

**Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu**

Predmet: Izveštaj Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije **Nataše V. Terzić-Jovanović**, istraživača saradnika zaposlenog na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju - Centar za hemiju, Univerziteta u Beogradu.

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 8. decembra 2016. godine, izabrani smo u Komisiju za pregled i ocenu doktorske disertacije **Nataše V. Terzić-Jovanović**, istraživača saradnika zaposlenog na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju - Centar za hemiju, Univerziteta u Beogradu pod naslovom:

„Derivati diaminoalkiladamantana sa supstituisanim hinolinima kao inhibitori parazita *Plasmodium falciparum* i botulinum neurotoksina“

Pošto smo podnetu disertaciju pregledali, podnosimo Nastavno-naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja disertacije

Doktorska disertacija **Nataše V. Terzić-Jovanović** napisana je na 322 strane i sadrži 34 sheme, 77 slika, 19 tabela i 259 literaturnih navoda. Teza sadrži sledeća poglavlja: 1. *Uvod*, 2. *Opšti deo*, 3. *Naši radovi*, 4. *Eksperimentalni deo*, 5. *Zaključak na srpskom jeziku*, 6. *Zaključak na engleskom jeziku*, 7. *Prilozi*, 8. *Literatura*. Pored navedenog, disertacija sadrži: *Sadržaj*, *Listu skraćenica*, *Rezime*, *Rezime na engleskom*, *Biografiju* i *Zahvalnicu*.

U *Uvodu* kandidat definiše cilj svoje doktorske teze. Kao cilj ovog rada postavljena je sinteza i ispitivanje antimalarijske aktivnosti aminohinolinskih derivata sa lipofilnom adamantanskom strukturnom jedinicom sa različito supstituisanim aminohinolinskim jezgrom u položaju C(3) i C(7). Dodatno, u nameri da se utvrdi da li svoju aktivnost iskazuju na više međusobno nepovezanih patogenih meta planirano je ispitivanje inhibitorne aktivnosti sintetisanih adamantanskih derivata prema botulinum neurotoksinu tipa A (BoNT/A).

U *Opštem delu* dati su opšti podaci o malariji i botulinum neurotoksinu kao i pregled literature koji se odnosi na antimalarijske lekove i inhibitore botulinum neurotokina i mehanizmima njihovog dejstva.

U *Našim radovima* detaljno su prikazani rezultati istraživanja: sinteza aminohinolinskih adamantanskih derivata sa različito supstituisanim hinolinskim jezgrom, analiza strukture sintetisanih jedinjenja, ispitivanje njihove biološke aktivnosti (antimalarijske, inhibitorne aktivnosti prema botulinum neurotoksinu tipa A (BoNT/A LC), citotoksičnosti i metaboličke stabilnosti. Određena je i kardiotoksičnost i genotoksičnost najaktivnijih derivata .

U *Eksperimentalnom delu* kandidat je detaljno opisao postupke kojima su sintetisana nova jedinjenja. Navedene su fizičko-hemijske karakteristike kao i rezultati strukturnih analiza jedinjenja dobijenih primenom savremenih instrumentalnih tehnika (NMR, IR, MS). Ukratko su dati i opšti postupci za izvođenje relevantnih testiranja biološke aktivnosti, metaboličke stabilnosti, citotoksičnosti, kardiotoksičnosti i genotoksičnosti kao i metode koje su korišćene za određivanje inhibicije građenja β -hematina i kiselinske konstante sintetisanih aminohinolinskih derivata.

Dobijeni rezultati ukratko su prikazani u *Zaključku* na srpskom i engleskom jeziku. Dat je spisak literature koji sadrži 259 literaturnih navoda, a zatim prilozi sačinjeni od NMR spektara tri biološki najaktivnija derivata kao i kratka biografija kandidata.

Kao prilog doktorske disertacije, dat je CD na kome se nalaze HPLC hromatogrami, NMR, IR i maseni spektri sintetisanih derivata.

