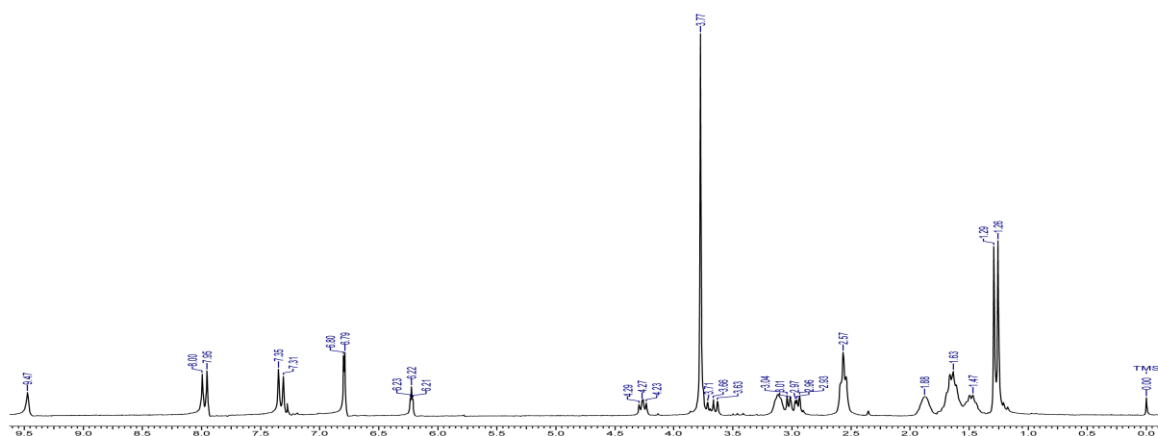


$^1\text{H}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(4-metoksi-3,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**29a**).

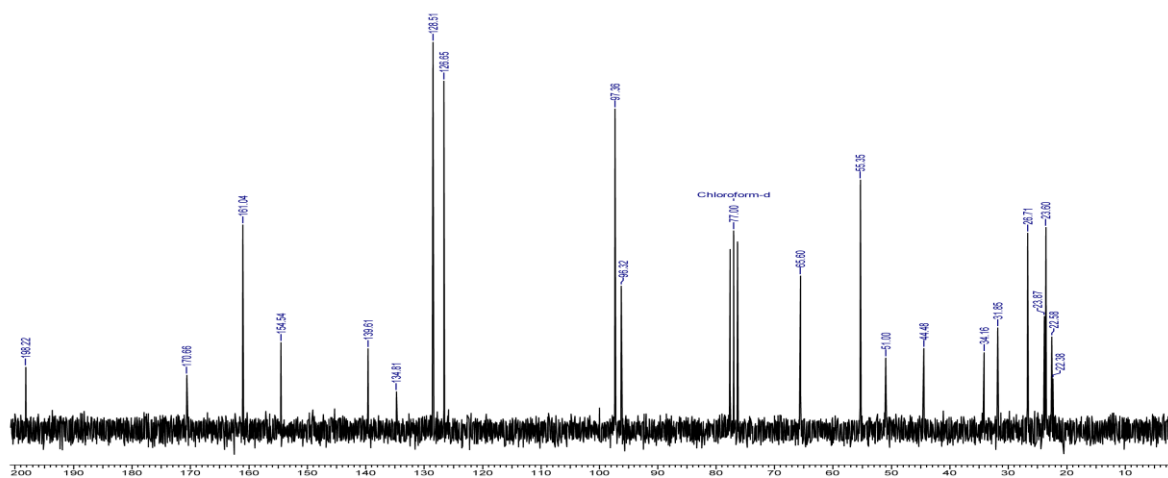


$^{13}\text{C}$  NMR spektar 3,5-dimetoksifenilamida (*E*)-4-(4-metoksi-3,5-dimetilfenil)-4-okso-2-butenske kiseline (**29a**).

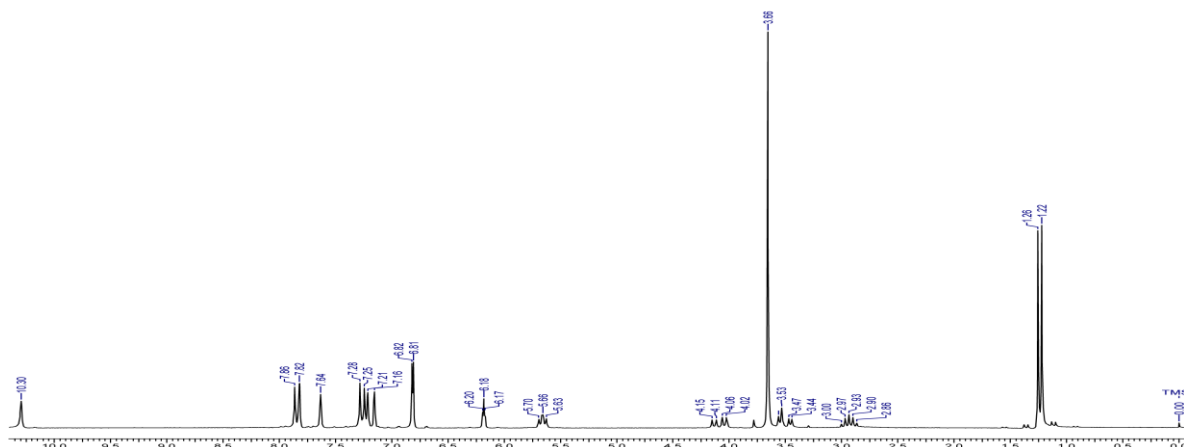
Prilog 2.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri Majklovih adukata na amide benzoilakrilnih kiselina (**1b**-**38b**)



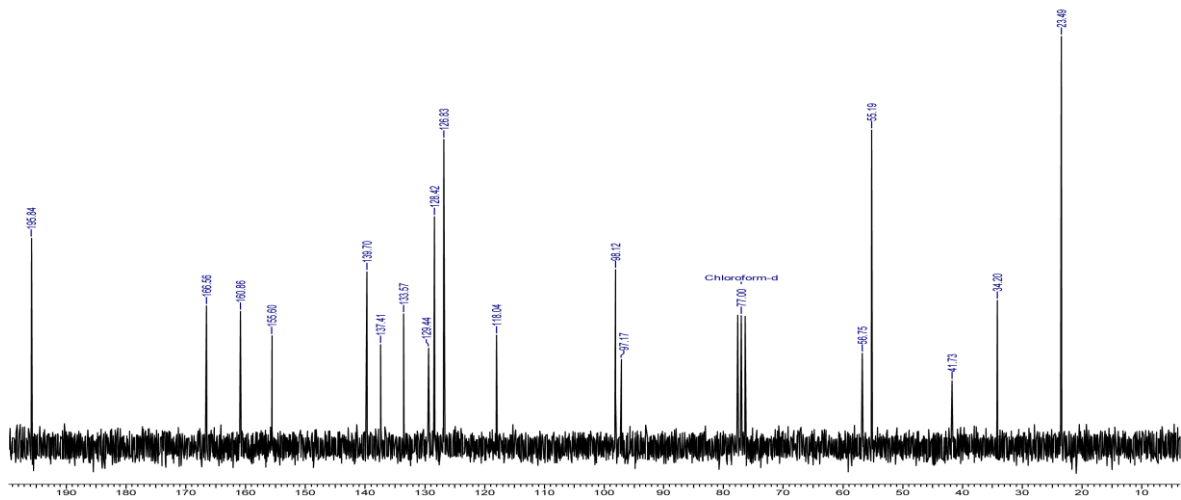
$^1\text{H}$  NMR spektr *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (**1b**).



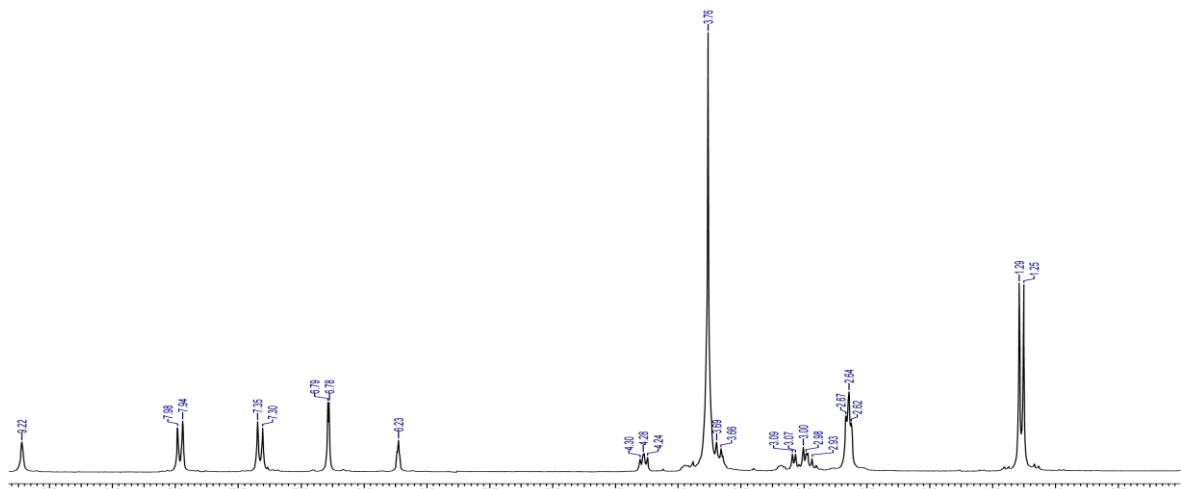
$^{13}\text{C}$  NMR spektr *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (**1b**).



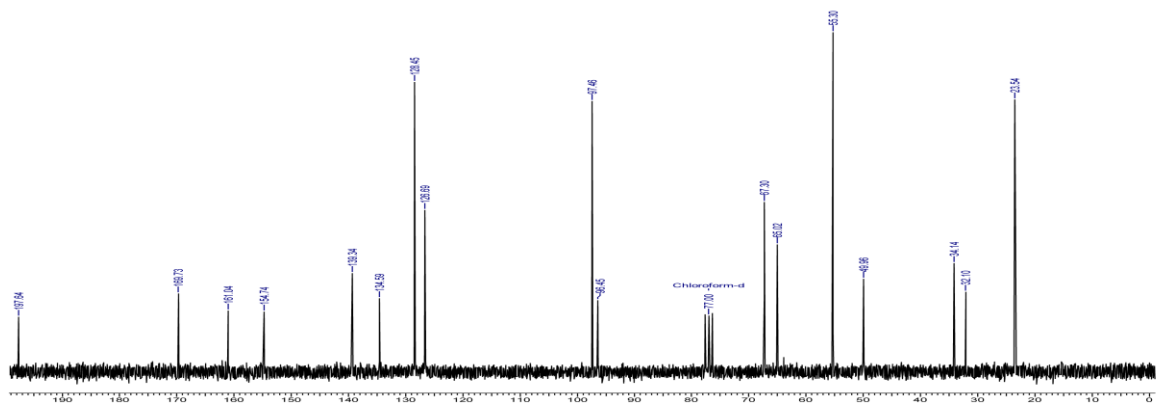
$^1\text{H}$  NMR spektr *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (**2b**).



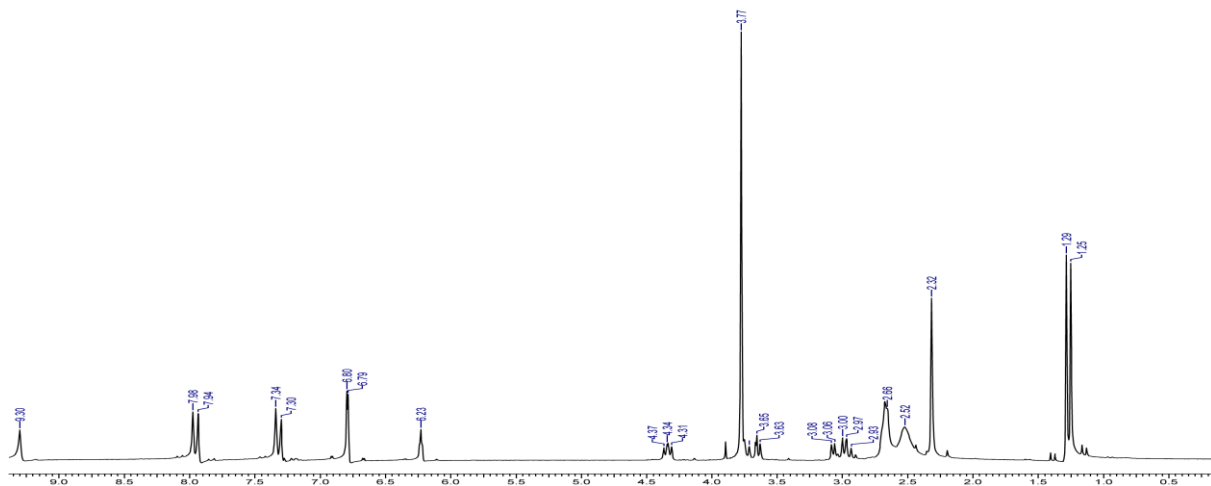
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (**2b**).



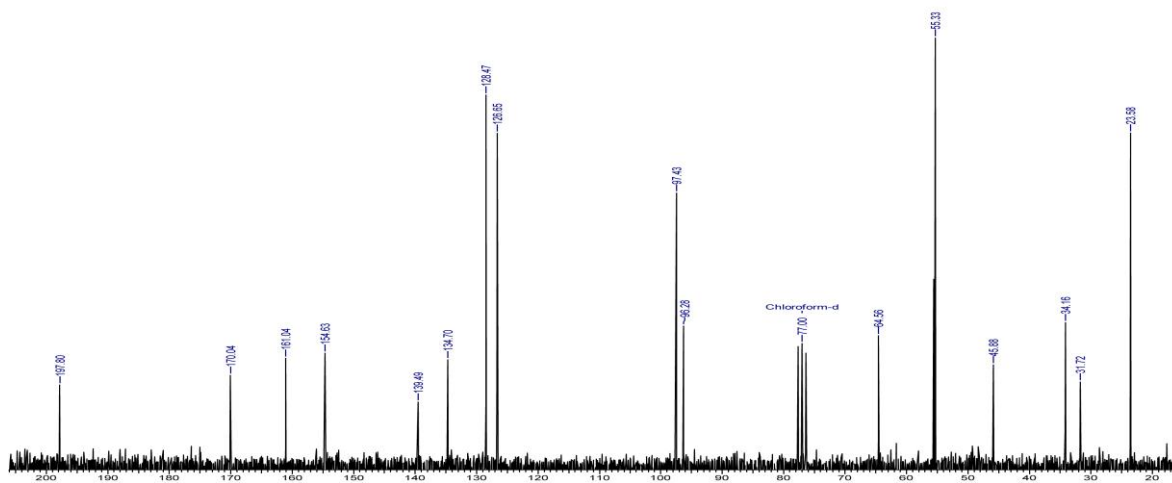
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)butanamida (**3b**).



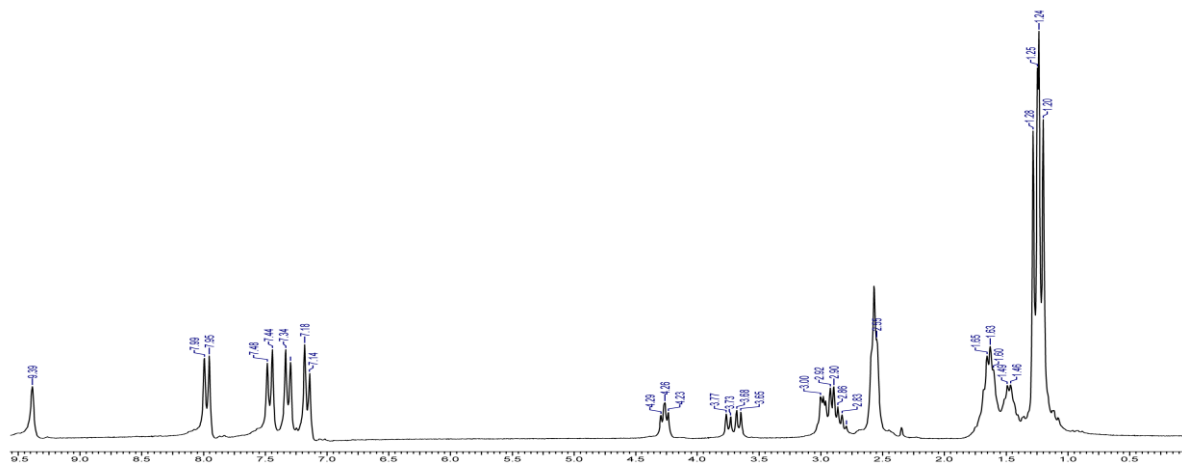
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)butanamida (**3b**).



$^1\text{H}$  NMR spektrar *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-butanamida (**4b**).

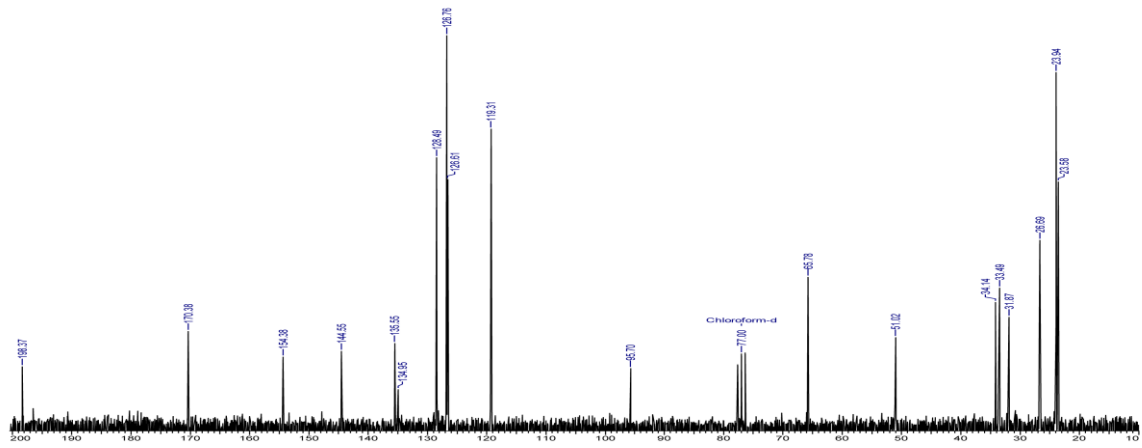


$^{13}\text{C}$  NMR spektrar *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-butanamida (**4b**).

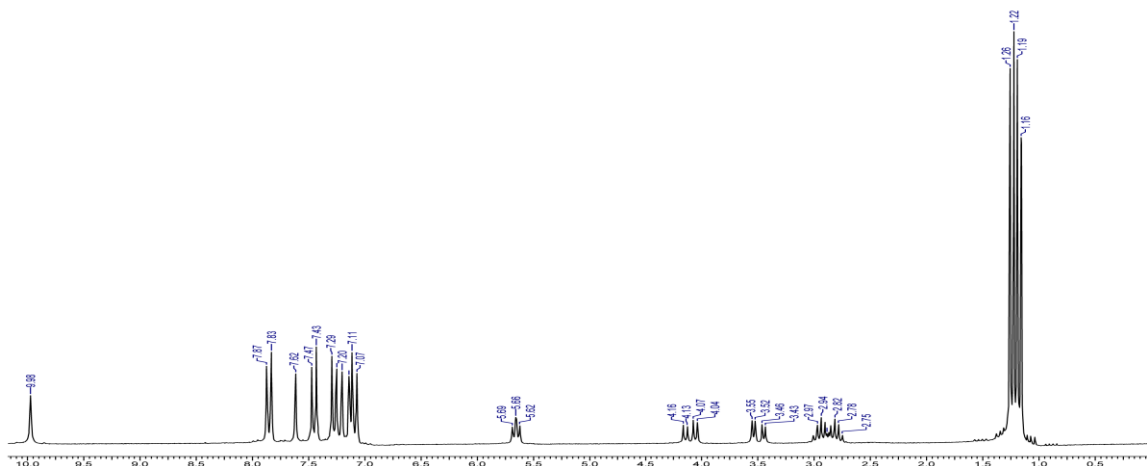


$^1\text{H}$  NMR spektrar *N*-(4-izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (**5b**).

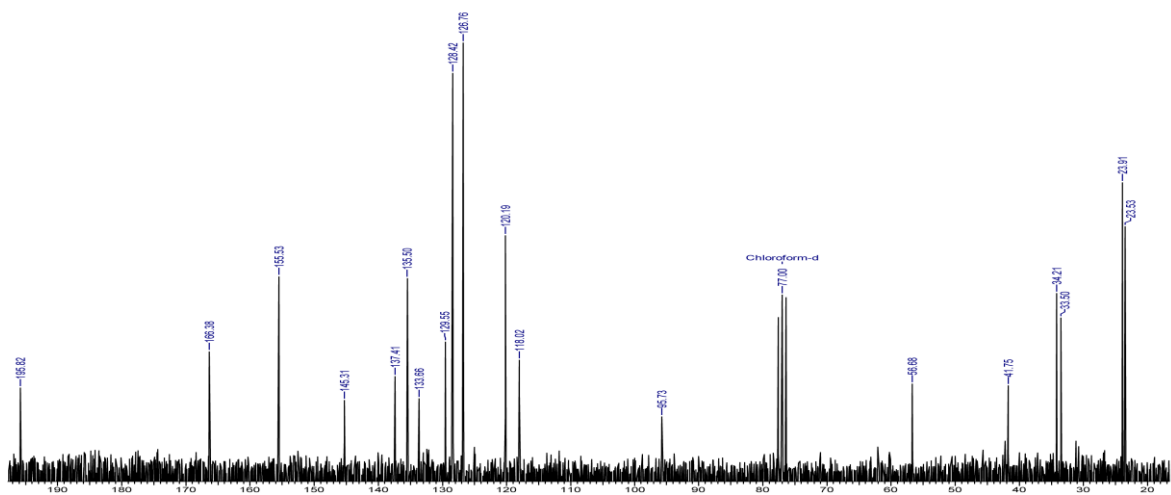




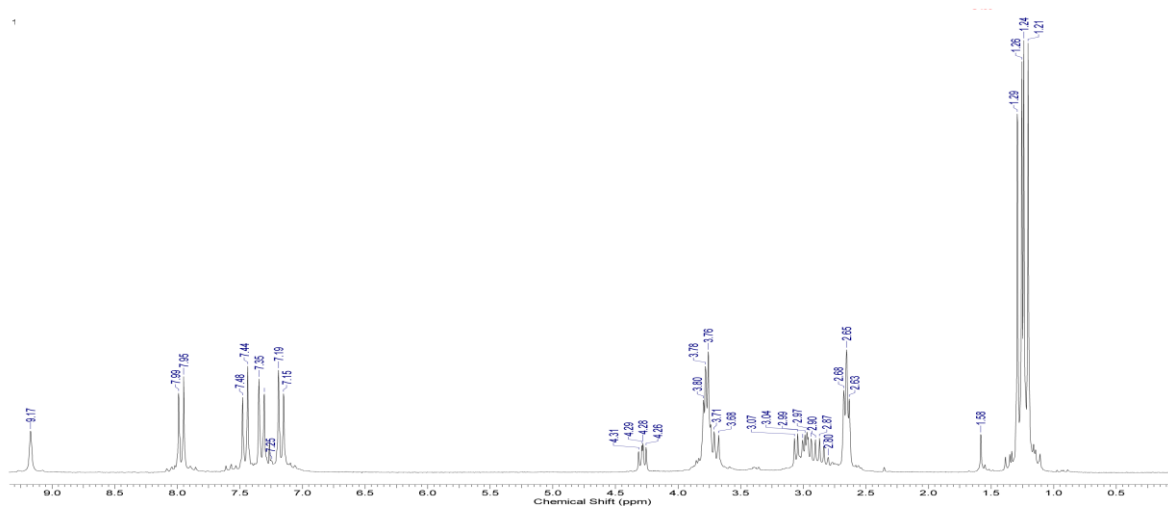
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (5b).



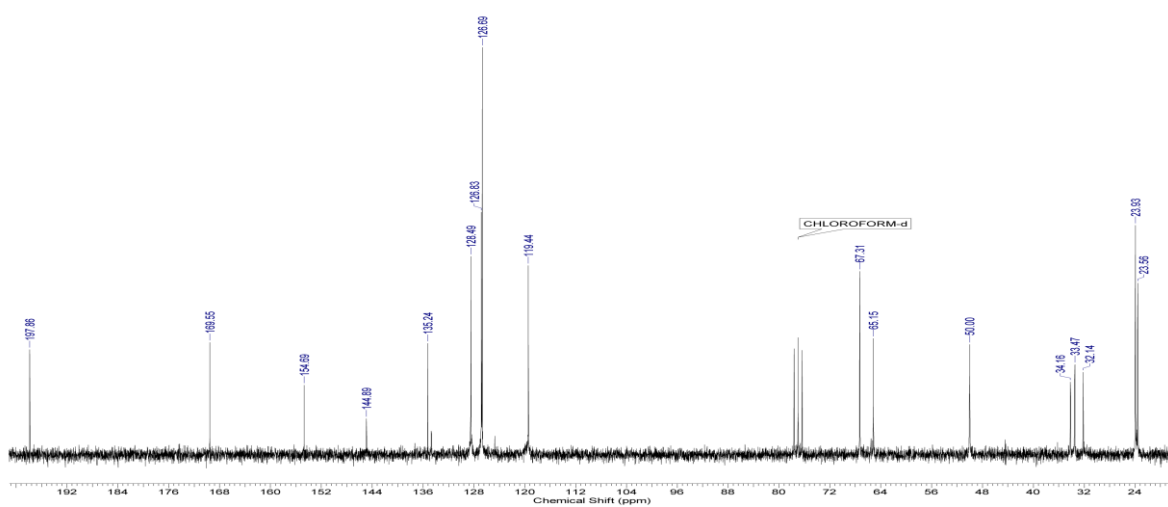
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (6b).



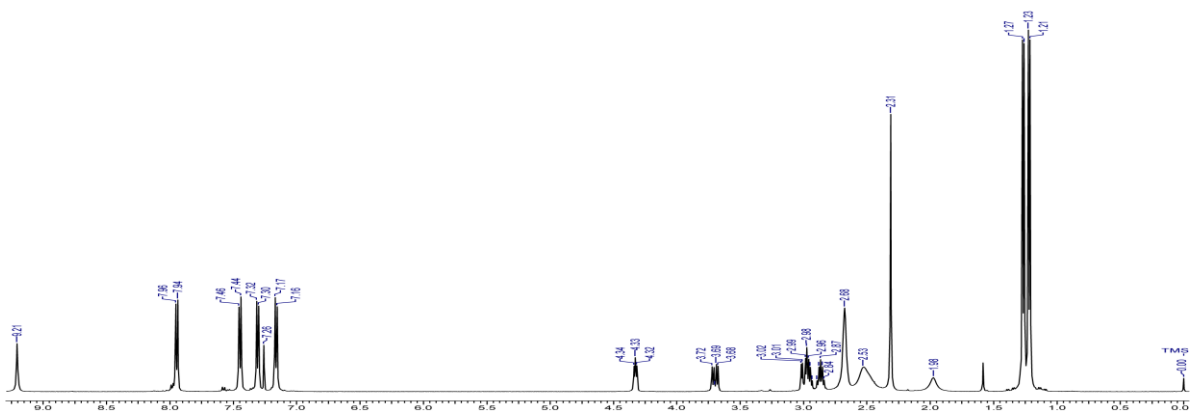
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (6b).



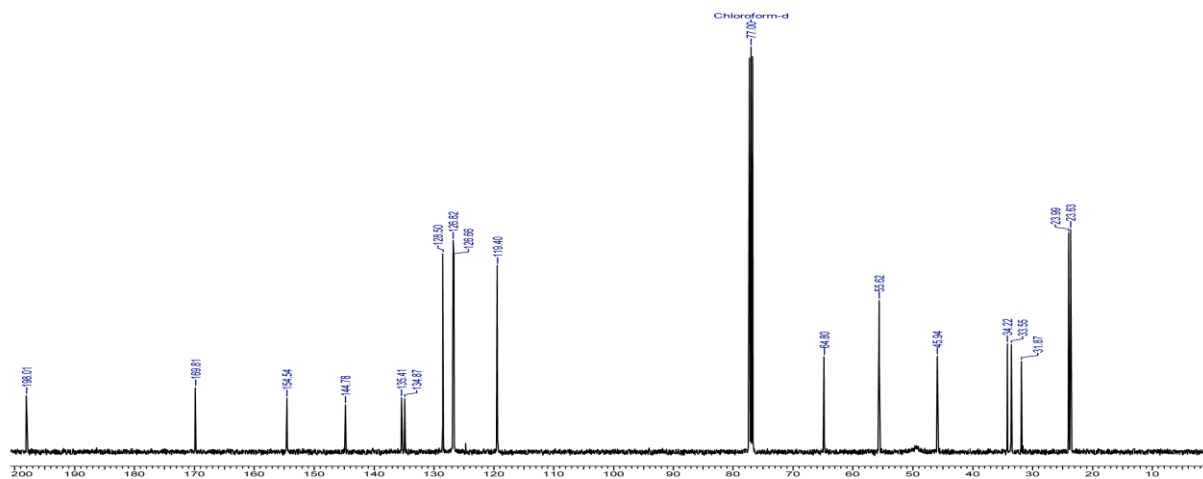
<sup>1</sup>H NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-morfolinil]butanamida (**7b**).



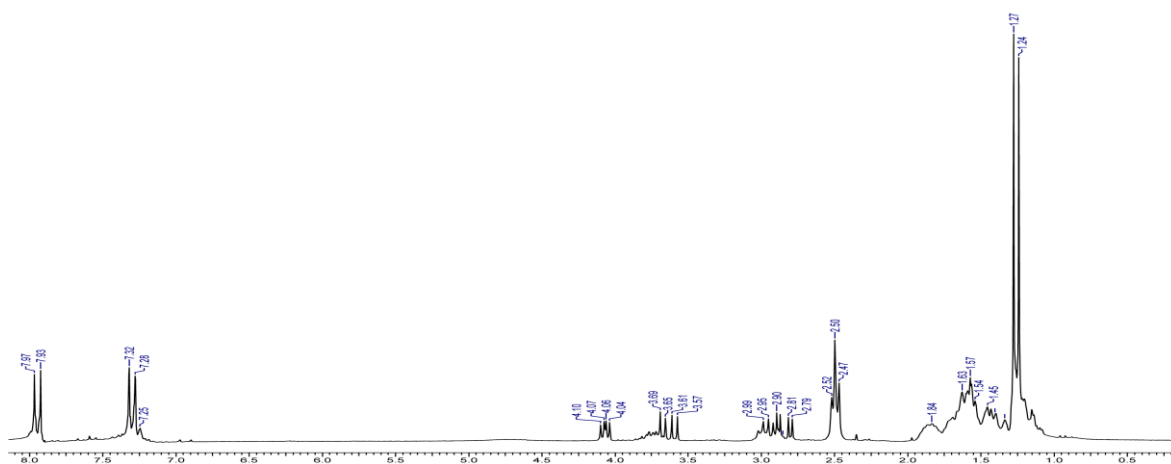
<sup>13</sup>C NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-morfolinil]butanamida (**7b**).



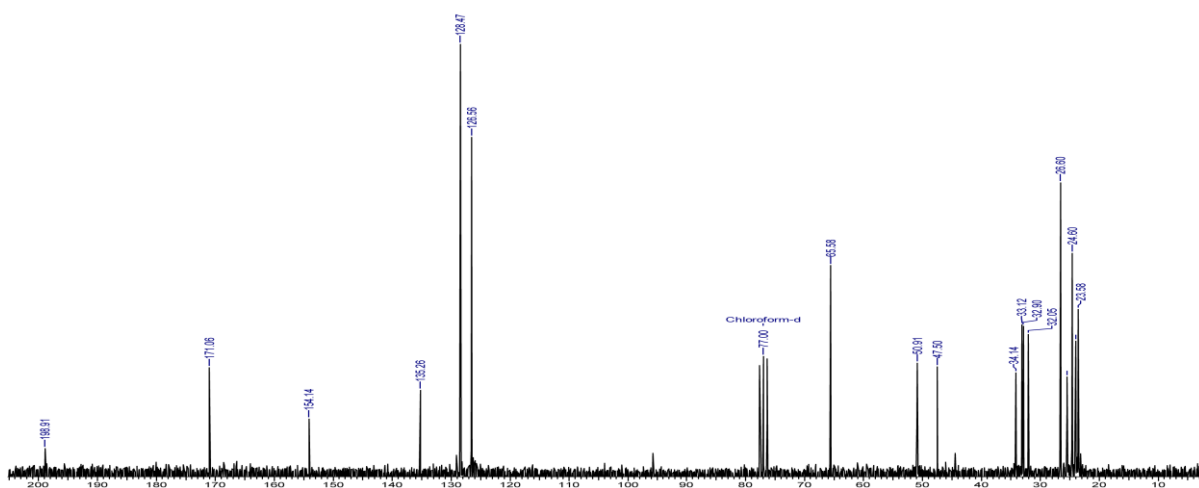
<sup>1</sup>H NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]butanamida (**8b**).



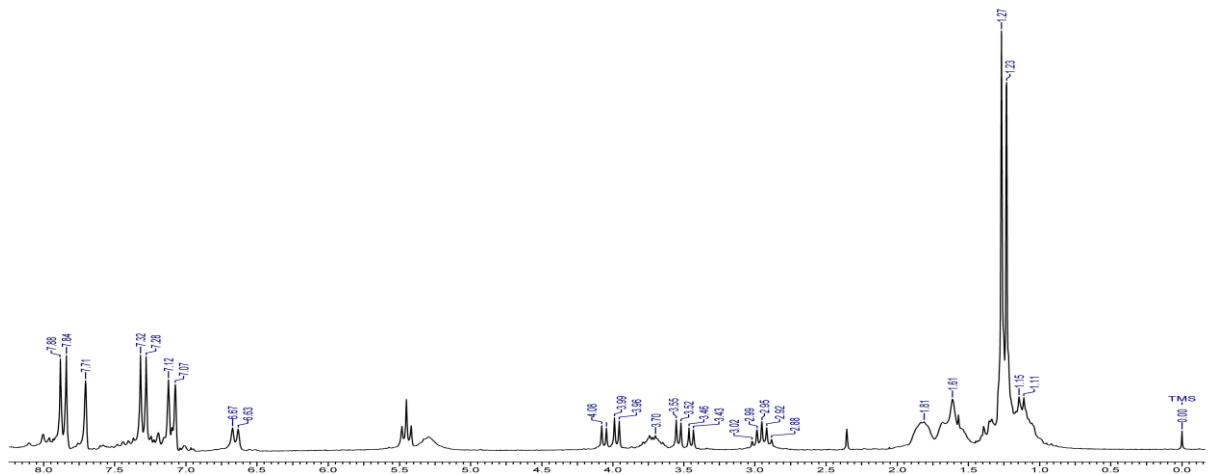
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]butanamida (**8b**).



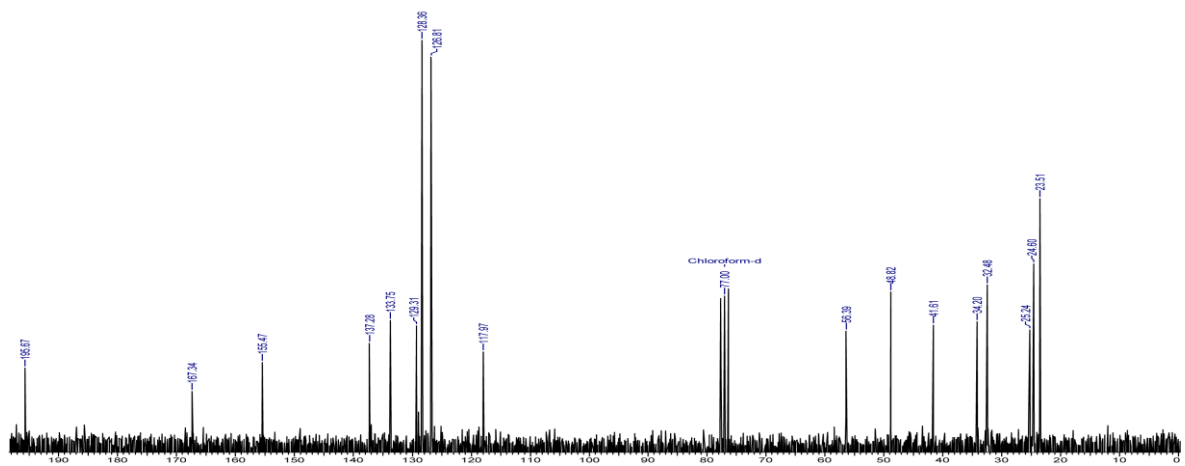
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (**9b**).



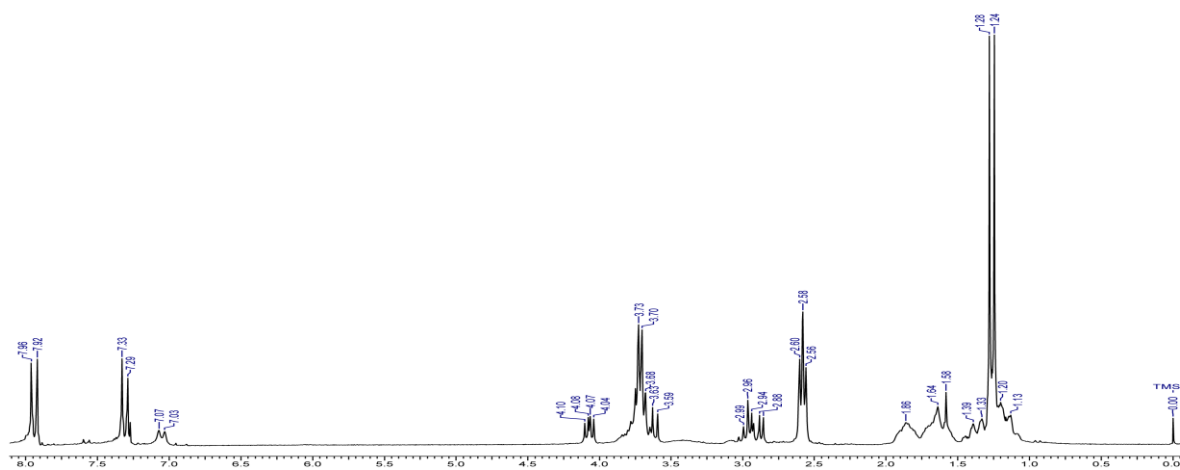
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (**9b**).



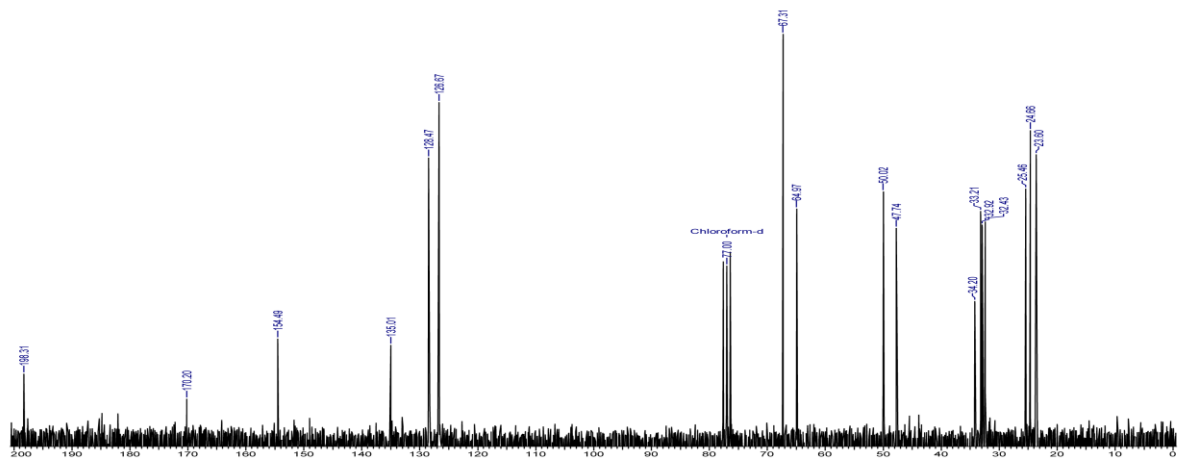
$^1\text{H}$  NMR spektr *N*-cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (**10b**).



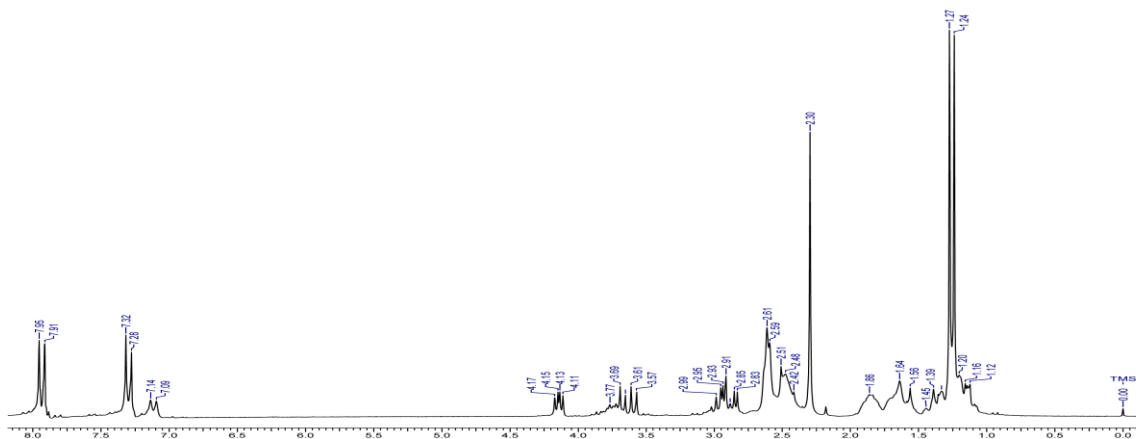
$^{13}\text{C}$  NMR spektr *N*-cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (**10b**).