B) Kratak opis postignutih rezultata

(i) Pored amido-adamantanskih aminohinolina sintetisani su adamantanski amino-derivati ($\text{Ar-N-C}(\alpha)\text{-C}(\alpha')\text{-N-C}(\alpha'')\text{-Ad}$) normalnog ($\text{C}(\alpha)\text{-H}$ i $\text{C}(\alpha')\text{-H}$) i račvastog niza (derivata kod kojih je mesto grananja bliže hinolinskom jezgru ($\text{C}(\alpha)\text{-Me/Et}$) i $\text{C}(\alpha')\text{-H}$).

(ii) Sintetisani su i adamantanski amino-derivati ($\text{Ar-N-C}(\alpha)\text{-C}(\alpha')\text{-N-C}(\alpha'')\text{-Ad}$) sa normalnim diaminoalkil-nizom i grananjem na adamantanskom fragmentu ($\text{C}(\alpha)\text{-H}$, $\text{C}(\alpha')\text{-H}$ i $\text{C}(\alpha'')\text{-Me}$), a razvijen je i postupak za dobijanje aminohinolinskih derivata sa račvastim nizom kod kojih je mesto grananja bliže adamantanskom fragmentu ($\text{C}(\alpha)\text{-H}$, $\text{C}(\alpha')\text{-Me/Et}$ i $\text{C}(\alpha'')\text{-H}$).

(iii) U cilju uvođenja fluorovog atoma u položaj C(3) hinolina ispitivana je reakcija 3-nitro-4,7-dihlorhinolina i *p*-toluensulfonilhidrazina a nagrađeni hidrazinski inermedijer ($N'-(7\text{-hlor-3-nitrohinolin-4-il})\text{-4-metilbenzen sulfonohidrazid}$) je zagrevanjem u 0,5 M NaOH na 80 °C preveden u 3-nitro-7-hlorhinolin. Nitro-grupa je redukovana pomoću $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, refluktovanjem u MeOH. Diazonijum-so dobijena iz amina pomoću HBF_4 i NaNO_2 je Balz-Schiemann-ovom reakcijom u dihlorbenzenu prevedena u odgovarajući fluorni derivat. Uvođenje joda u položaj C(4) izvedeno je pomoću LDA i I_2 na -85 °C u THF-u. U reakciji pored željenog 4-jod proizvoda (7-hlor-3-fluor-4-jodhinolina) uočeno je nastajanje sporednog 2-jod proizvoda (7-hlor-3-fluor-2-jodhinolina).

(iv) Sintetisani su F-C(3) analozi poznatih antimalarika **F-CQ** ($N^4\text{-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)-}N^1,N^1\text{-dietilpentan-1,4-diamin}$) i **F-AQ13** ($N'-(7\text{-hlor-3-fluorhinolin-4-il})\text{-}N,N\text{-dietilpropan-1,3-diamin}$). Nastajanje sporednog fluorovanog proizvoda 7-hlor-3-fluor-2-jodhinolina iskorišćeno je za sintezi i odgovarajućih 2-amino-izomera ($N^4\text{-(7-hlor-3-fluorhinolin-2-il)-}N^1,N^1\text{-dietilpentan-1,4-diamin}$ i $N'-(7\text{-hlor-3-fluorhinolin-2-il})\text{-}N,N\text{-dietilpropan-1,3-diamin}$).

Fluorovani derivati sintetisani su u uslovima aminovanja pod uslovima Buchwald-Hartwig-ove reakcije iz 4-jod- odnosno 2-jodhinolina i 2-amino-5-dietilaminopentana,

odnosno 3-dietilamino-1-propilamina, u prisustvu $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ i upotrebom liganada DPEPhos i Sphos.