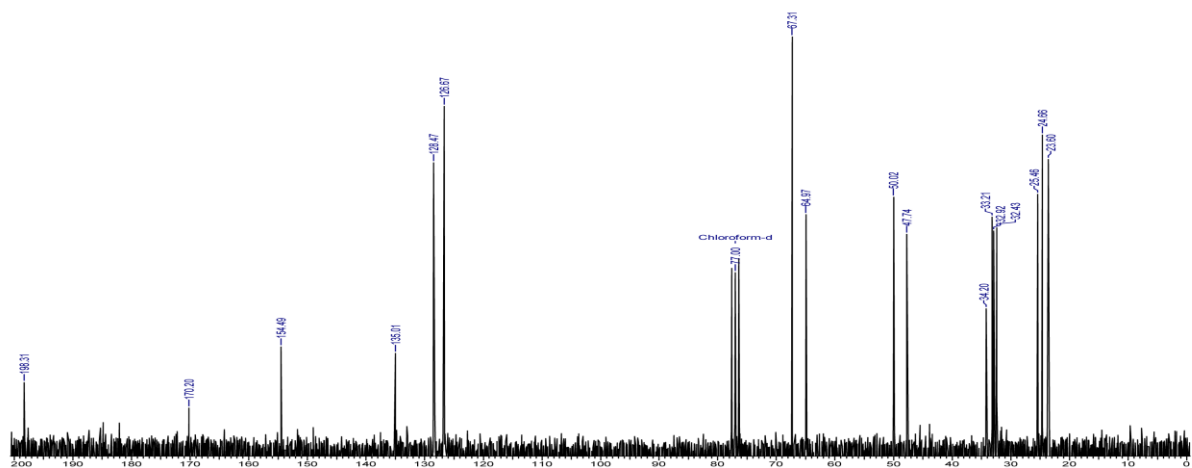
$^1\text{H}$  NMR spektr *N*-cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morpholinil)butanamida (**11b**).



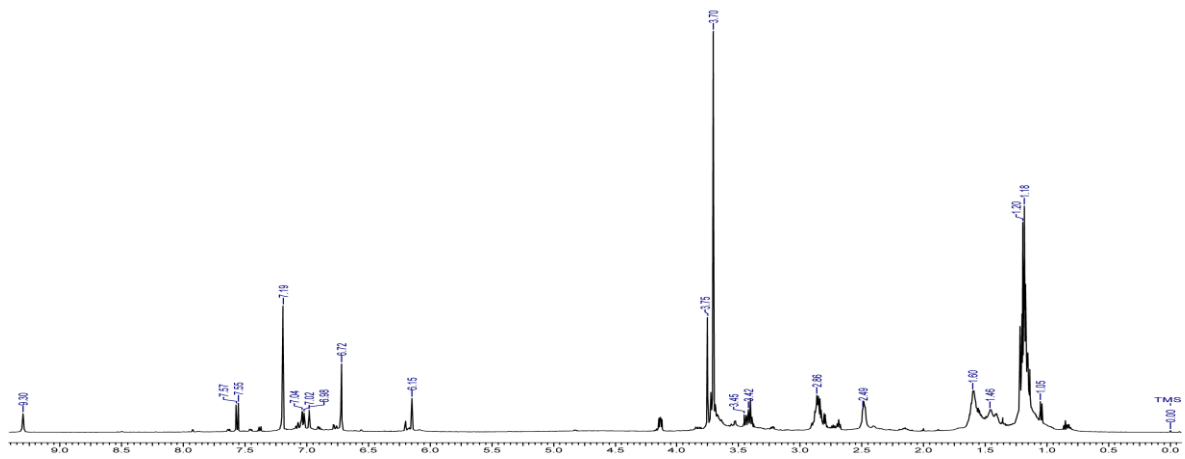
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morpholinil)butanamida (**11b**).



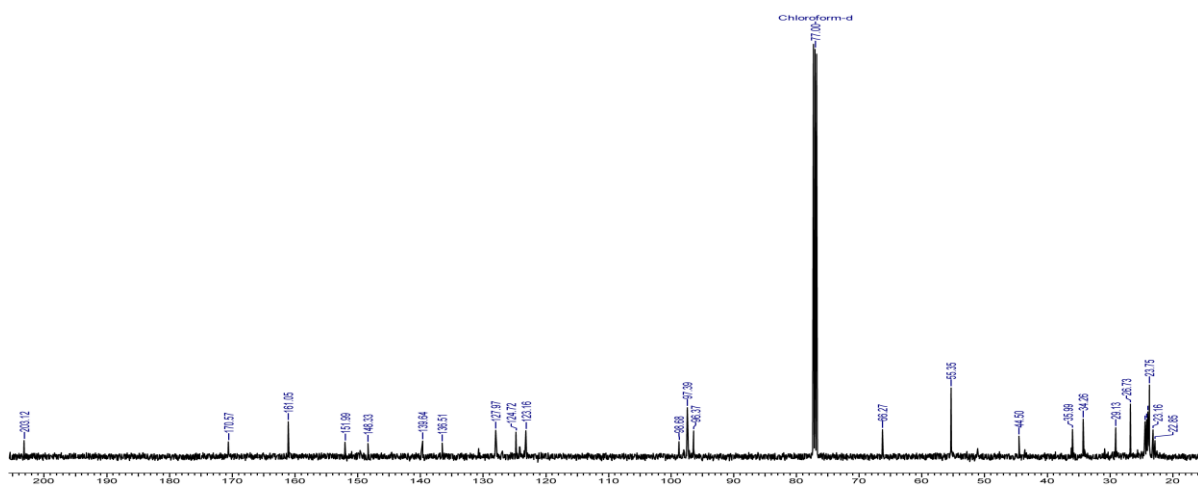
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)butanamida (**12b**).



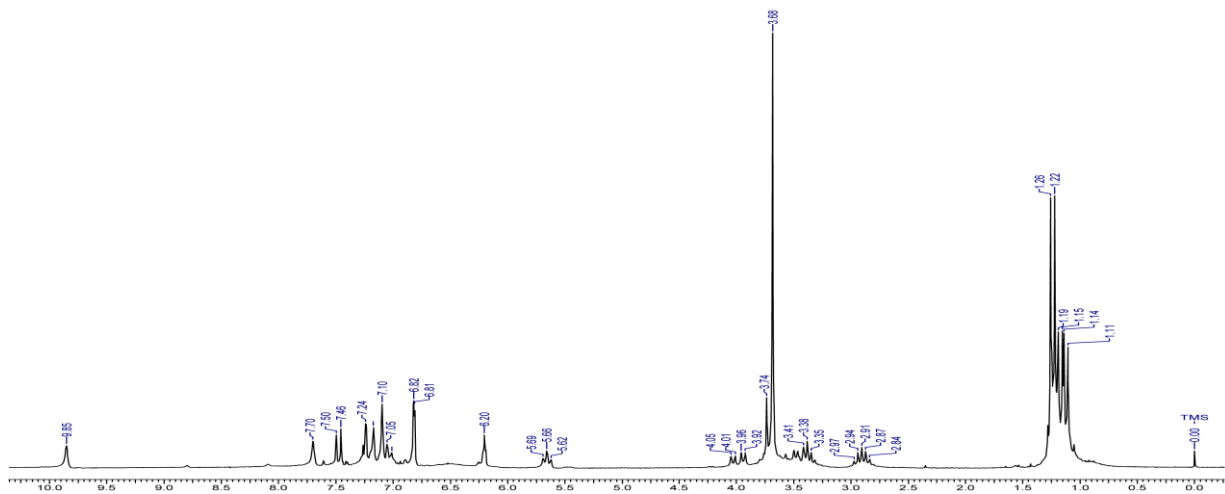
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)butanamida (**12b**).



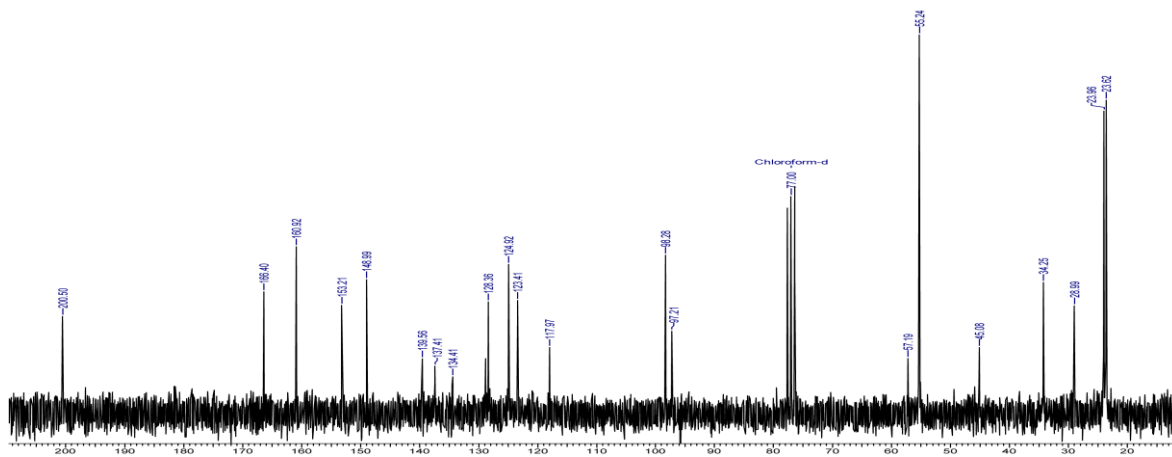
$^1\text{H}$  NMR spektr 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (**13b**).



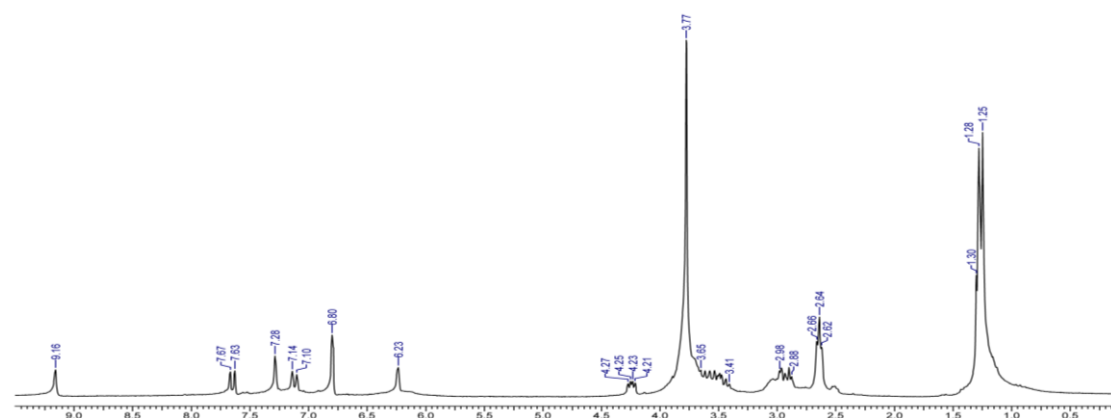
$^{13}\text{C}$  NMR spektr 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (**13b**).



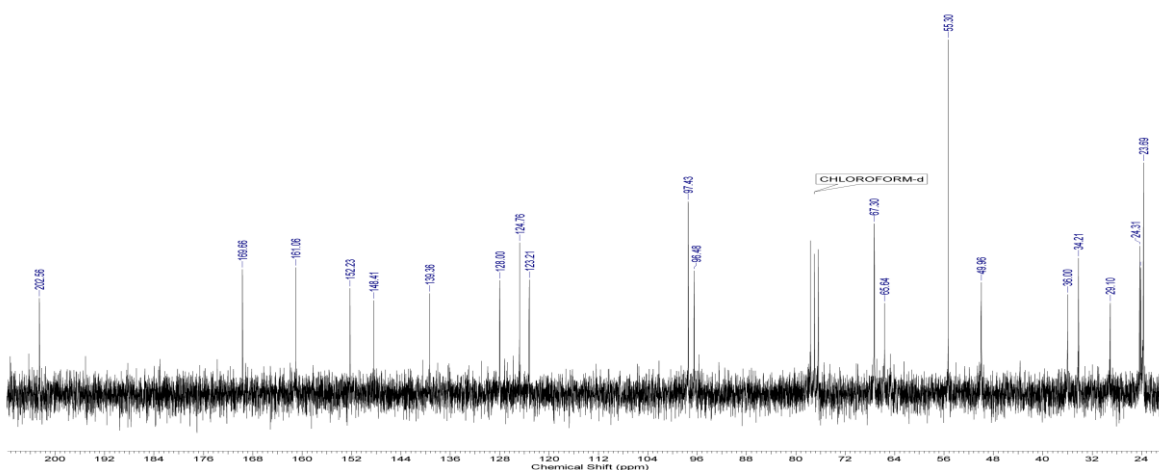
$^1\text{H}$  NMR spektr 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (**14b**).



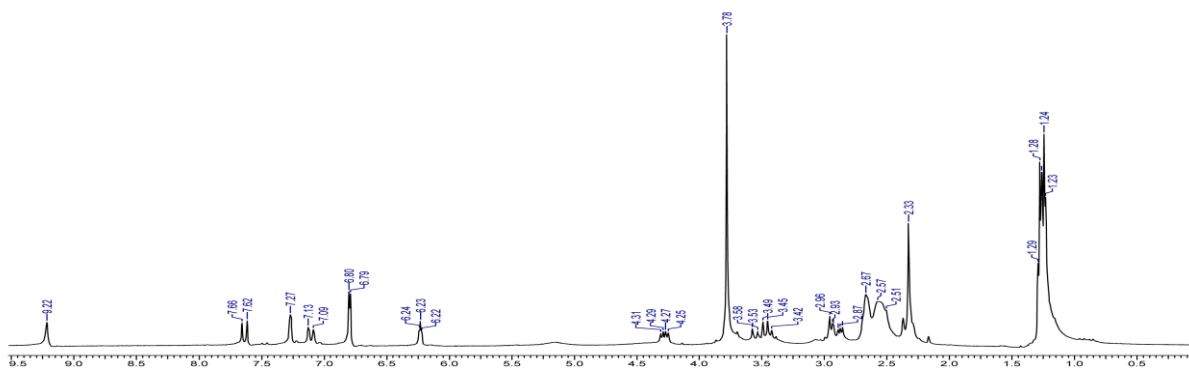
$^{13}\text{H}$  NMR spektar 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (**14b**).



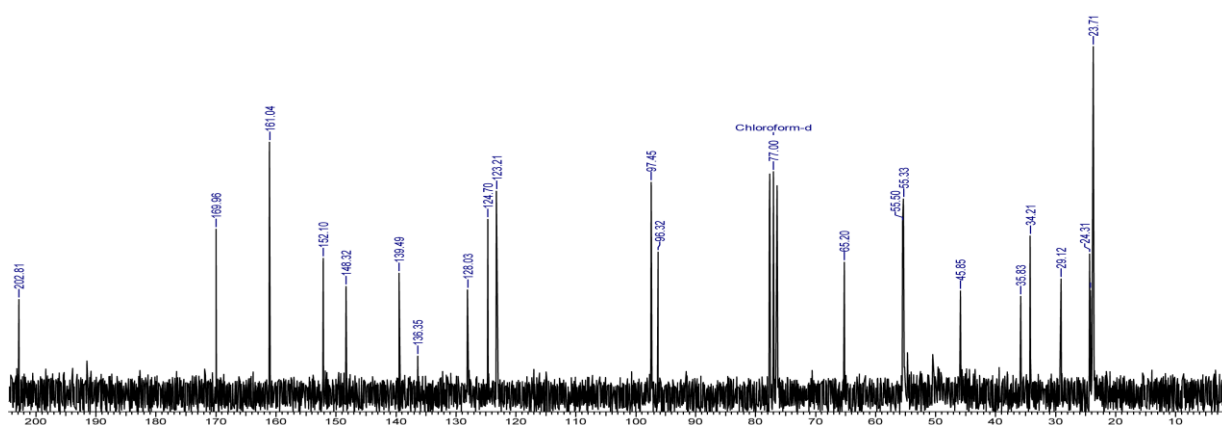
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)butanamida (**15b**).



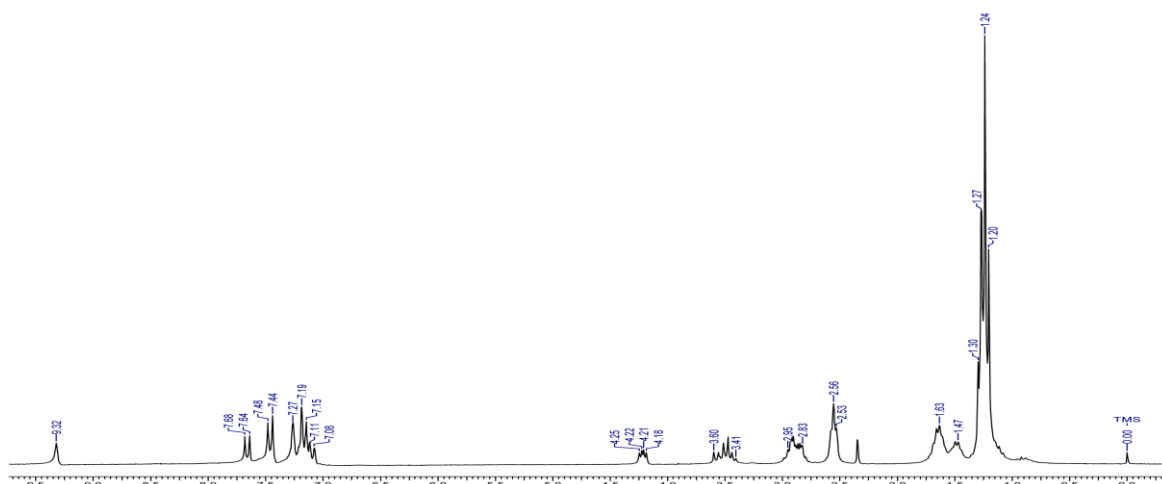
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)butanamida (**15b**).



$^1\text{H}$  NMR spektri 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]butanamida (**16b**).

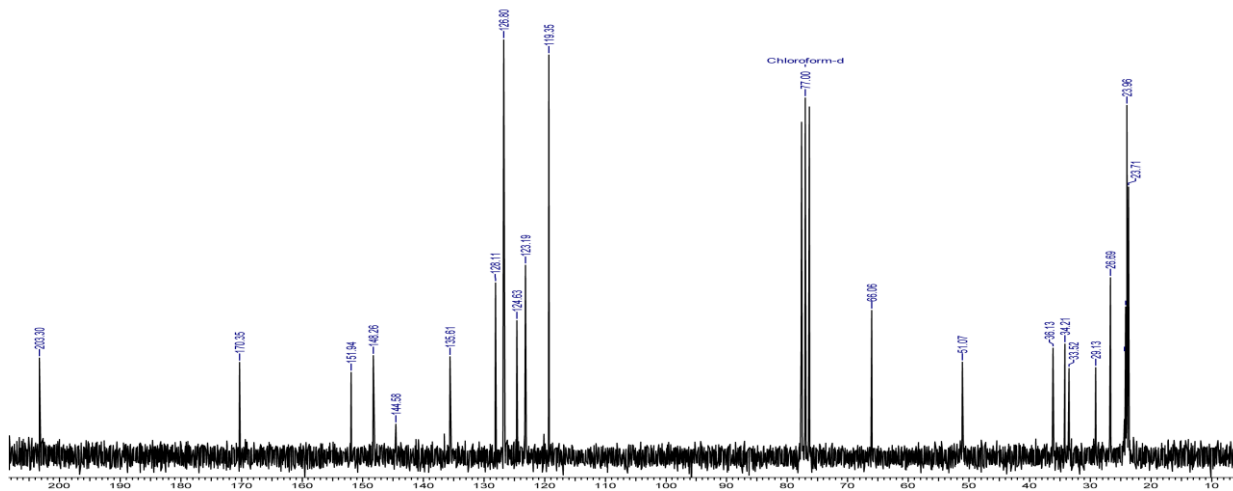


$^{13}\text{C}$  NMR spektri 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]butanamida (**16b**).

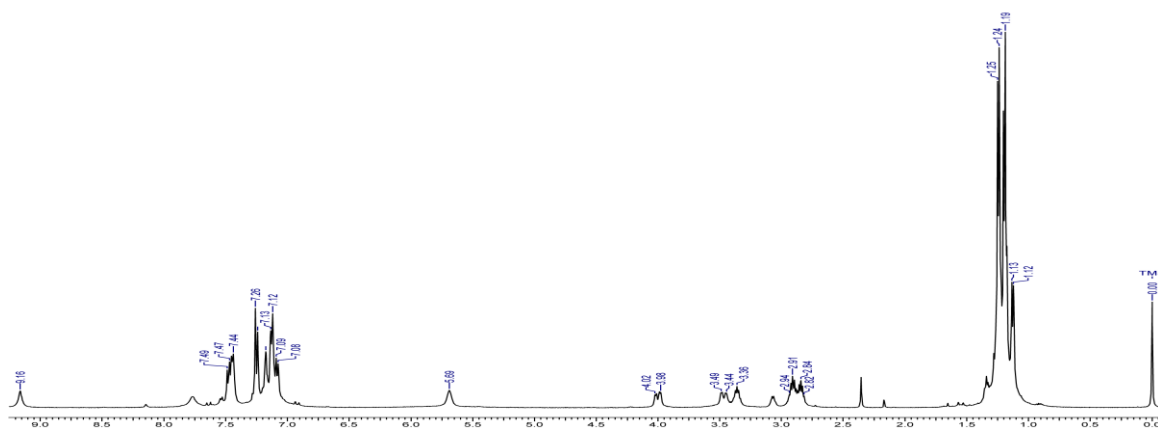


$^1\text{H}$  NMR spektar (2,4-diizopropilfenil)-*N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (**17b**).

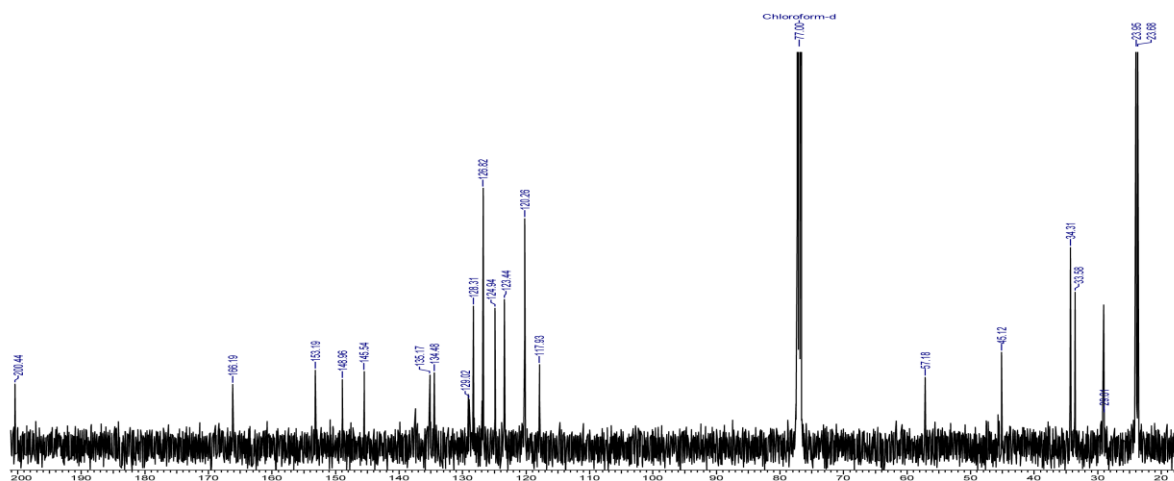




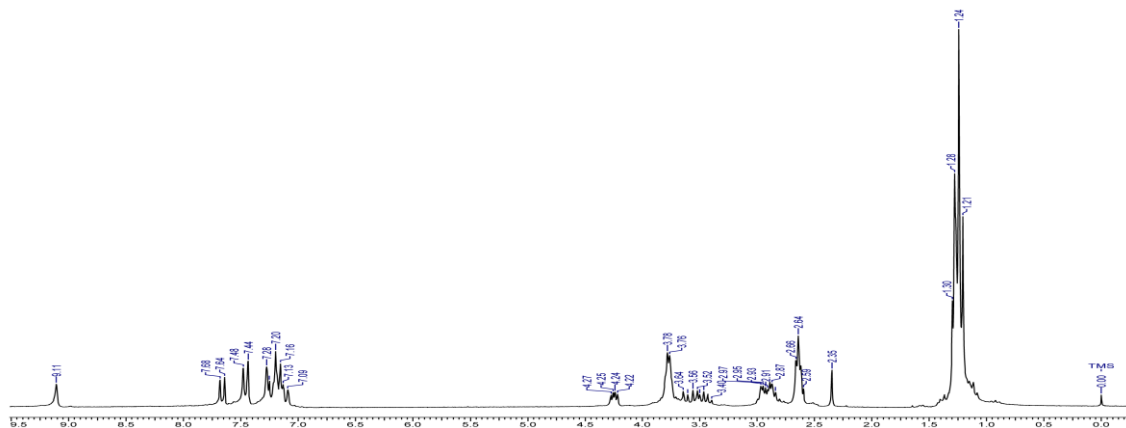
$^{13}\text{C}$  NMR spektar (2,4-diizopropilfenil)-*N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (**17b**).



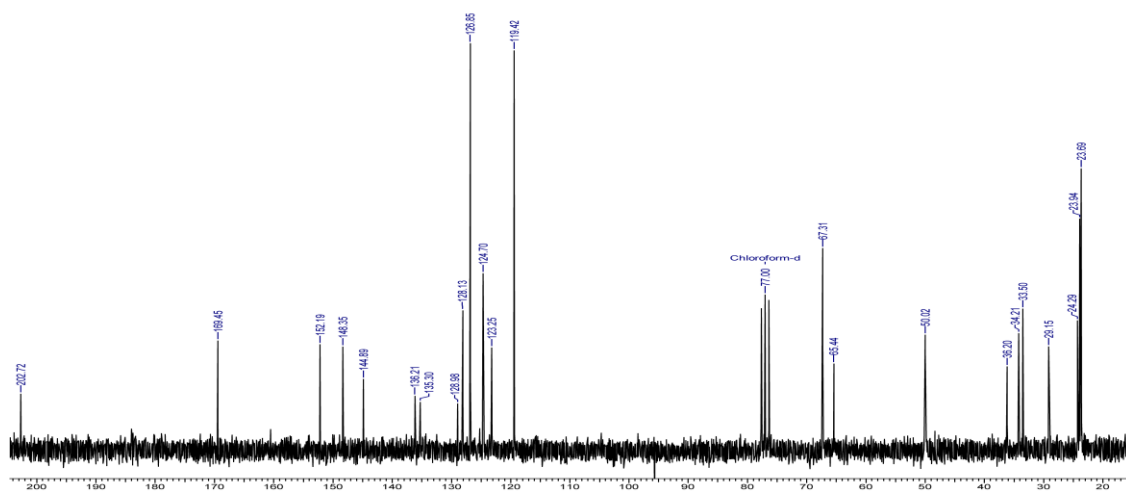
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (**18b**).



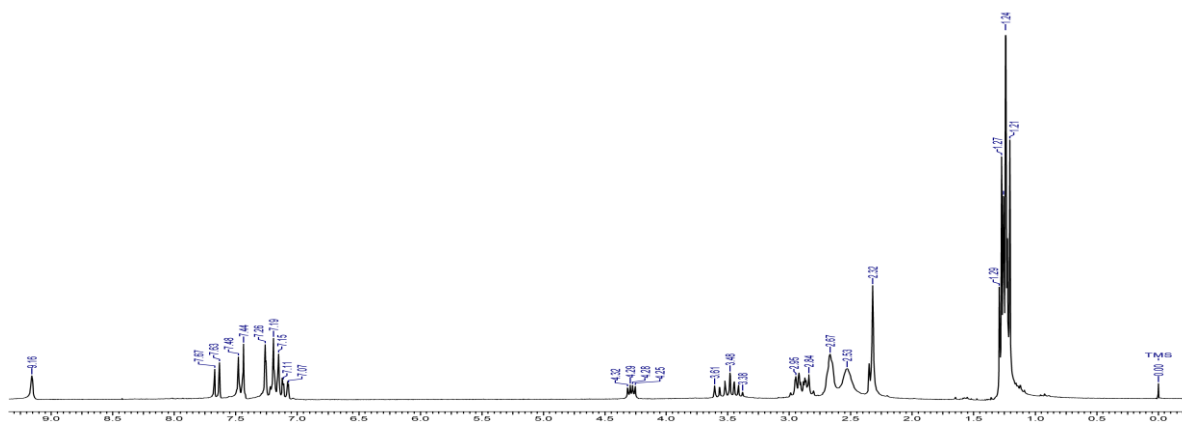
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (**18b**).



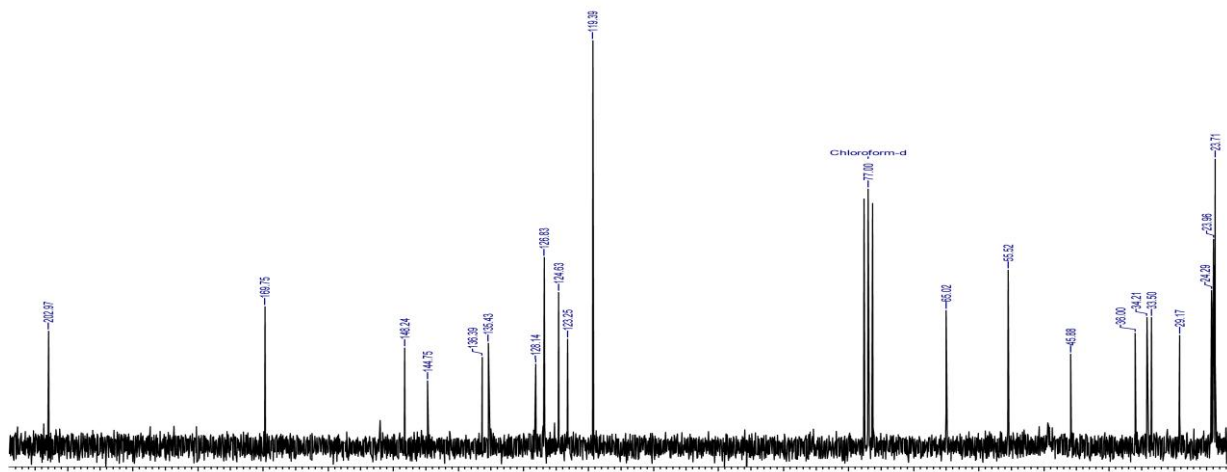
$^1\text{H}$  NMR spektri 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)butanamida (**19b**).



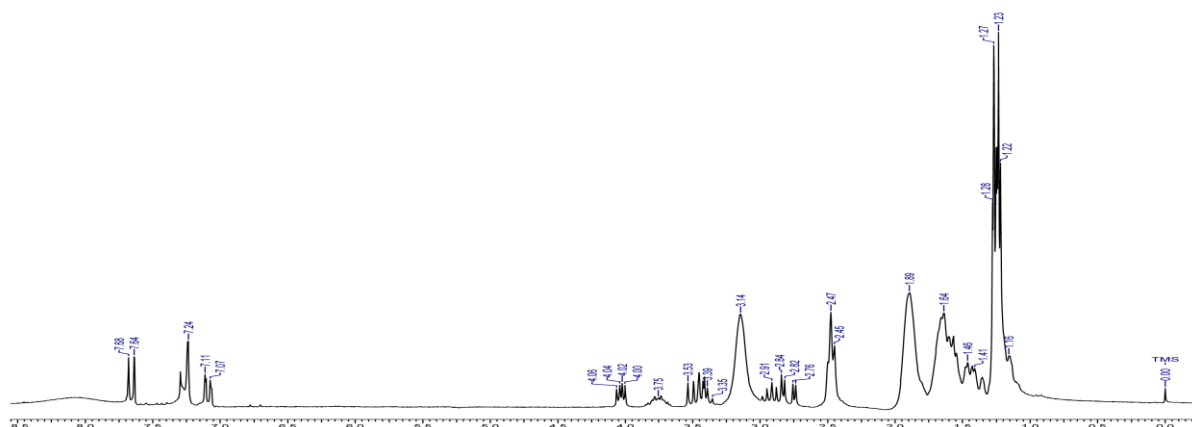
$^{13}\text{C}$  NMR spektri 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)butanamida (**19b**).



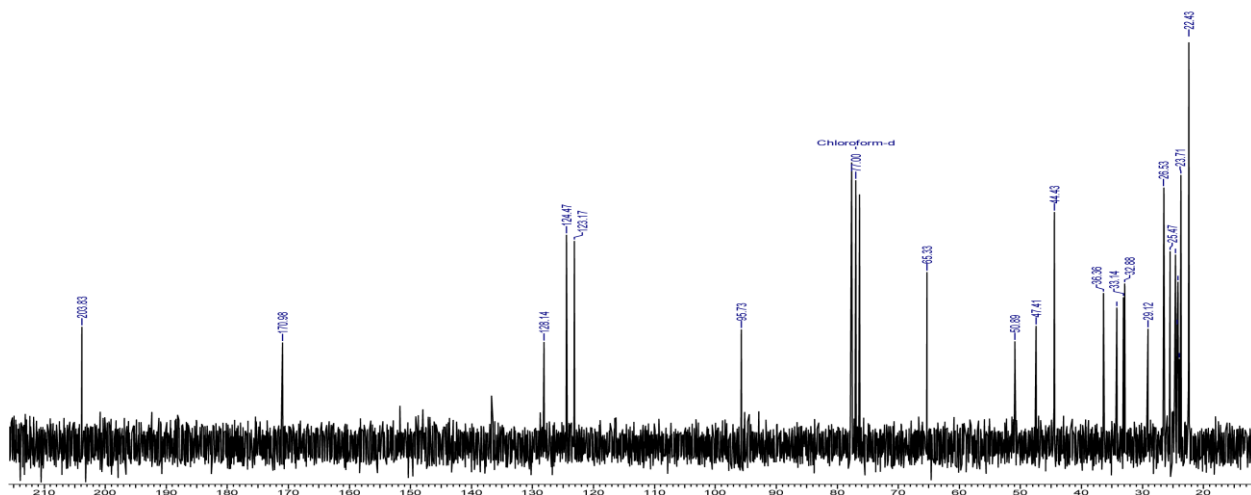
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]butanamida (**20b**).



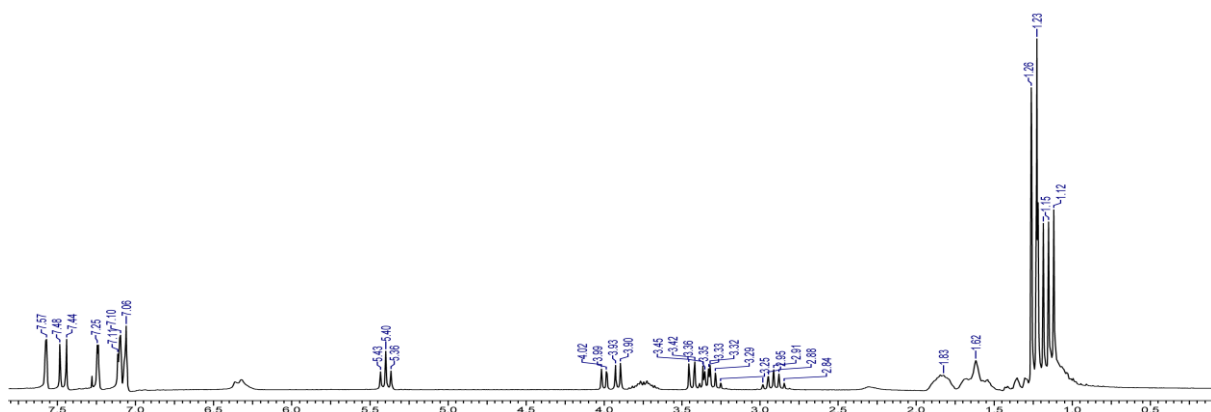
$^{13}\text{C}$  NMR spektr 4-(2,4-diizopropilfenil)-*N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]butanamida (**20b**).



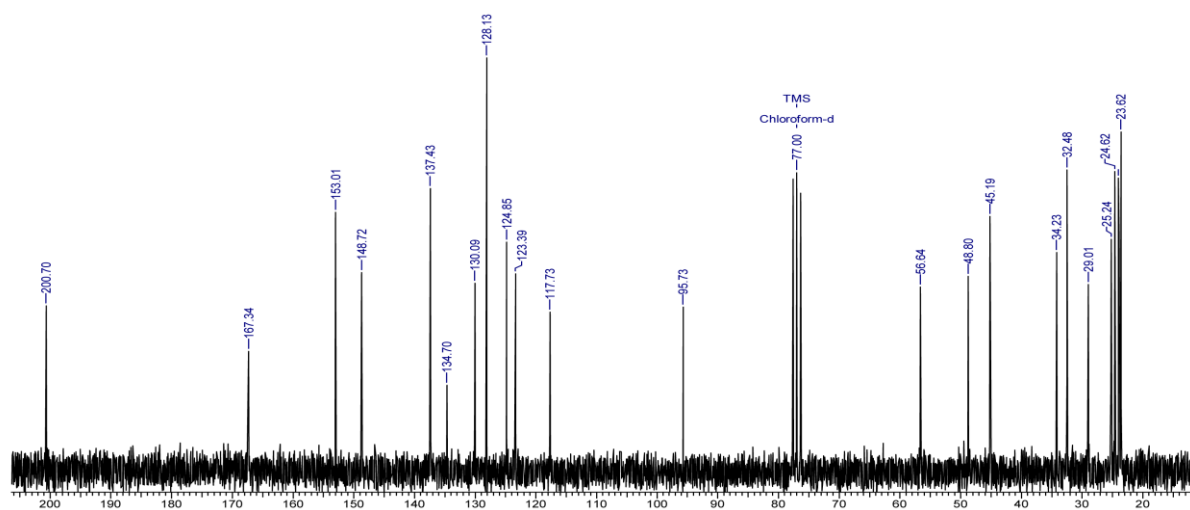
$^1\text{H}$  NMR spektr *N*-cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (**21b**).



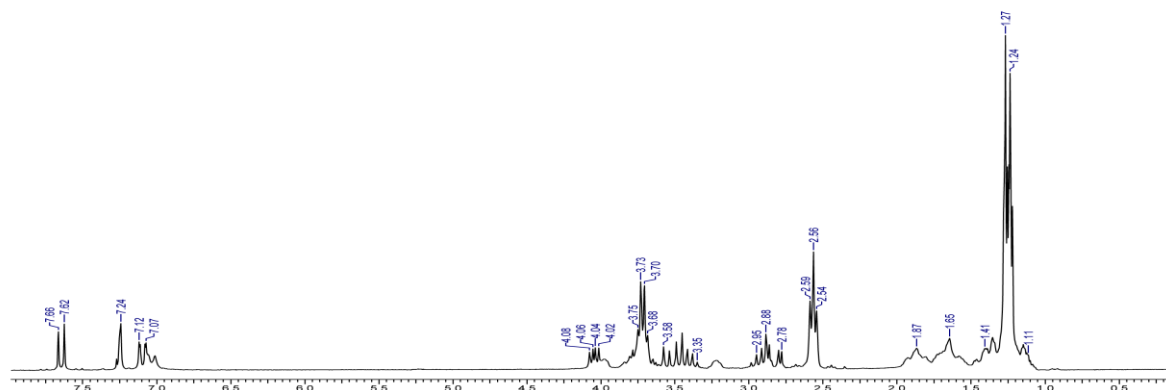
$^{13}\text{H}$  NMR spektr *N*-cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)butanamida (**21b**).



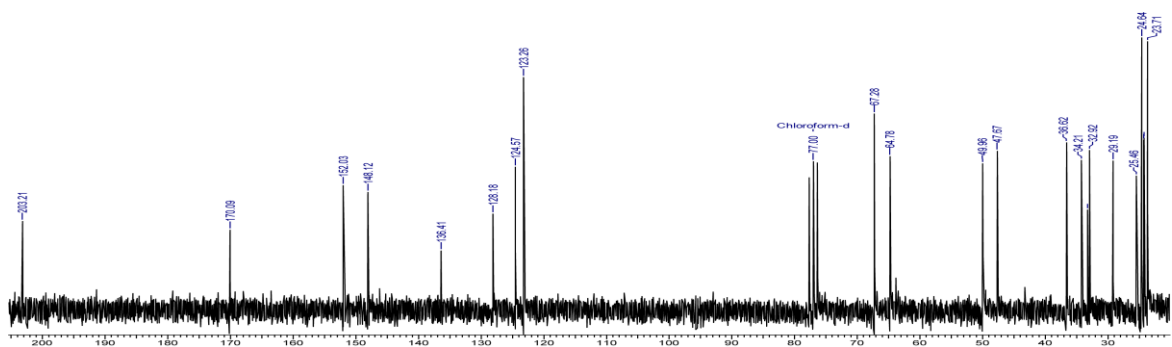
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (22b).



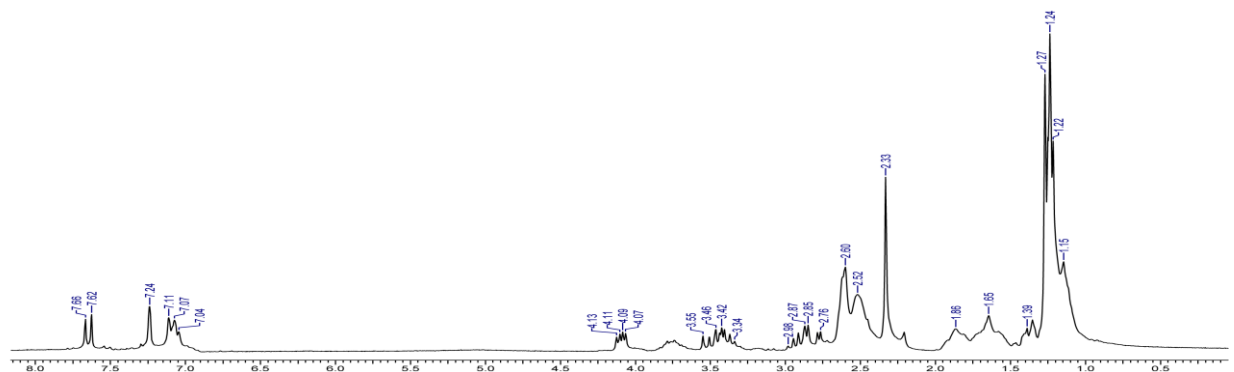
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)butanamida (22b).