(v) Za sintezu fluorovanih adamantanskih derivata sa račvastim diaminoalkil-nizom ($N\text{-C}(\alpha)\text{-C}(\alpha')\text{-N-C}(\alpha'')$) kod kojih je mesto grananja u neposrednom susedstvu hinolinskog jezgra ($\text{Me-C}(\alpha)$) odabran je pristup kojim se prethodno sintetisani odgovarajući amino-adamantanski prekursori ($\text{NH}_2\text{-C}(\alpha)\text{-C}(\alpha')\text{-N-C}(\alpha'')\text{-Ad}$) u poslednjem koraku vezuju za fluorovano aromatično jezgro.

Sinteza krajnjih aminohinolinskih derivata ostvarena je kuplovanjem adamantanskih prekursora i 2-jod- i 4-jodfluorovanih hinolinskih jezgara, upotrebom različitih reakcionih uslova jer se pokazalo da univerzalni uslovi za željeno kuplovanje reaktanata ne postoje.

Do kuplovanje C2-alkil-aminskog prekursora $N^1\text{-(1-adamantilmetil)propan-1,2-diamina}$ i hinolinskih jezgara i nastajanja metiladamantanskih proizvoda ($N^1\text{-(1-adamantilmetil)-N}^2\text{-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)propan-1,2-diamin}$ i $N^1\text{-(1-adamantilmetil)-N}^2\text{-(7-hlor-3-fluorhinolin-2-il)propan-1,2-diamin}$) dolazi isključivo sporom i nepotpunom reakcijom u *n*-PrOH kao rastvaraču, tokom četiri sata na 160 °C u mikrotalasnom reaktoru, u inertnoj atmosferi Ar (u prinosu od 7%, odnosno 9%).

Do kuplovanja amino-adamantanskih C3 i C4-prekursora ($N^1\text{-(1-adamantilmetil)butan-1,3-diamina}$, $N^1\text{-(1-adamantilmetil)pentan-1,4-diamina}$, $N^1\text{-[2-(1-adamantil)etil]butan-1,3-diamina}$ i $N^1\text{-[2-(1-adamantil)etil]pentan-1,4-diamina}$) dolazi primenom Buchwald–Hartwig-ove reakcije ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Sphos/DPEPhos ligandi).

(vi) Des-hloraminohinolinski derivati normalnog niza ($N\text{-(1-adamantilmetil)-N'}$ -hinolin-4-il-propan-1,3-diamin i $N\text{-[2-(1-adamantil)etil]-N'}$ -hinolin-4-il-propan-1,3-diamin) dobijeni su reduktivnim aminovanjem odgovarajućih adamantanskih aldehida *N*-hinolin-4-il-propan-1,3-diaminom, postupak sa NaBH_4 u smeši rastvarača MeOH/DCM (2:1) u prisustvu AcOH.

Ne postoje univerzalni uslovi ni za dobijanje des-hloraminohinolina račvastog niza, kod kojih do grananja dolazi u položaju do adamantanskog fragmenta ($\text{C}(\alpha)\text{-H}$ i $\text{C}(\alpha')\text{-Me}$).

N^2 -(1-Adamantilmetil)- N^1 -hinolin-4-il-propan-1,2-diamin, sa kraćim C2-alkil-nizom sintetisan je zagrevanjem N^2 -(1-adamantilmetil)propan-1,2-diamina i des-hlorhinolina u fenolu. Kuplovanje etiladamantanskog prekursora N^2 -[2-(1-adamantil)etil]propan-1,2-diamina i jezgra odvija se isključivo u NMP tokom dva sata na 180 °C u inertnoj atmosferi argona u mikrotalasnom reaktoru. Proizvodi sa dužim diaminoalkil-nizom dobijeni su Buchwald–Hartwig-ovom reakcijom, upotrebom Pd(OAc)₂ i SPhos kao liganda.

(vii) Selektivnim metilovanjem alifatične amino-grupe adamantanskih derivata pomoću 37% HCHO, u prisustvu ZnCl₂ i NaBH₃CN u MeOH, dobijeni su *N*-metilovani derivati.

Ispitivana je biološka aktivnost sintetisanih hinolinskih derivata.