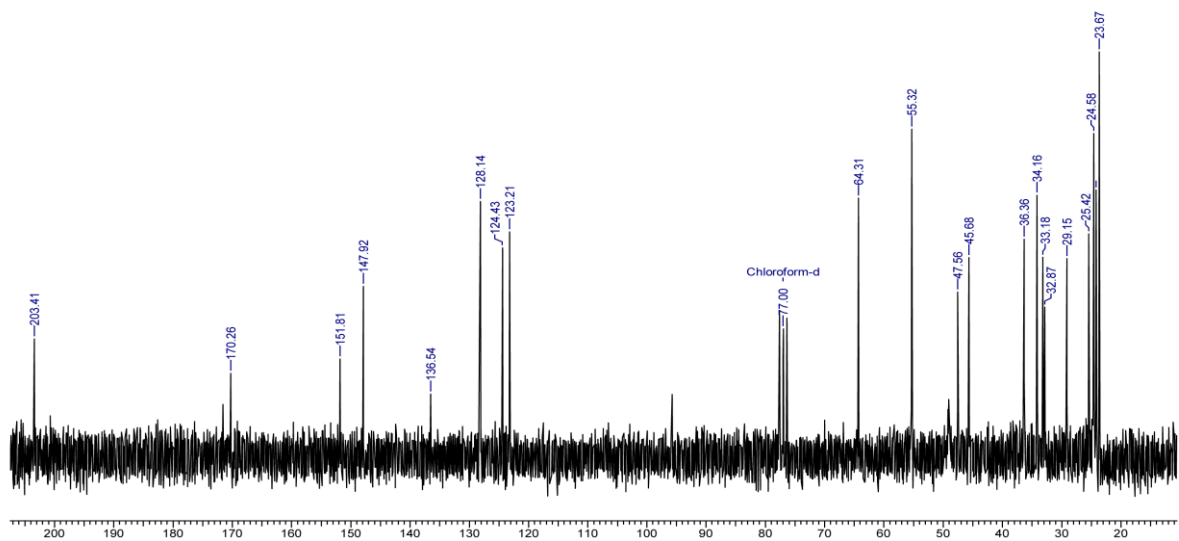
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)butanamida (23b).



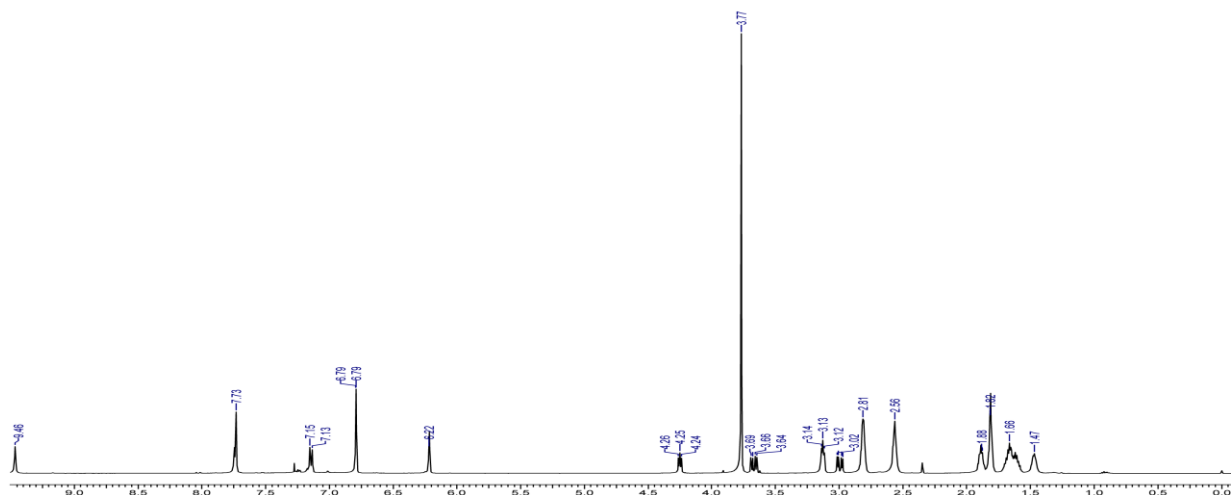
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)butanamida (**23b**).



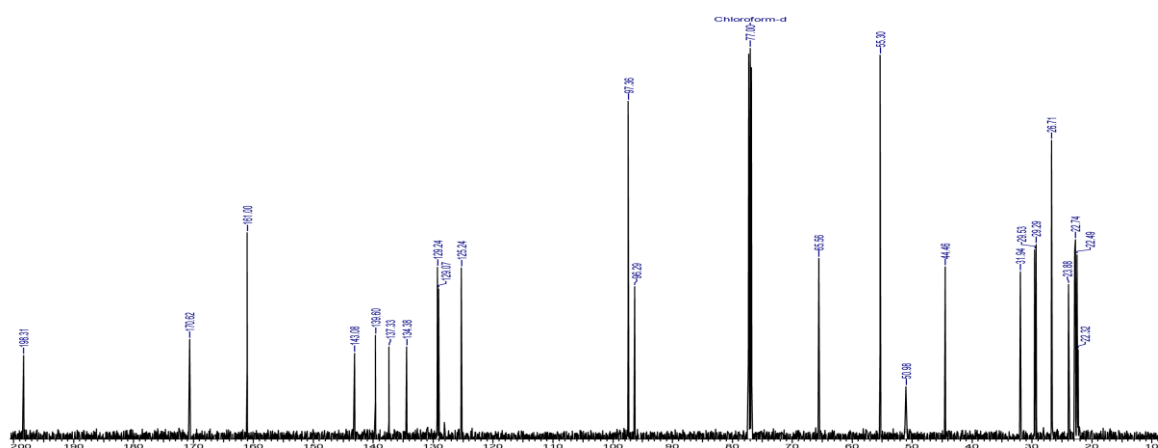
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]butanamida (**24b**).



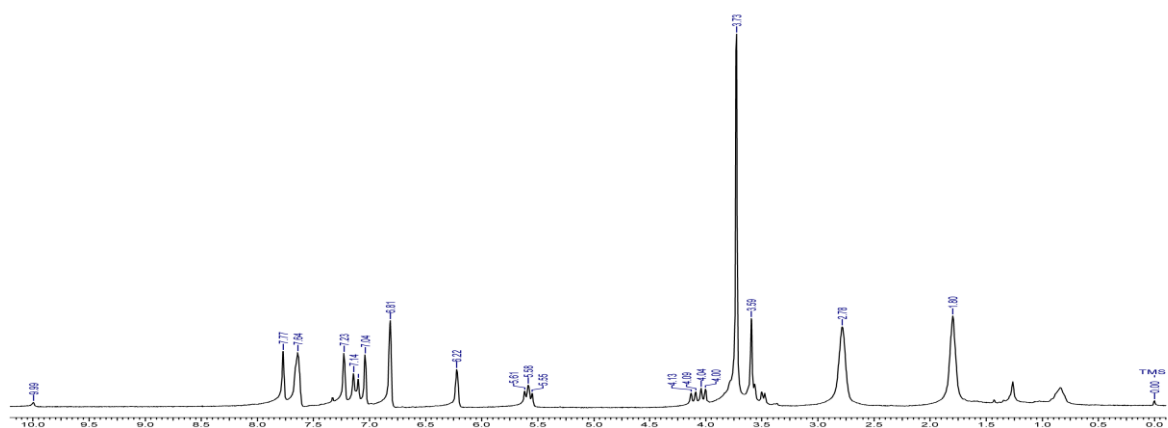
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-(2,4-diizopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]butanamida (**24b**).



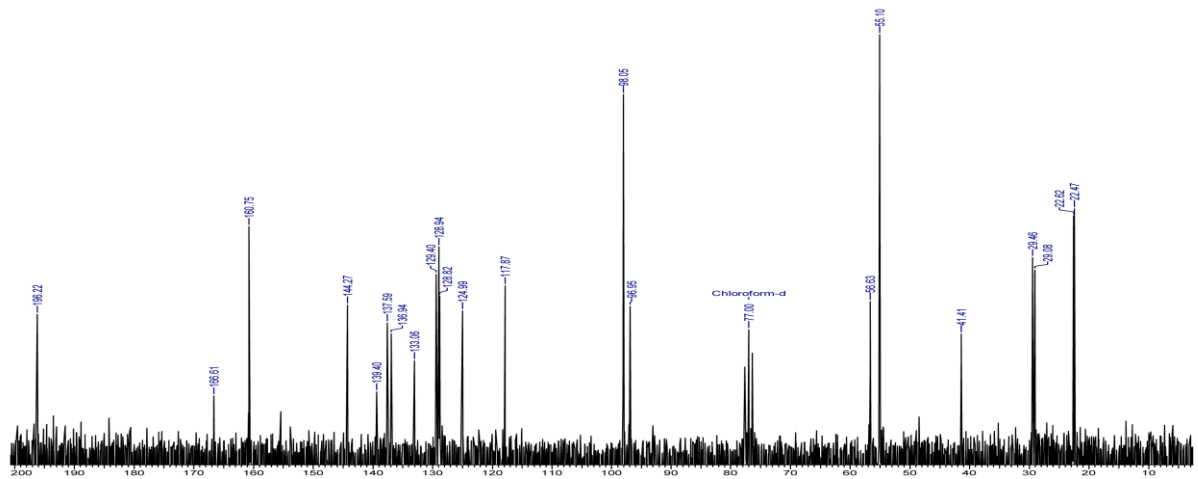
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(3,5-dimetoksisfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)-4-(5,6,7,8-tetrahdronaftalenil)butanamida (**25b**).



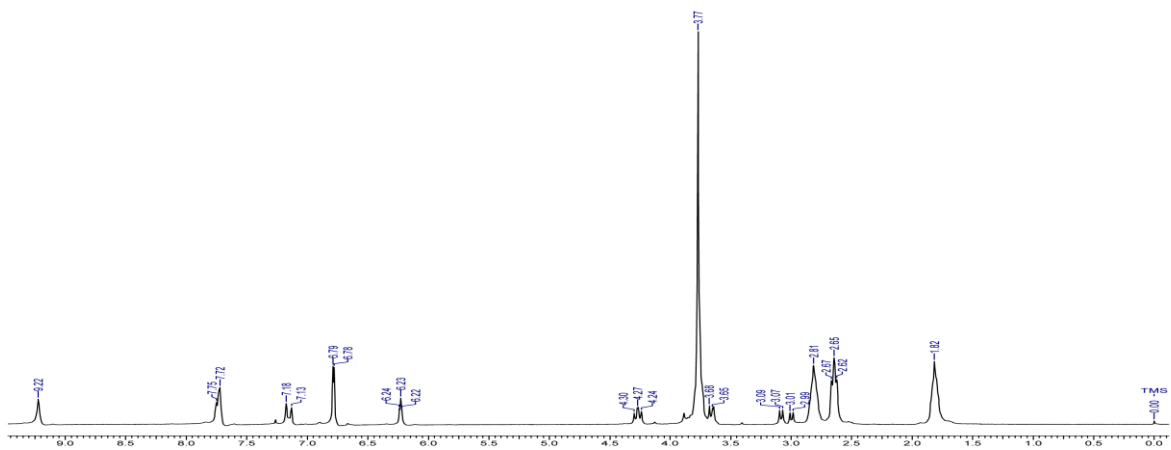
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(3,5-dimetoksisfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)-4-(5,6,7,8-tetrahdronaftalenil)butanamida (**25b**).



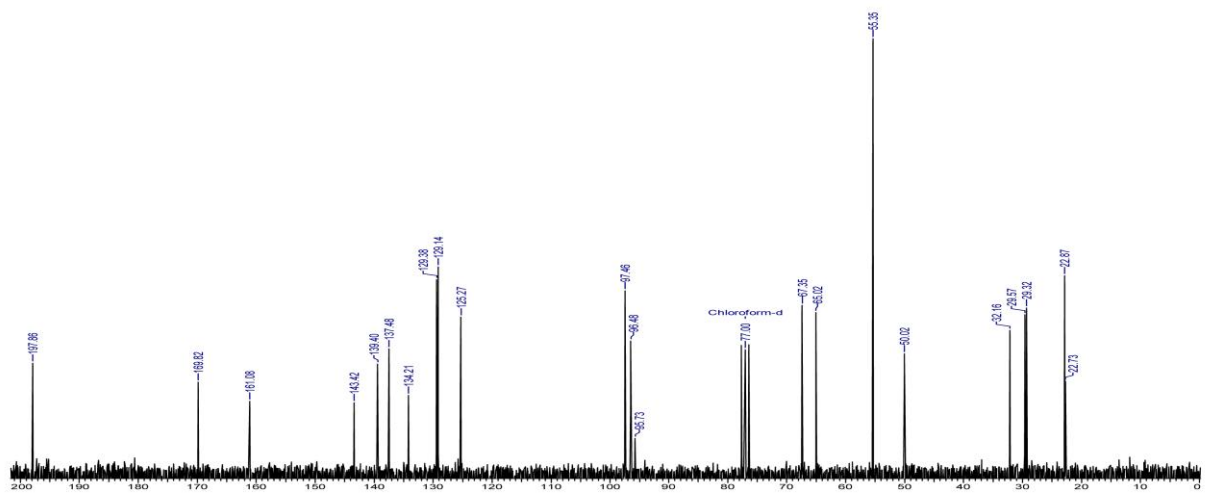
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(3,5-dimetoksisfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)-4-(5,6,7,8-tetrahdronaftalenil)butanamida (**26b**).



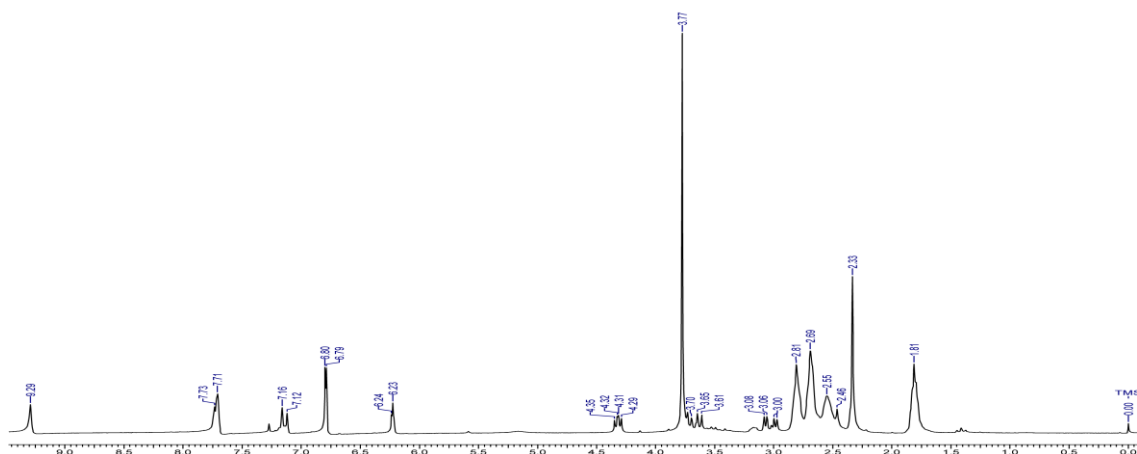
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**26b**).



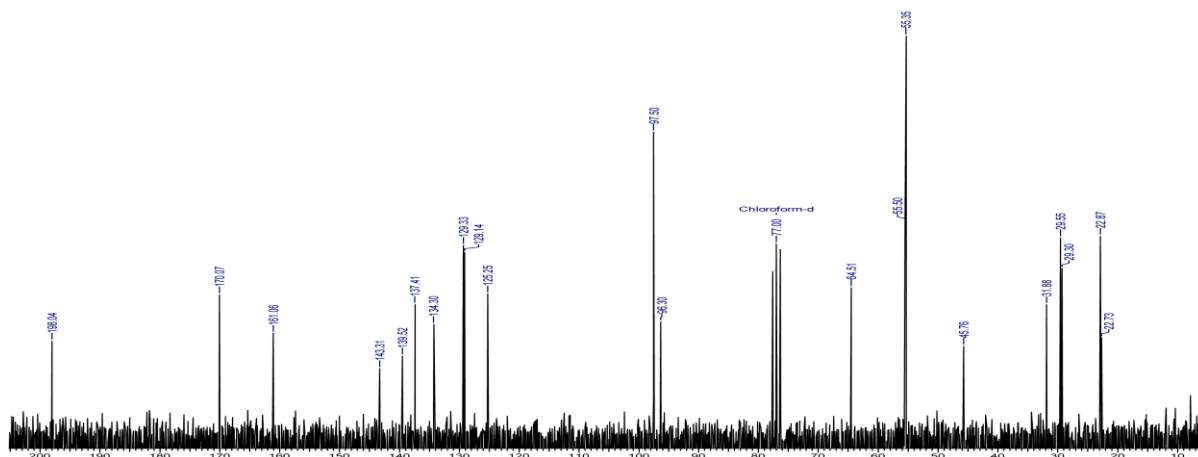
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**27b**).



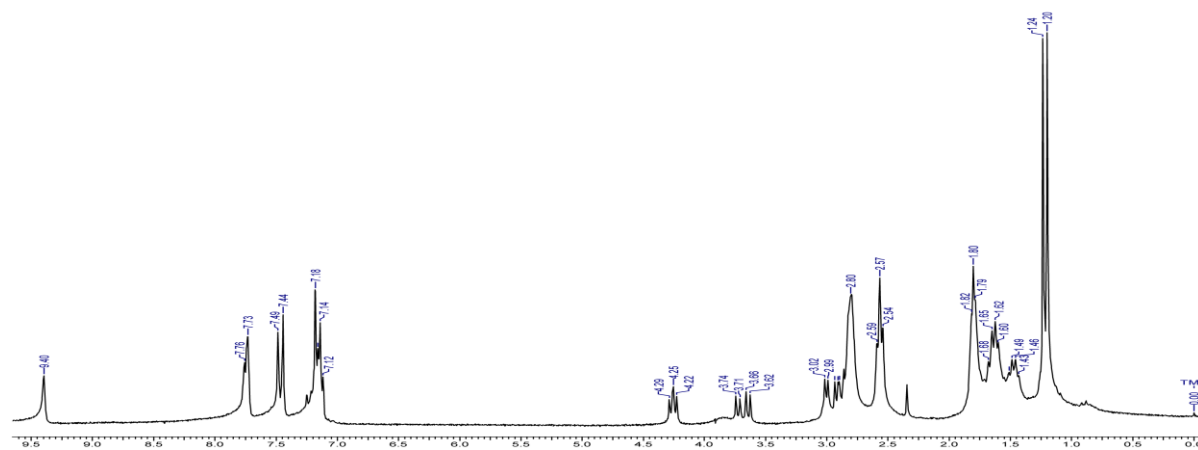
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**27b**).



$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-4-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalenil)butanamida (**28b**).

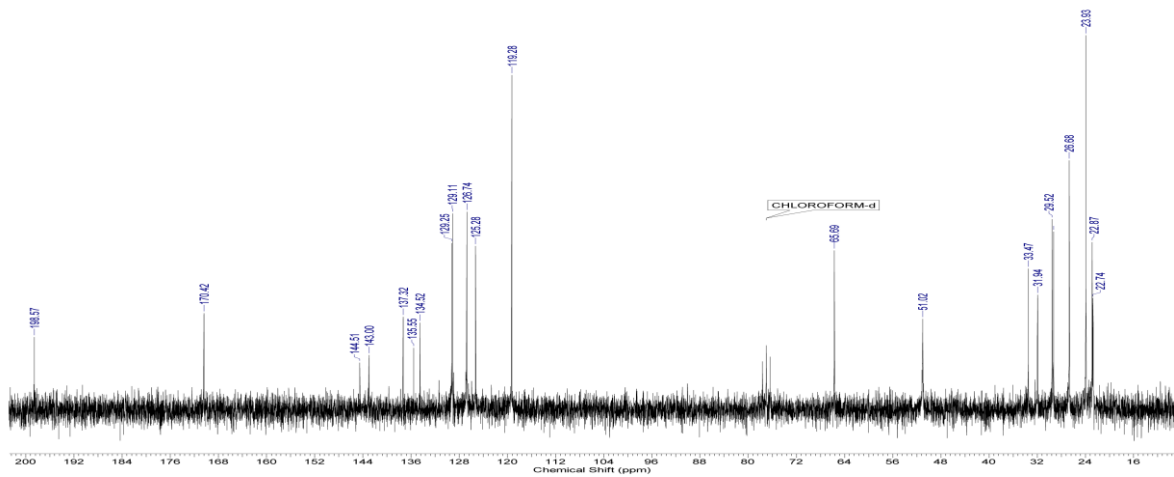


$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(3,5-dimetoksifenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-4-(5,6,7,8-tetrahidro-naftalenil)butanamida (**28b**).

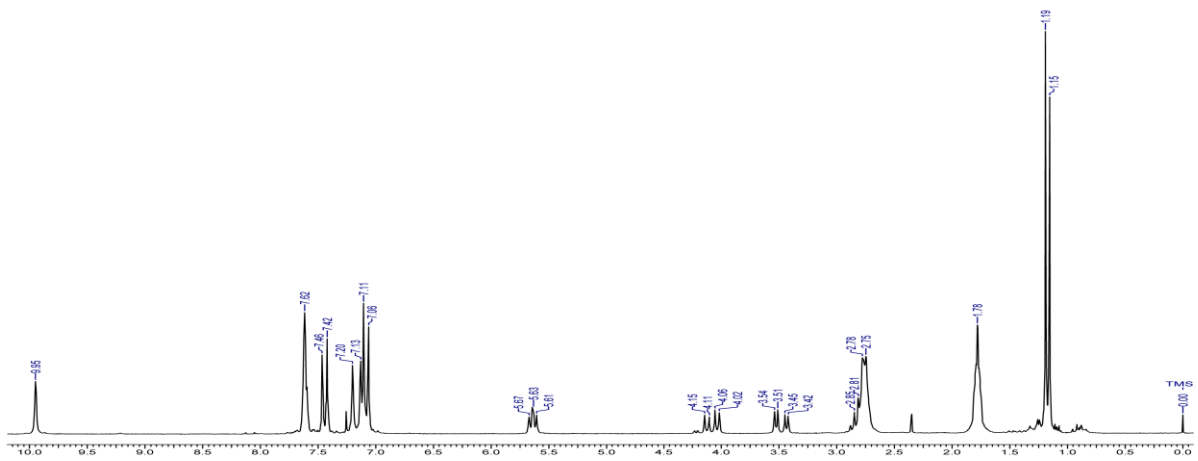


$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**29b**).

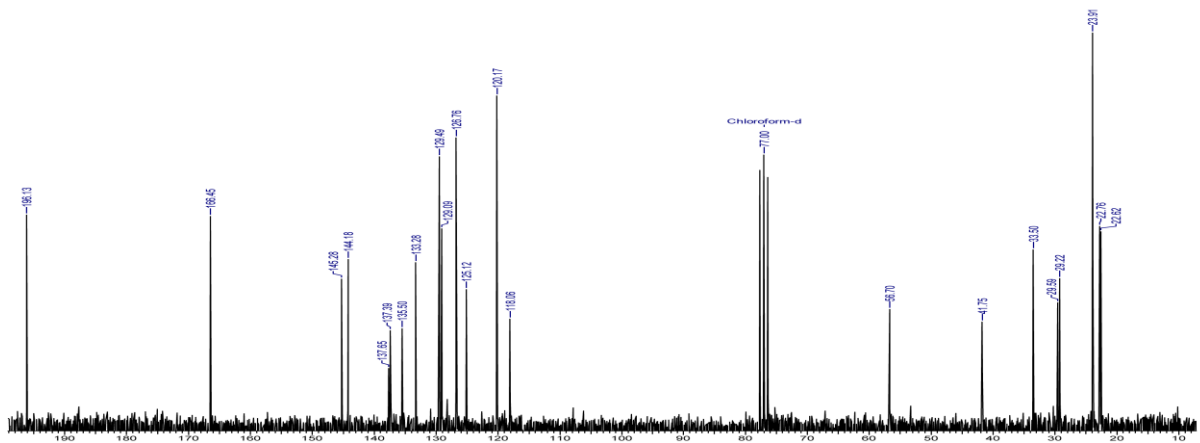




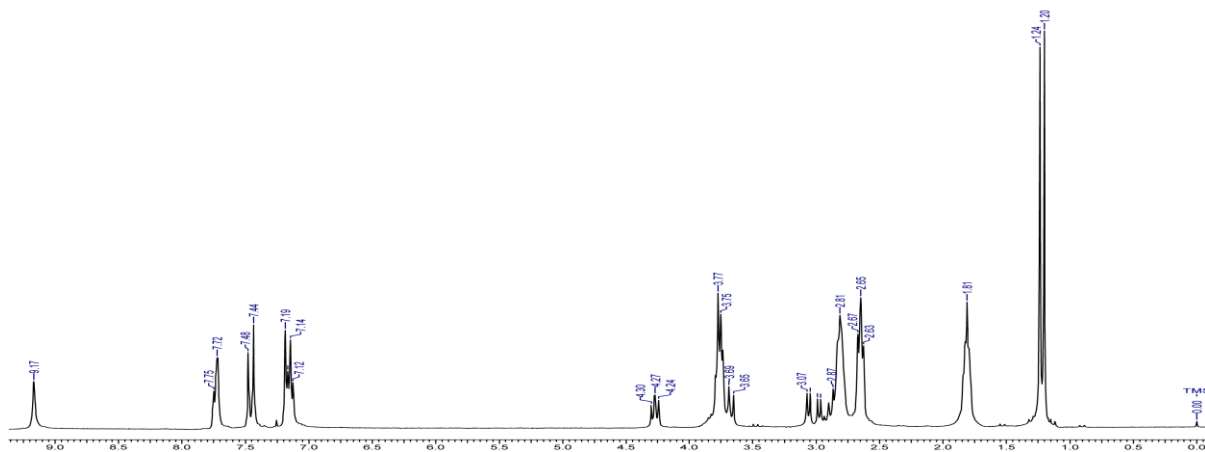
$^{13}\text{C}$  NMR spektr *N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-piperidinil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**29b**).



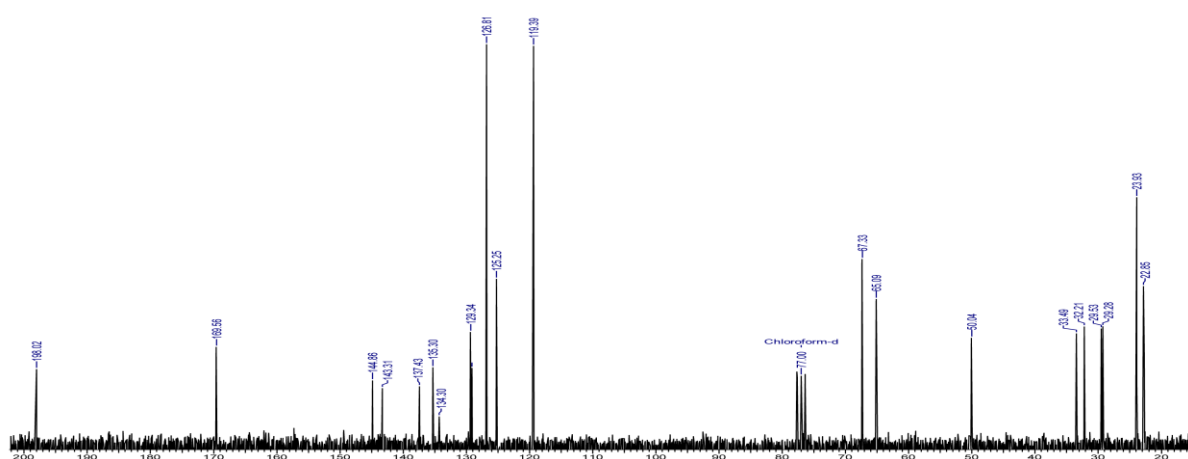
$^1\text{H}$  NMR spektr *N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**30b**).



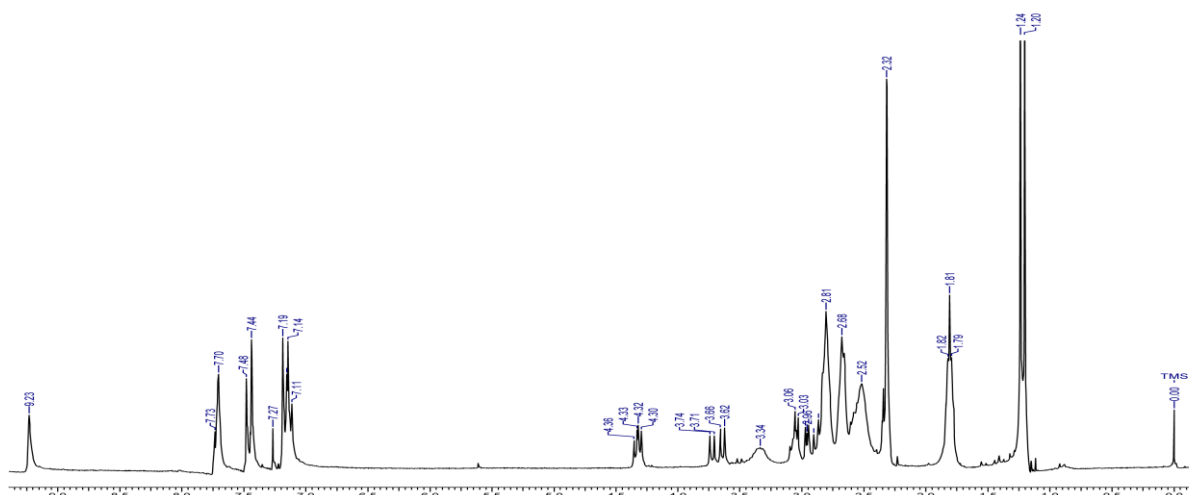
$^{13}\text{C}$  NMR spektr *N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(1-imidazolil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**30b**).



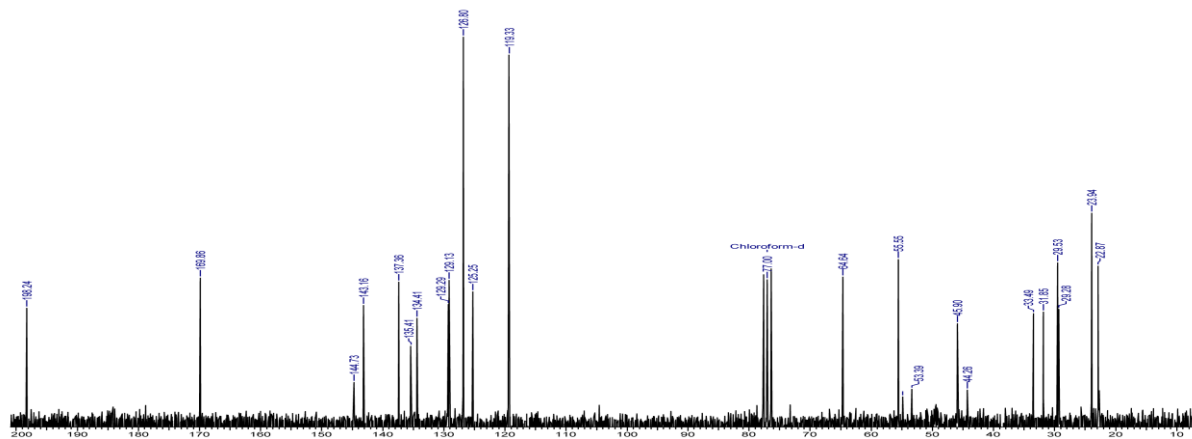
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**31b**).



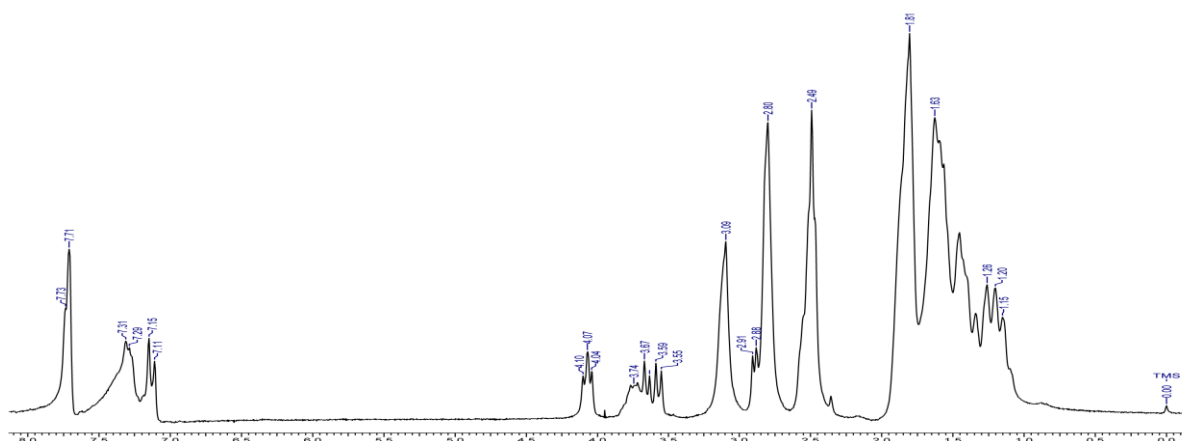
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-(4-morfolinil)-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**31b**).



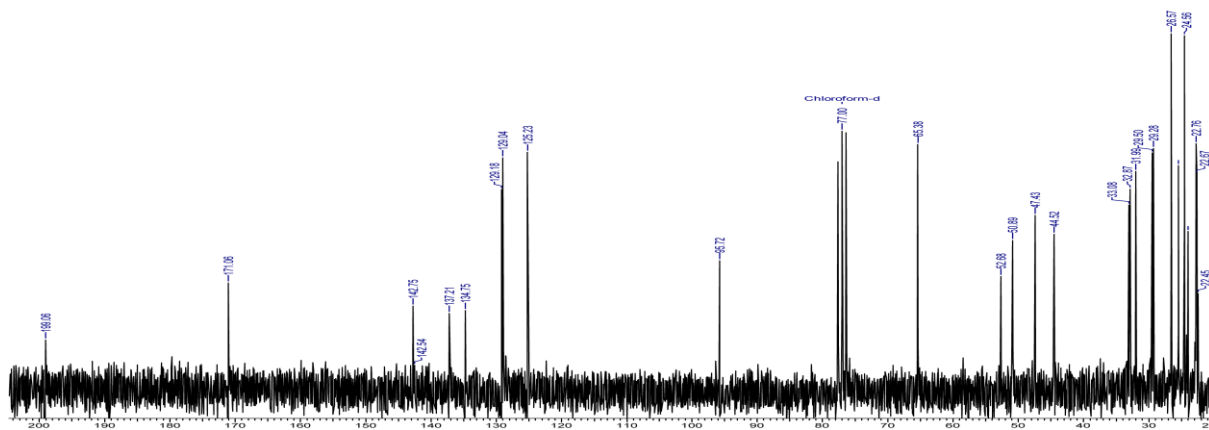
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**32b**).



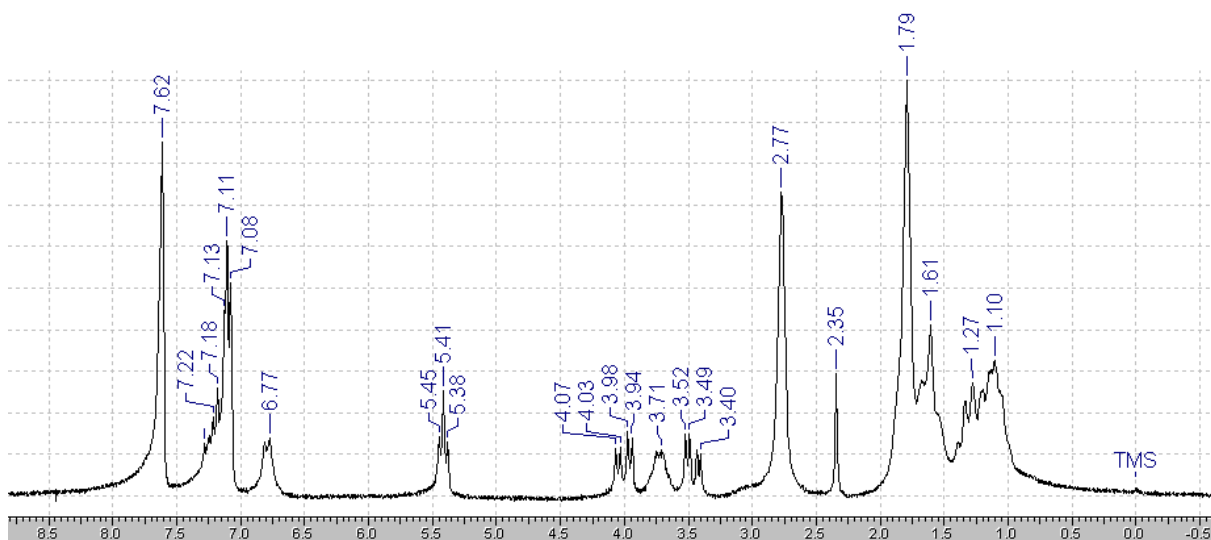
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-(4-izopropilfenil)-4-okso-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**32b**).



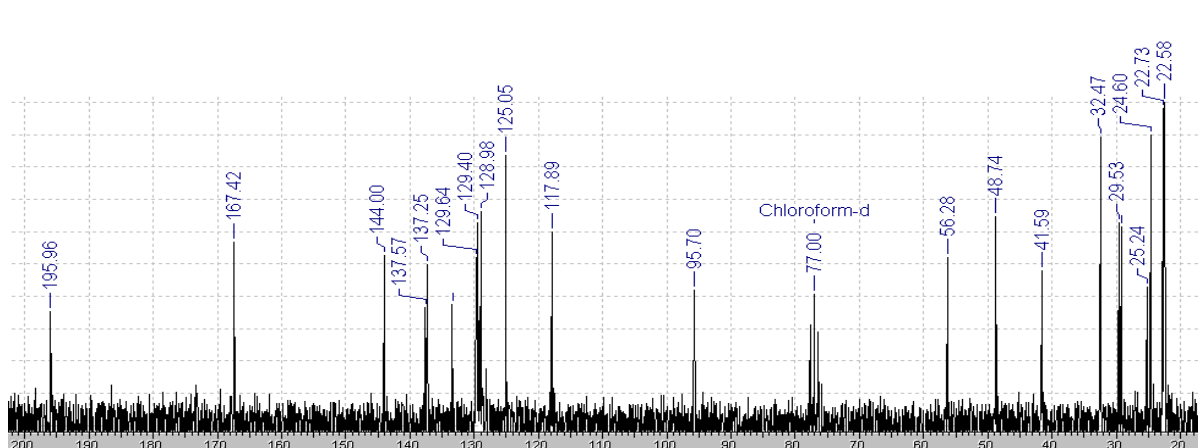
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-okso-2-(*R,S*)-1-piperidinil-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**33b**).



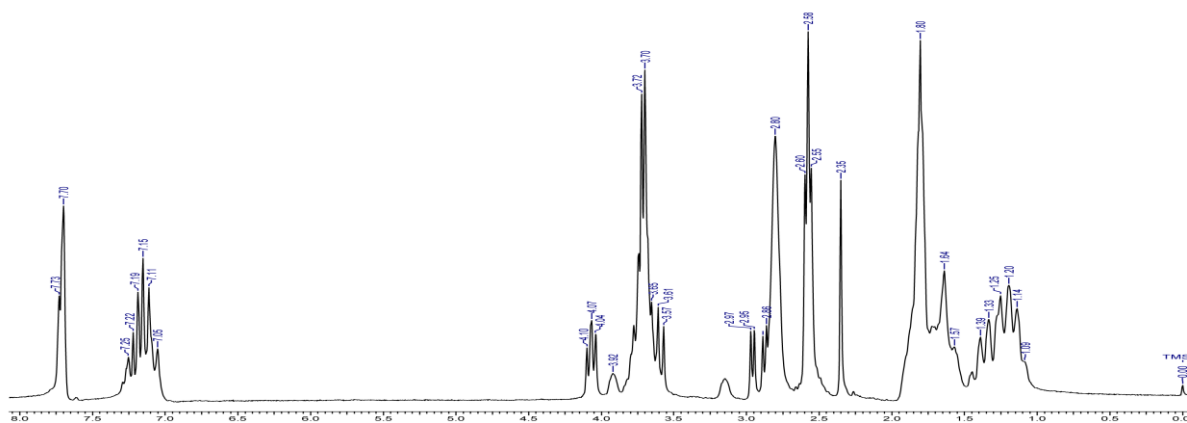
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-okso-2-(*R,S*)-1-piperidinil-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**33b**).



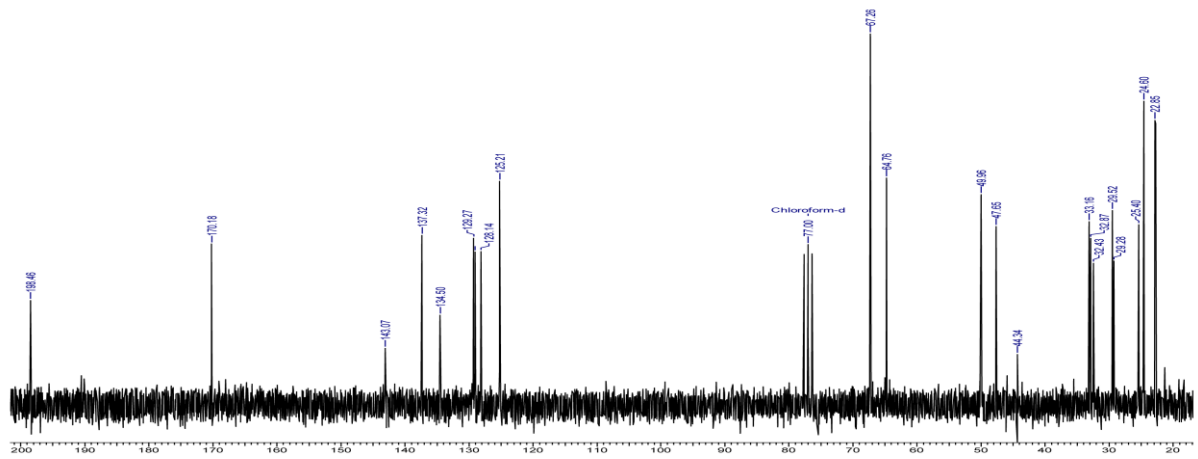
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-okso-2-(*R,S*)-imidazol-1-il-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanida, (**34b**).