(i) Svi sintetisani amidni derivati poseduju nedovoljno dobru *in vitro* antimalarijsku aktivnost (IC₅₀ = 6 - 1400 nM). Na osnovu indeksa rezistentnosti (IR) uočena je viša aktivnost amido-adamantanskih aminohinolina prema CQS soju (D6) u poređenju sa CQR (W2) i multirezistentnim (TM91C235) sojem. 2-(1-Adamantil)-*N*-{2-[(7-hlorhinolin-4-il)amino]etil}acetamid kao najaktivnije jedinjenje iz ove serije pokazuje *in vitro* aktivnost prema CQS soju D6 (IC₉₀(D6) = 157 nM) osam puta nižu od aktivnosti CQ (IC₉₀(D6) = 20 nM).

(ii) Od deset sintetisanih aminohinolinskih derivata kod kojih su adamantanski fragmenti preko diaminskih premostnih nizova normalnog niza povezani sa hinolinskim jezgrom, čak osam poseduje bolju aktivnost (IC₉₀) prema CQS soju D6 u odnosu na CQ, dok je sedam derivata aktivnije prema multirezistentnom C235 i jedan prema CQS soju W2 u odnosu na MFQ. *Di*-adamantanski derivati, koji nastaju kao sporedni proizvodi prilikom reduktivnog aminovanja iskazuju nekoliko puta lošiju aktivnost prema svim sojevima parazita verovatno kao posledicu prisustva dve voluminozne adamantanske jedinice.

♦ Najaktivnije jedinjenje u *in vitro* testu je *N*-(1-adamantilmetil)-*N'*-(7-hlorhinolin-4-il)etan-1,2-diamin koji prema CQR i MFQ umereno osetljivom soju W2 ispoljava

aktivnost ($IC_{90} = 15,22 \text{ nM}$) što je približno aktivnosti MFQ ($IC_{90} = 19,14 \text{ nM}$) i oko 50 puta bolje od aktivnosti CQ ($IC_{90} = 736 \text{ nM}$). Efikasnost jedinjenja *in vivo* određivana je modifikovanim Thompson-ovim testom u eksperimentima vršenim na miševima inficiranim *P. berghei*. Primenom jedinjenja u dozi od 40 mg/kg/dan preživela su dva od pet testiranih miševa. Smrt inficiranih miševa nastupila je između šesnaestog i dvadeset četvrtog dana (kod preživelih miševa uočeno je prisustvo parazita trideset prvog dana, a nekropsijom su utvrđena oštećenja mozga i jetre prouzrokovana malarijom).

(iii) Poređenjem antimalarijske aktivnosti sintetisanih aminohinolinskih derivata sa račvastim diaminskim nizom ($N-C(\alpha)-C(\alpha')-N-C(\alpha'')-Ad$) nađeno je da uvođenje etil-grupe na α -ugljenikov atom, kao i pomeranje mesta račvanja iz položaja u kojem je bliža hinolinskom jezgru u položaj u susedstvu adamantanskog, ili na adamantanski fragment, dovodi do smanjenja inhibitorne aktivnosti i metaboličke stabilnosti. Treba istaći i da tri aminohinolinska jedinjenja (N^1 -(1-adamantilmetil)- N^2 -(7-hlorhinolin-4-il)propan-1,2-diamin, N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^2 -(7-hlorhinolin-4-il)propan-1,2-diamin i N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^4 -(7-hlorhinolin-4-il)pentan-1,4-diamin) pokazuju preko deset puta bolju aktivnost prema C235 u odnosu na MFQ. Takođe, dva derivata (N^1 -(1-adamantilmetil)- N^2 -(7-hlorhinolin-4-il)propan-1,2-diamin i N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^2 -(7-hlorhinolin-4-il)propan-1,2-diamin) pokazuju deset puta višu aktivnost prema D6 soju u odnosu na CQ.