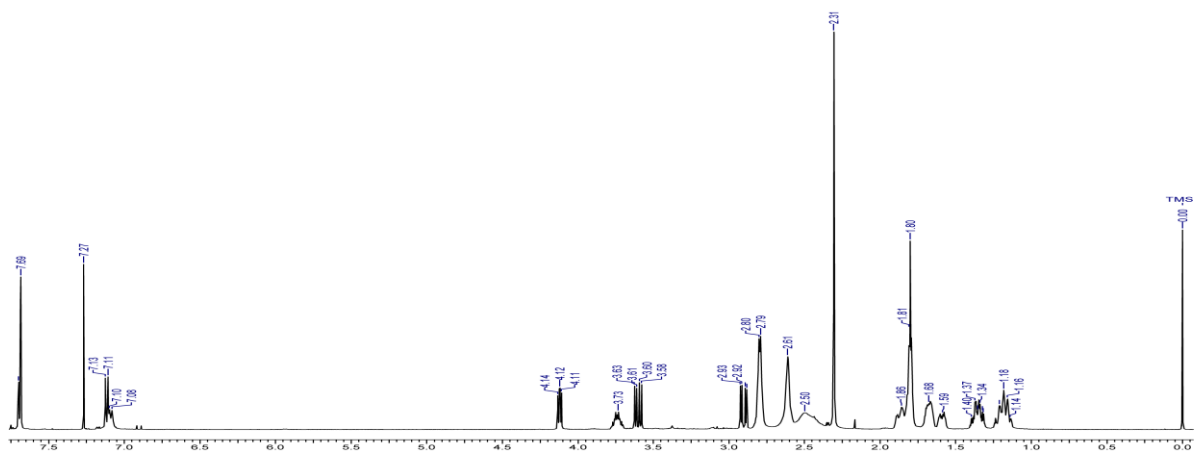
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-4-okso-2-(*R,S*)-imidazol-1-il-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanida, (**34b**).



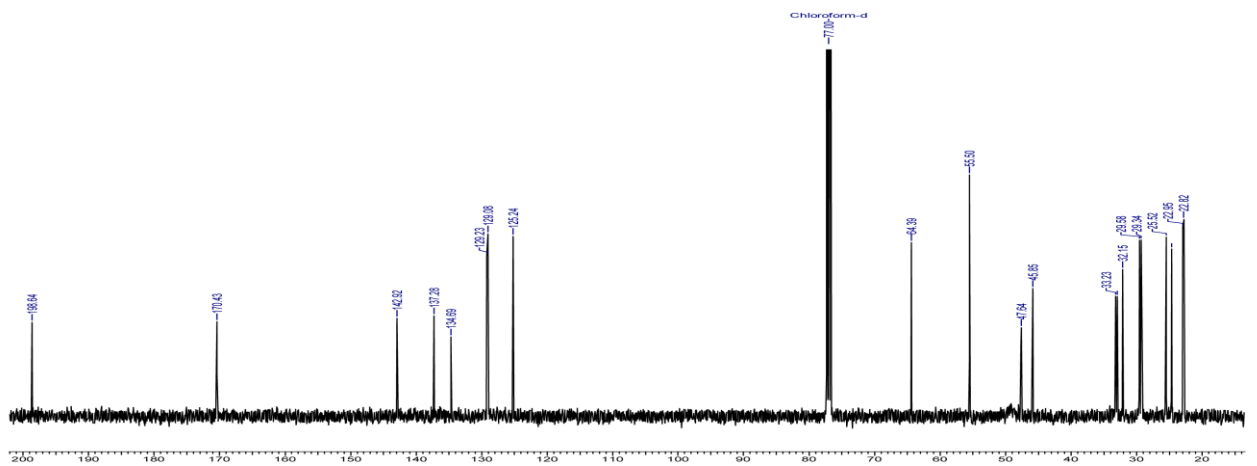
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-2-(*R,S*)-4-morfolinil-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanida (**35b**).



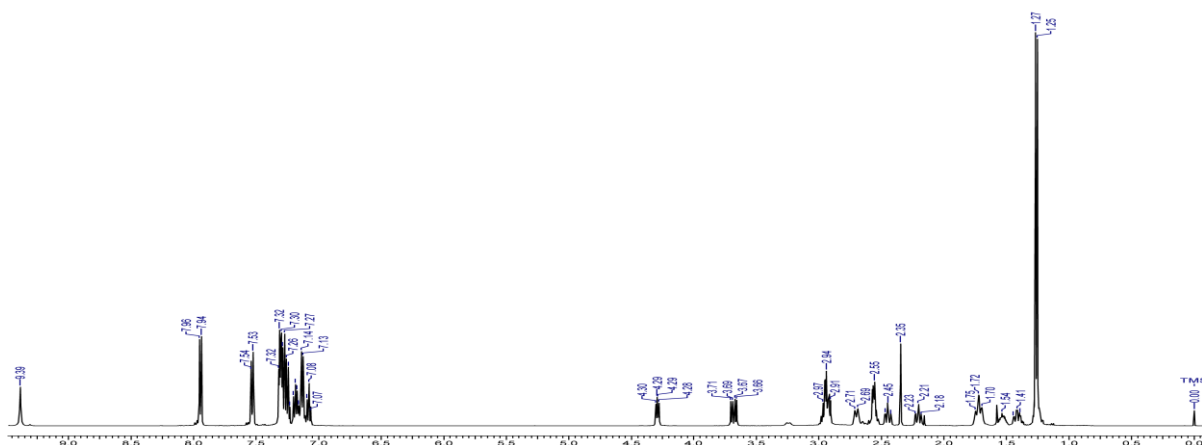
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-2-(*R,S*)-4-morfolinil-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**35b**).



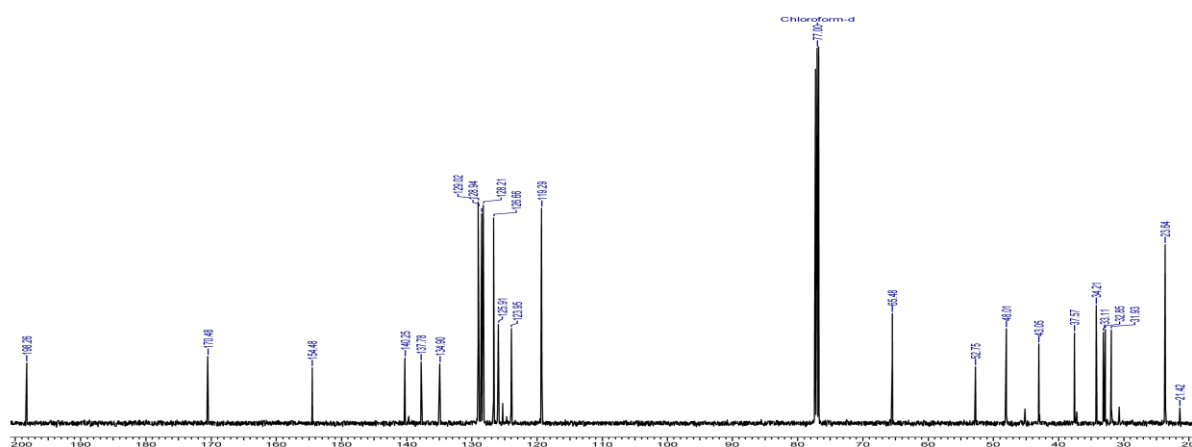
$^1\text{H}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**36b**).



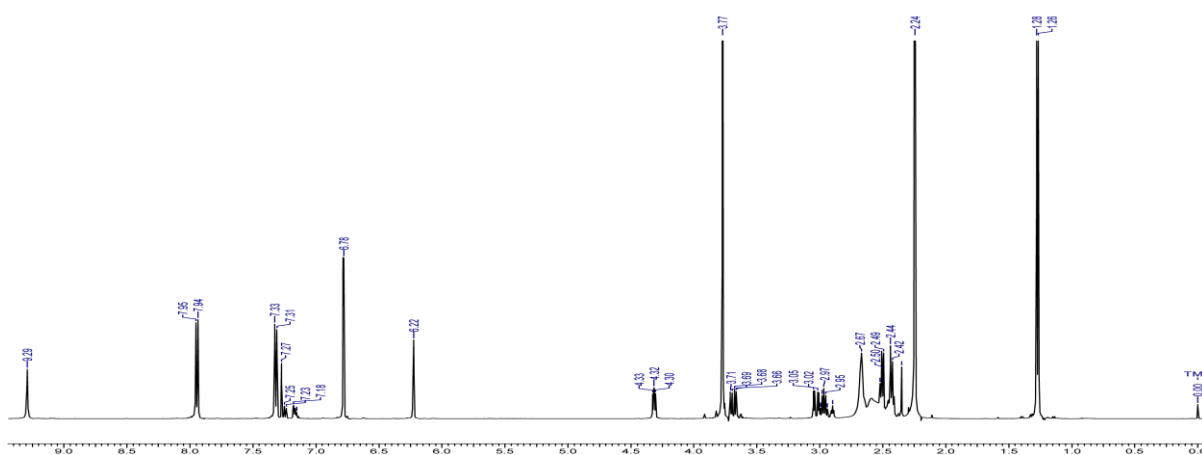
$^{13}\text{C}$  NMR spektar *N*-cikloheksil-2-(*R,S*)-[1-(4-metilpiperazinil)]-4-okso-4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalenil)butanamida (**36b**).



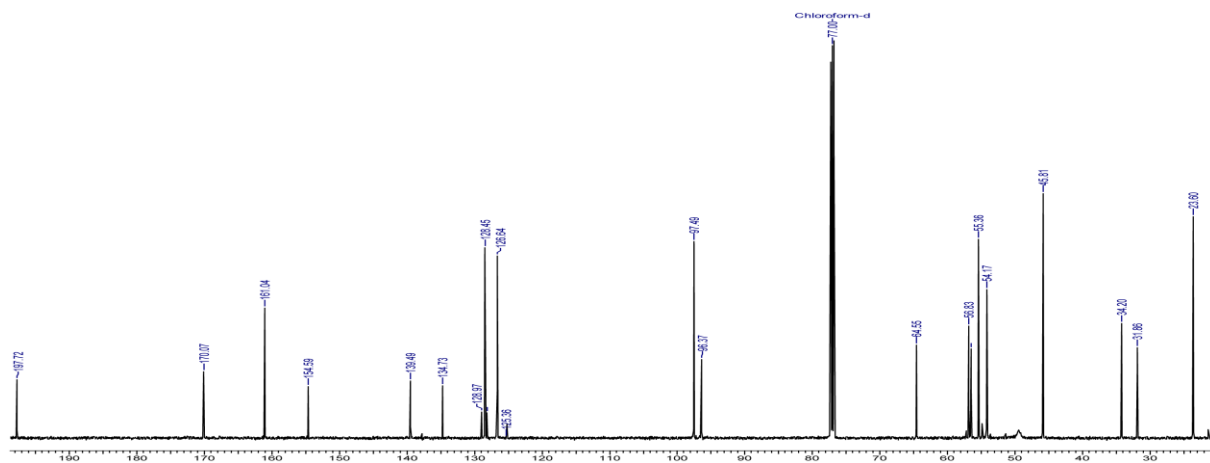
$^1\text{H}$  NMR spektr 2-(*R,S*)-(4-benzilpiperidinil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-*N*-fenilbutanamida (**37b**).



$^{13}\text{C}$  NMR spektr 2-(*R,S*)-(4-benzilpiperidinil)-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-*N*-fenilbutanamida (**37b**).



$^1\text{H}$  NMR spektr *N*-(3,5-dimetoksifenil)-2-(*R,S*)-[4-(2-dimetilaminoetil)-1-piperazinil]-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-butanamida (**38b**).



$^{13}\text{C}$  NMR spektar  $N$ -(3,5-dimetoksifenil)-2-( $R,S$ )-[4-(2-dimetilaminoetil)-1-piperazinil]-4-(4-izopropilfenil)-4-okso-butanamida (**38b**).

**Prilog 3.** (a) Ekspresija važnih varijabli modela zasnovanog na OMEGA konformacijama

Br. Jed.	var147	var158	var268	var455	var477	var745	var768	var849	var876
1c	-	-	-	-	-	+	-	+	-
2c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
3c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
4c	-	-	-	+	-	+	-	+	-
5c	-	-	-	+	-	-	-	+	+
6c	-	-	-	+	-	+	-	+	+
7c	-	-	-	+	-	+	-	+	+
8c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
9c	+	-	-	+	-	+	+	+	+
10c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11c	-	-	-	+	-	-	-	+	+
12c	-	-	-	-	-	+	-	+	-
13c	-	-	+	+	-	+	-	+	+
14c	-	-	-	+	-	+	-	+	+
15c	-	-	-	+	-	+	-	+	-
16c	-	-	-	-	-	+	-	+	-
17c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
18c	-	-	-	+	-	+	-	+	-
19c	-	-	+	+	-	+	+	+	+
20c	+	-	-	+	-	+	+	+	+
21c	-	-	+	+	-	+	+	+	+
22c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
23c	+	-	-	+	-	+	+	+	+
24c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
25c	-	-	+	+	-	+	+	+	+
26c	-	-	+	+	-	+	+	+	+
27c	-	-	+	+	-	+	+	+	+
28c	+	-	-	+	-	+	+	+	+
29c	-	-	-	-	-	+	-	+	-
30c	-	-	-	+	-	+	-	+	-
31c	-	-	-	-	-	+	-	+	-
32c	-	-	-	+	-	+	-	+	+
33c	-	-	-	-	-	+	+	+	-
34c	-	-	-	-	-	+	-	+	-
35c	-	-	-	-	-	+	-	+	-
36c	-	-	-	+	-	+	-	+	+
37c	-	-	-	+	-	+	-	+	-
38c	-	-	-	-	-	+	-	+	-
39c	-	-	-	+	-	+	-	+	+
40c	-	-	+	-	-	-	-	-	-
41c	-	-	-	+	-	+	-	+	-
42c	-	-	-	+	-	+	-	-	+
43c	-	-	+	-	-	-	-	-	-
44c	-	-	-	+	-	+	-	+	-
45c	-	-	-	+	-	+	-	-	+
46c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47c	-	-	+	-	-	-	-	-	-
48c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49c	-	-	+	-	-	-	-	-	-
50c	-	-	+	+	-	+	-	-	+



51c	-	-	+	-	-	-	-	-	-
52c	-	-	+	-	-	-	-	-	-
53c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55c	-	-	-	+	-	+	-	+	+
56c	-	-	+	-	-	-	-	-	-
57c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59c	-	-	+	-	-	-	-	-	-
60c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62c	-	-	-	-	-	+	-	+	-
63c	-	-	-	+	-	+	-	+	+
64c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68c	+	-	-	+	-	+	-	+	-
69c	-	-	-	+	-	+	-	+	+
70c	+	-	-	+	-	+	-	+	+
71c	+	-	-	+	-	+	-	+	+
72c	+	+	-	+	+	+	+	+	+
73c	-	+	-	+	+	+	+	+	+
74c	+	+	-	+	+	+	-	+	+
75c	+	+	-	+	+	+	-	+	+
76c	+	+	-	+	+	+	-	+	+
77c	-	-	-	+	-	+	-	+	-
78c	+	+	-	+	+	-	-	+	+
79c	-	+	-	+	+	+	-	+	+
80c	-	+	-	+	+	+	+	+	+
81c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
82c	+	-	-	+	-	+	+	+	+
83c	-	-	-	+	-	+	-	+	-
84c	+	-	-	+	-	+	-	+	+
85c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
86c	-	-	-	+	-	+	-	+	-
87c	+	-	-	+	-	+	+	+	+
88c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
89c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
90c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
91c	+	-	-	+	-	+	-	+	-
92c	-	-	-	+	-	+	+	+	-
93c	+	+	-	+	-	+	+	+	+
94c	-	-	-	+	-	+	+	+	+
95c	+	+	-	+	+	+	+	+	+
96c	-	+	-	+	+	+	+	+	+
97c	-	-	-	+	-	-	-	+	+
98c	+	-	-	+	-	+	-	+	+
99c	+	-	-	+	-	+	-	+	+
100c	+	-	-	+	-	+	-	+	+
101c	+	+	-	+	+	+	+	+	+
102c	+	+	-	+	+	+	+	+	+
103c	+	-	-	+	-	+	-	+	+

104c	+	-	-	+	-	+	-	+	+
105c	+	+	-	+	+	+	-	+	+
106c	+	+	-	+	+	+	-	+	+
107c	+	-	-	+	-	+	-	+	+
108c	+	-	-	+	-	+	-	+	+
109c	+	+	-	+	+	+	-	+	+
110c	-	+	-	+	+	+	-	+	+

(b) Ekspresija važnih varijabli modela zasnovanog na ROCS konformacijama

Br. Jed.	var128	var144	var161	var278	var475	var496	var805	var888	var930
1c	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2c	+	-	-	-	+	-	-	+	-
3c	+	-	-	-	+	-	+	+	-
4c	+	-	-	-	+	-	-	+	-
5c	-	-	-	-	+	-	-	+	-
6c	-	-	-	-	+	-	-	+	-
7c	-	-	-	-	+	-	-	+	-
8c	-	-	-	-	+	-	+	+	-
9c	-	+	-	-	+	+	-	+	+
10c	-	-	-	-	+	-	-	+	-
11c	-	-	-	-	+	-	-	+	-
12c	+	-	-	-	+	-	+	+	-
13c	+	-	-	+	+	-	+	+	-
14c	+	-	-	+	+	-	+	+	-
15c	+	-	-	+	+	-	+	+	-
16c	+	-	-	+	+	-	-	+	-
17c	-	-	-	-	+	-	+	+	-
18c	+	-	-	+	+	-	+	+	-
19c	-	-	-	+	+	-	+	+	-
20c	-	-	-	-	+	-	+	+	-
21c	+	-	-	+	+	-	+	+	-
22c	-	+	-	+	+	-	+	+	-
23c	+	+	-	-	+	-	+	+	-
24c	+	-	-	+	+	-	-	+	-
25c	-	-	-	+	+	-	-	+	-
26c	+	-	-	+	+	-	-	+	-
27c	+	-	-	+	+	-	+	+	-
28c	+	-	-	+	+	-	-	+	-
29c	-	+	-	-	+	-	+	+	-
30c	+	-	-	-	+	-	+	+	-
31c	-	-	-	-	+	-	+	+	-
32c	-	-	-	+	+	-	+	+	-
33c	-	-	-	-	-	-	+	+	-
34c	+	-	-	-	-	-	+	+	-
35c	+	-	-	-	+	-	-	+	-
36c	+	-	-	-	+	-	-	+	-
37c	-	+	-	-	+	-	-	+	-
38c	-	+	-	-	+	-	-	+	-
39c	+	-	-	-	+	-	-	+	-
40c	-	-	-	-	-	-	-	-	-

41c	-	-	-	+	+	-	-	+	-
42c	-	-	-	-	+	-	-	+	-
43c	-	-	-	-	+	-	-	+	-
44c	-	-	-	-	+	+	+	+	-
45c	-	-	-	+	-	-	-	-	-
46c	-	-	-	+	-	-	-	-	-
47c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48c	-	-	-	+	-	-	-	-	-
49c	-	-	-	+	-	-	-	-	-
50c	-	-	-	+	-	-	-	-	-
51c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53c	-	-	-	+	-	-	-	-	-
54c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55c	-	-	-	-	+	-	-	+	-
56c	-	-	-	+	-	-	-	-	-
57c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60c	-	-	-	-	+	-	-	+	-
61c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62c	-	-	-	-	-	-	-	+	-
63c	-	-	-	-	+	-	-	+	-
64c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65c	-	-	-	-	-	-	-	+	-
66c	-	-	-	-	-	-	-	+	-
67c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68c	+	+	-	-	+	-	-	+	+
69c	+	-	-	-	+	+	+	+	+
70c	+	-	+	-	+	+	+	+	+
71c	+	+	-	-	+	+	+	+	+
72c	+	+	+	-	+	+	+	+	+
73c	+	+	+	-	+	+	+	+	+
74c	+	+	+	-	+	+	+	+	+
75c	+	+	+	-	+	+	-	+	+
76c	+	+	+	-	+	+	-	+	+
77c	+	-	+	-	+	+	-	+	+
78c	+	+	+	-	+	+	-	+	+
79c	-	+	+	-	+	+	+	+	+
80c	-	+	-	-	+	+	+	+	-
81c	+	+	-	-	+	+	+	+	+
82c	+	+	-	-	+	+	+	+	-
83c	-	+	-	-	+	+	+	+	+
84c	+	-	-	-	+	+	-	+	+
85c	+	+	-	-	+	+	+	+	-
86c	+	+	-	-	+	+	+	+	+
87c	+	-	-	-	+	+	+	+	-
88c	+	-	-	-	+	+	+	+	+
89c	+	+	-	-	+	+	+	+	+
90c	+	+	-	-	+	+	+	+	+
91c	+	+	-	-	+	+	+	+	+
92c	-	-	-	+	+	+	+	+	+

93c	+	+	+	-	+	+	+	+	+
94c	+	-	-	-	+	+	+	+	+
95c	-	-	-	-	+	+	+	+	+
96c	-	-	+	-	+	+	+	+	+
97c	+	+	-	-	+	+	-	+	+
98c	+	-	-	-	+	+	-	+	+
99c	+	+	-	-	+	+	-	+	+
100c	-	-	+	-	+	+	-	+	+
101c	+	+	+	-	+	+	+	+	+
102c	+	-	+	-	+	+	+	+	+
103c	+	+	+	-	+	-	+	+	+
104c	-	-	+	-	+	+	+	+	+
105c	+	-	+	-	+	-	+	+	+
106c	+	-	+	-	+	+	-	+	+
107c	+	-	-	-	+	+	-	+	+
108c	+	+	+	-	+	+	+	+	+
109c	+	-	+	-	+	+	+	+	+
110c	-	+	+	-	+	+	+	+	+

(c) Ekspresija važnih varijabli modela zasnovanog na VINA konformacijama

Br. Jed.	var66	var123	var147	var241	var427	var435	var444	var696	var723	var832
1c	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2c	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
3c	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
4c	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
5c	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
6c	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
7c	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
8c	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
9c	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
10c	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
11c	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
12c	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
13c	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
14c	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
15c	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
16c	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
17c	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
18c	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
19c	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
20c	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
21c	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
22c	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
23c	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
24c	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
25c	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
26c	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
27c	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
28c	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-

29c	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
30c	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
31c	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
32c	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
33c	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
34c	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
35c	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
36c	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
37c	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
38c	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
39c	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
40c	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
41c	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
42c	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
43c	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
44c	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
45c	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
46c	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
47c	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
48c	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
49c	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
50c	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
51c	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
52c	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
53c	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
54c	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
55c	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
56c	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
57c	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
58c	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
59c	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
60c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62c	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
63c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65c	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
66c	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
67c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68c	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
69c	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
70c	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
71c	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
72c	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+
73c	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
74c	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
75c	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
76c	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
77c	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
78c	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
79c	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
80c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+

81c	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
82c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
83c	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
84c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
85c	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
86c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
87c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
88c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
89c	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
90c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
91c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
92c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
93c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
94c	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
95c	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
96c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
97c	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
98c	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
99c	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
100c	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
101c	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
102c	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
103c	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
104c	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
105c	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
106c	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
107c	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
108c	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
109c	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
110c	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+

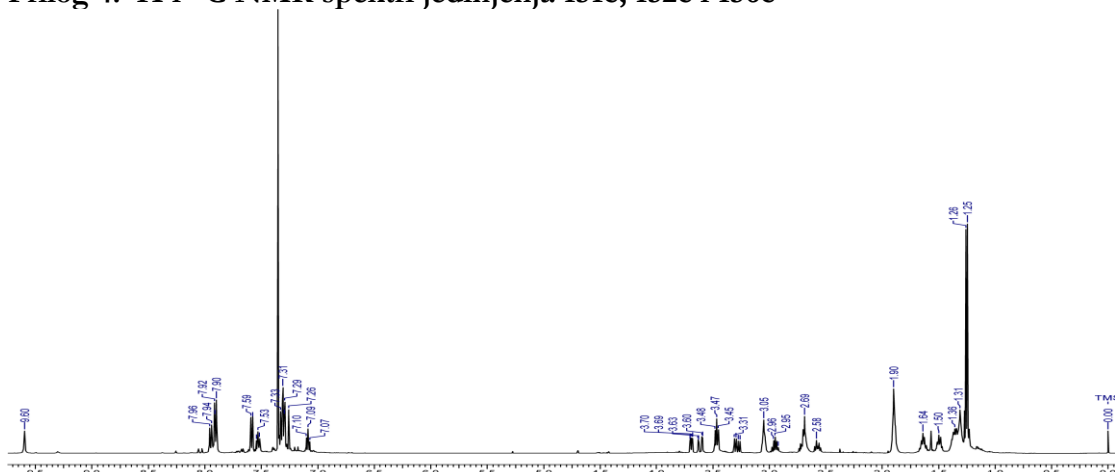
(d). Numeričke vrednosti deskriptora korišćenih za izvođenje 2D QSAR modela i predviđene pIC<sub>50</sub> vrednosti.

Br. Jed.	nR10	N-070	Predviđene pIC <sub>50</sub>		Br. Jed.	nR10	N-070	Predviđene pIC <sub>50</sub>	
			Jed. 1	Jed. 2				Jed. 1	Jed. 2
1c	0	1	6.559	6.380	76c	2	1	7.991	7.686
2c	0	1	6.559	6.380	77c	2	1	7.991	7.686
3c	0	1	6.559	6.380	78c	2	1	7.991	7.686
4c	0	1	6.559	6.380	79c	2	1	7.991	7.686
5c	0	2	7.672	7.025	80c	2	1	7.991	7.686
6c	0	1	6.559	6.380	81c	2	1	7.991	7.686
7c	1	0	6.162	6.389	82c	2	1	7.991	7.686
8c	1	0	6.162	6.389	83c	2	1	7.991	7.686
9c	0	2	7.672	7.025	84c	2	1	7.991	7.686
10c	1	0	6.162	6.389	85c	2	1	7.991	7.686
11c	0	2	7.672	7.025	86c	2	1	7.991	7.686
12c	2	0	6.878	7.042	87c	2	1	7.991	7.686
13c	2	0	6.878	7.042	88c	2	1	7.991	7.686
14c	2	0	6.878	7.042	89c	2	1	7.991	7.686
15c	2	0	6.878	7.042	90c	2	1	7.991	7.686
16c	2	0	6.878	7.042	91c	2	1	7.991	7.686
17c	2	0	6.878	7.042	92c	2	1	7.991	7.686
18c	2	0	6.878	7.042	93c	2	1	7.991	7.686
19c	2	0	6.878	7.042	94c	2	1	7.991	7.686
20c	2	0	6.878	7.042	95c	2	1	7.991	7.686
21c	2	0	6.878	7.042	96c	2	1	7.991	7.686
22c	2	0	6.878	7.042	97c	2	1	7.991	7.686
23c	2	0	6.878	7.042	98c	2	1	7.991	7.686
24c	2	0	6.878	7.042	99c	2	1	7.991	7.686
25c	2	0	6.878	7.042	100c	2	1	7.991	7.686
26c	2	0	6.878	7.042	101c	2	1	7.991	7.686
27c	2	0	6.878	7.042	102c	2	1	7.991	7.686
28c	2	0	6.878	7.042	103c	2	1	7.991	7.686
29c	2	0	6.878	7.042	104c	2	1	7.991	7.686
30c	2	0	6.878	7.042	105c	2	1	7.991	7.686
31c	2	0	6.878	7.042	106c	2	1	7.991	7.686
32c	2	0	6.878	7.042	107c	2	1	7.991	7.686
33c	1	0	6.162	6.389	108c	2	1	7.991	7.686
34c	1	0	6.162	6.389	109c	2	1	7.991	7.686
35c	1	0	6.162	6.389	110c	2	1	7.991	7.686
36c	1	0	6.162	6.389	111c	0	1	/	6.38
37c	1	0	6.162	6.389	112c	0	1	/	6.38
38c	1	0	6.162	6.389	113c	0	1	/	6.38
39c	1	1	7.275	7.033	114c	0	1	/	6.38
40c	0	0	5.446	5.736	115c	0	1	/	6.38
41c	0	0	5.446	5.736	116c	1	1	/	7.033
42c	0	0	5.446	5.736	117c	1	1	/	7.033
43c	0	0	5.446	5.736	118c	1	1	/	7.033
44c	0	0	5.446	5.736	120c	1	1	/	7.033
45c	0	0	5.446	5.736	120c	4	1	/	8.993
46c	0	0	5.446	5.736	121c	2	1	/	7.686
47c	0	0	5.446	5.736	122c	2	1	/	7.686
48c	0	0	5.446	5.736	123c	2	2	/	8.331
49c	0	0	5.446	5.736	124c	0	0	/	5.736

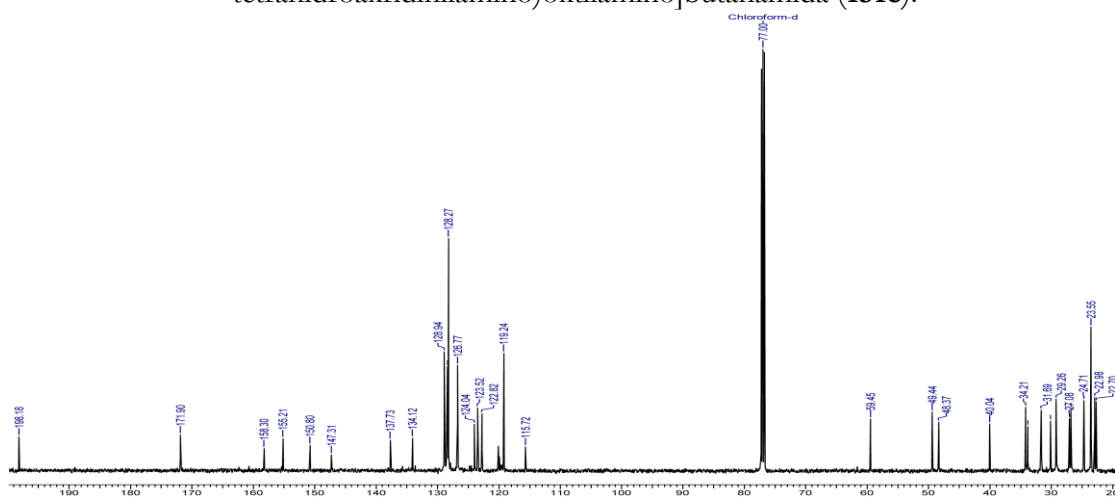
Br. Jed.	nR10	N-070	Predvidene pIC <sub>50</sub>		Br. Jed.	nR10	N-070	Predvidene pIC <sub>50</sub>	
			Jed. 1	Jed. 2				Jed. 1	Jed. 2
50c	0	0	5.446	5.736	125c	0	0	/	5.736
51c	0	0	5.446	5.736	126c	0	0	/	5.736
52c	0	0	5.446	5.736	127c	0	0	/	5.736
53c	2	0	6.878	7.042	128c	0	0	/	5.736
54c	0	0	5.446	5.736	129c	0	0	/	5.736
55c	0	0	5.446	5.736	130c	0	0	/	5.736
56c	0	0	5.446	5.736	131c	0	0	/	5.736
57c	0	0	5.446	5.736	132c	0	0	/	5.736
58c	0	0	5.446	5.736	133c	0	0	/	5.736
59c	0	0	5.446	5.736	134c	0	0	/	5.736
60c	1	0	6.162	6.389	135c	0	0	/	5.736
61c	1	0	6.162	6.389	136c	0	0	/	5.736
62c	0	0	5.446	5.736	137c	0	0	/	5.736
63c	0	0	5.446	5.736	138c	0	0	/	5.736
64c	0	0	5.446	5.736	139c	0	0	/	5.736
65c	0	0	5.446	5.736	140c	0	0	/	5.736
66c	0	0	5.446	5.736	141c	0	0	/	5.736
67c	0	0	5.446	5.736	142c	0	0	/	5.736
68c	2	1	7.991	7.686	143c	0	0	/	5.736
69c	2	1	7.991	7.686	144c	0	0	/	5.736
70c	2	1	7.991	7.686	145c	0	0	/	5.736
71c	2	1	7.991	7.686	146c	2	1	/	7.686
72c	2	1	7.991	7.686	147c	2	1	/	7.686
73c	2	1	7.991	7.686	148c	2	1	/	7.686
74c	2	1	7.991	7.686	149c	2	1	/	7.686
75c	2	1	7.991	7.686	150c	2	1	/	7.686



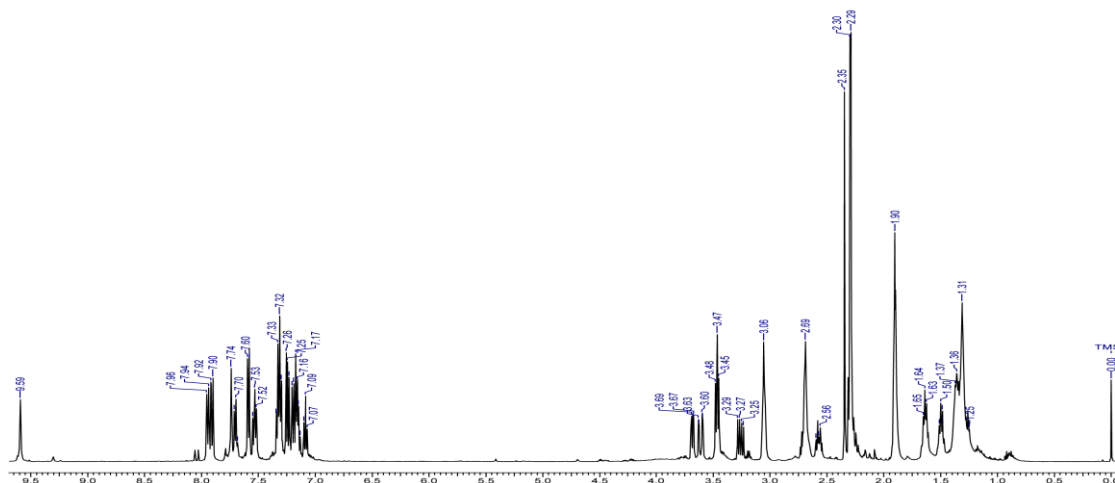
Prilog 4.  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja 151c, 152c i 156c



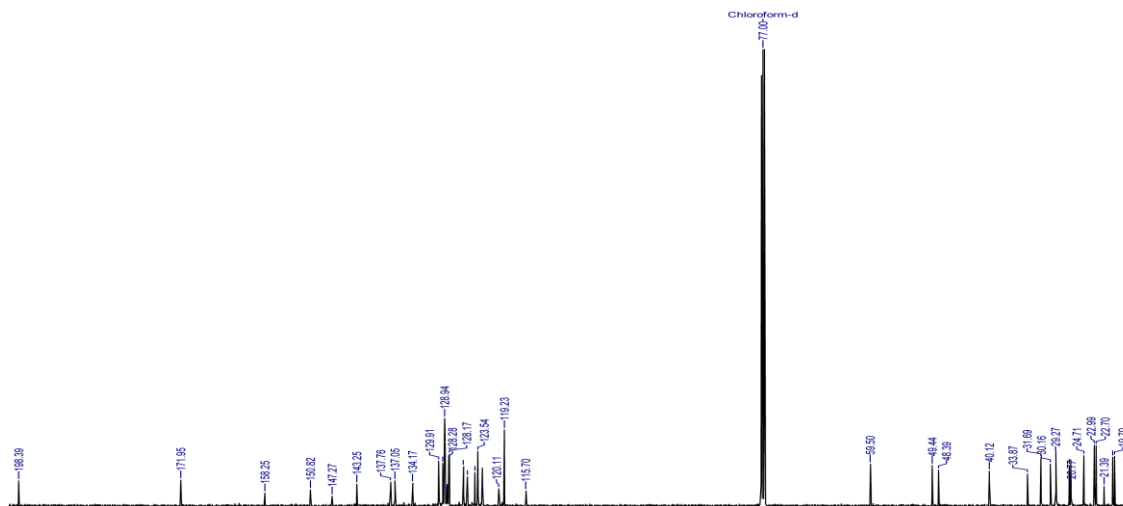
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(4-Izopropilfenil)-4-okso-*N*-fenil-2-[8-(1,2,3,4-tetrahidroakridinilamino)oktilamino]butanamida (**151c**).



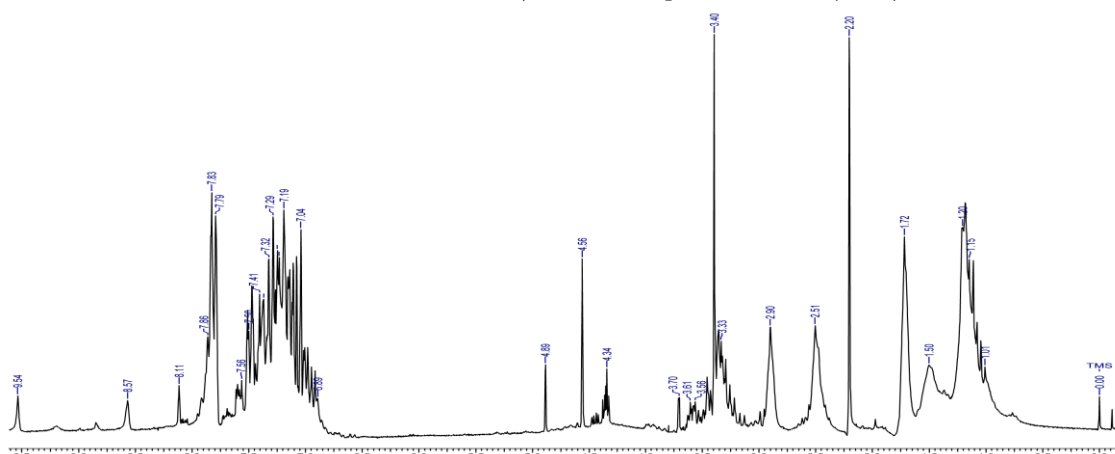
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(4-Izopropilfenil)-4-okso-*N*-fenil-2-[8-(1,2,3,4-tetrahidroakridinilamino)oktilamino]butanamida (**151c**).



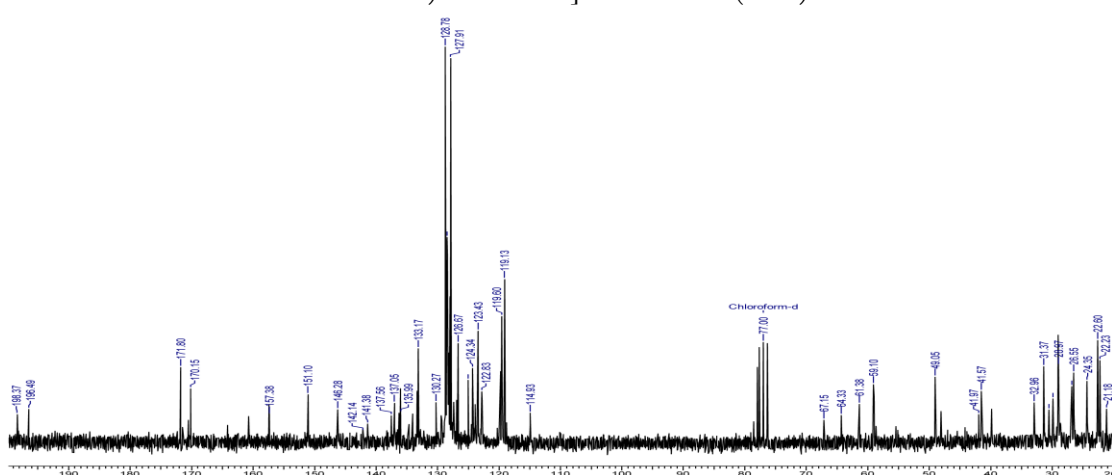
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-*N*-fenil-2-[8-(1,2,3,4-tetrahidroakridinilamino)oktilamino]butanamida (**152c**).



$^{13}\text{C}$  NMR spektr 4-(3,4-dimetilfenil)-4-okso-*N*-fenil-2-[8-(1,2,3,4-tetrahydroakridinilamino)oktilamino]butanamida (**152c**).



$^1\text{H}$  NMR spektr 4-*N*-difenil-4-okso-2-[8-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-ilamino)oktilamino]butanamida (**156c**)



$^{13}\text{C}$  NMR spektr 4-*N*-difenil-4-okso-2-[8-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-ilamino)oktilamino]butanamida (**156c**)

## **Biografija**

*Maja Vitorović-Todorović rođena je 30. septembra 1977. godine u Beogradu, SFRJ. Osnovnu školu i Četvrtu beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu. Diplomirala aprila 2004. godine, na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na katedri za neorgansku hemiju. Magistrirala je 2010. godine na Hemijskom fakultetu, na Katedri za biobemiju. Od septembra 2004. godine, zaposlena je na Vojnotebničkom institutu u Beogradu, u Sektoru za materijale i zaštitu, u Odeljenju za hemijsku i nuklearnu zaštitu kao istraživač saradnik, a od 2010. godine kao viši istraživač. Do danas je objavila devet naučnih radova u časopisima sa međunarodnom recenzijom. Jedno od saopštenja je nagrađeno IUPAC-ovom nagradom za najbolji poster na 47. Savetovanju Srpskog Hemijskog Društva, 2009. godine. Takođe, dobila je nagradu Vojnotebničkog instituta za doprinos razvoju lične NBH zaštitne opreme. Dobila je nagradu Ministarstva odbrane Republike Srbije za najbolji magistarski rad u 2010. godini. Na poziv urednika, recenzirala je naučne radove za časopise „European Journal of Medicinal Chemistry”, „Mini Reviews of Medicinal Chemistry” i „Journal of Applied Biomedical Science”. Udata je i majka jednog dečaka.*

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана Маја Д. Виторовић-Тодоровић

број уписа /

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Рационални дизајн и синтеза једињења са структурним скелетом амида ароилакрилних киселина која испољавају антихолинестеразну, антитубулинску и антипролиферативну активност

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 16. 04. 2014.



---

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Маја Д. Виторовић-Тодоровић

Број уписа /

Студијски програм органска хемија/ медицинска хемија

Наслов рада: Рационални дизајн и синтеза једињења са структурним скелетом амида ароилакрилних киселина која испољавају антихолинестеразну, антитубулинску и антипролиферативну активност

Ментор: проф. др. Љуба Мандић, проф. др. Иван Јуранић

Потписани: Маја Д. Виторовић-Тодоровић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда



У Београду, 16. 04. 2014.

---

**Прилог 3.**

## **Изјава о коришћењу**

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

Рационални дизајн и синтеза једињења са структурним скелетом амида ароилакрилних киселина која испољавају антихолинестеразну, антитубулинску и антипролиферативну активност

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**



У Београду, 16. 04. 2014.

---