♦ Na osnovu metaboličke stabilnosti u kombinaciji sa dobrom antimalarijskom aktivnošću i niskom toksičnošću, za ispitivanje *in vivo* antimalarijske aktivnosti izdvojena su sledeća jedinjenja: N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin, N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^2 -(7-hlorhinolin-4-il)propan-1,2-diamin, N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^4 -(7-hlorhinolin-4-il)pentan-1,4-diamin i N^2 -[2-(1-adamantil)etil]- N^1 -(7-hlorhinolin-4-il)propan-1,2-diamin. Najbolju *in vivo* aktivnost pokazao je N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin, koji pri dozama od 160 i 80 mg/kg/dan dovodi do izlečenja svih pet inficiranih miševa.

♦ Kako sinteza jedinjenja koja deluju na obe faze ciklusa parazita (eritrocitnu i egzo-eritrocitnu fazu) danas predstavlja veliki izazov, u nastavku istraživanja ispitivane su *in vitro* inhibitorne aktivnosti N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-

diamin i njegovog etiladamantanskog analoga (N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin) u fazi jetre. Za određivanje aktivnosti upotrebljena je metoda bioluminiscentne kvantifikacije. Inhibitorna aktivnost u fazi jetre određivana je pri sedam različitih koncentracija (10-0,1 μ M). Pri koncentraciji od 5 μ M ova jedinjenja pokazuju značajnu inhibitornu aktivnost, smanjujući nivo parazitemije u fazi jetre na 0,1% odnosno 8%.

Pri nižim koncentracijama aktivnost jedinjenja se smanjuje, pri čemu metiladamantanski derivat pokazuje bolju zavisnost procenta inhibicije od primenjene koncentracije (poseduje bolji “dose-response”) i pri koncentraciji od 2,5 μ M znatno je aktivniji od svog etiladamantanskog homologa (N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin smanjuje parazitemiju na 2%, a N^1 -[2-(1-adamantil)etil]- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin na 63%).

(iv) F-C(3) analozi najaktivnije adamantanske grupe jedinjenja aminohinolinski derivati sa račvastim diaminoalkil-nizom (N -C(α)-C(α')- N -C(α'')) kod kojih je mesto grananja u neposrednom susedstvu hinolinskog jezgra (Me-C(α)). Radi poređenja nakon sinteze derivata 4-amino- sintetisani su i odgovarajući derivati 2-amino-3-fluoradamantanske serije jedinjenja. U cilju ispitivanja uticaja položaja metil-grupe diaminoalkil-niza na antimalarijsku aktivnost kod adamantanskih 4-amino-3-fluorhinolina sintetisan je derivat sa metil-grupom u poziciji bližoj adamantanskom fragmentu (Me-C(α')). Sintetisani su F-C(3) analozi CQ i AQ-13 (F-CQi F-AQ13 kao i njima odgovarajući 2-amino-izomeri).

♦ *In vitro* antimalarijska aktivnost svih F-C(3) adamantanskih derivata prema ispitivanim sojevima *P. falciparum* je značajno niža u poređenju sa aktivnostima H-C(3) izostera. Nedovoljno dobra *in vitro* aktivnost fluorovanih derivata je potvrđena kod F-CQ (N^4 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)- N^1 , N^1 -dietilpentan-1,4-diamin) koji prema CQS soju D6 pokazuje trideset puta nižu aktivnost u odnosu na CQ.

♦ U cilju dobijanja informacija o mogućem mehanizmu dejstva fluorovanih derivata, određen je stepen inhibicije građenja β -hematina jedinjenja sa fluorom i rezultati su upoređeni sa stepenom inhibicije nefluorovanih izostera . Vrednosti inhibicije građenja

β -hematina ispitivanih derivata pokazuju da fluorni derivati imaju značajno niže IC_{50} vrednosti u odnosu na H-C(3) izostere. Na osnovu tih rezultata i činjenice da postoji zavisnost stepena inhibicije građenja β -hematina i molarnog odnosa hemina i ispitivanog jedinjenja, proističe da se ispitivani fluorovani derivati značajno bolje vezuju za slobodni hematin u poređenju sa H-C(3) izosterama i da najverovatnije imaju isti mehanizam dejstva kao i CQ. Takođe, značajno viša inhibitorna aktivnost F-CQ (N^4 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)- N^1,N^1 -dietilpentan-1,4-diamin, $IC_{50} = 1,07$) u odnosu na aktivnost njemu analognog 2-amino-derivata (N^4 -(7-hlor-3-fluorhinolin-2-il)- N^1,N^1 -dietilpentan-1,4-diamin, $IC_{50} = 2,43$) ukazuje da položaj sporednog alkilamino-niza značajno utiče na interakcije aminohinolina i hematina.

♦ Uvođenje fluora u C(3)-položaj aminohinolinskog jezgra dovodi do smanjenja pK_a vrednosti jedinjenja. Fluorni derivati su na fiziološkom pH isključivo, a na pH FV parazita prevashodno u monoprotovanom obliku, za razliku od H-C(3) izosternih derivata koji su u fiziološkim uslovima prisutni u monoprotovanom, a u FV u diprotovanom obliku.

♦ N^1 -(1-Adamantimetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin, kao F-C(3) analog našeg najaktivnijeg sintetisanog adamantanskog derivata (N^1 -(1-adamantimetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin) izabran je za dalje *in vivo* testiranje zbog visokog stepena inhibicije građenja β -hematina i pored loše *in vitro* antimalarijske aktivnosti i nedovoljne metaboličke stabilnosti (u prisustvu mišije mikrozomalne suspenzije ($t_{1/2} = 21$ min) i suspenzije humanih mikrozoma ($t_{1/2} = 13$ min)). Kada se primeni oralno u dozi od 160 ili 80 mg/kg/dan N^1 -(1-adamantimetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin, poput svoje izostere (H-C(3)) dovodi do izlečenja svih pet miševa (MCD za oba jedinjenja iznosi 80 mg/kg/dan). Razlika u aktivnosti izostera postaje primetna tek pri nižim dozama. Primenom u dozama od 40 i 20 mg/kg/dan postiže se privremeno suzbijanje infekcije ispod nivoa detekcije pri čemu jedinjenje pokazuje aktivnost i pri nižim dozama (MAD jedinjenja je 10 mg/kg/dan), dok je jedinjenje N^1 -(1-adamantimetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin neaktivno prilikom primene u dozi od 20 i 10 mg/kg/dan.

♦ Ispitivan je efekat uvođenja fluora u položaj C(3) hinolinskog jezgra na inhibiciju nastajanja sporozoitima u fazi jetre. Poređenjem aktivnosti fluornih derivata sa aktivnostima odgovarajućih H-izostera (poređenjem odgovarajućih H-C(3)/F-C(3) parova može se uočiti da uvođenje fluora u položaj C(3) hinolinskog jezgra dovodi do značajnog povećanja *in vitro* inhibitorne aktivnosti. Fluorovani derivati poseduju značajno niže IC₅₀ vrednosti u odnosu na odgovarajuće H-C(3) izostere (*N*¹-(1-adamantilmetil)-*N*³-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin: IC₅₀ = 0,3 μM u odnosu na *N*¹-(1-adamantilmetil)-*N*³-(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin: IC₅₀ = 1-2,5 μM i *N*¹-[2-(1-adamantil)etil]-*N*³-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin f: IC₅₀ = 1-2,5 μM u odnosu na *N*¹-[2-(1-adamantil)etil]-*N*³-(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin: IC₅₀ = 2,5-5 μM). Pri koncentraciji 5 μM, svi fluorni derivati pokazuju dobru inhibitornu aktivnost, smanjujući nivo parazitemije na 1-3%. Sa sniženjem koncentracija aktivnost jedinjenja opada pri čemu *N*¹-(1-adamantilmetil)-*N*³-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin značajnu aktivnost (od 38%) ispoljava čak i pri koncentraciji 0,125 μM, što ga čini prvim hinolinskim derivatom sa izraženom *in vitro* aktivnošću na forme plazmodijuma prisutne u jetri.

♦ U nameri da se dobije bolji uvid u aktivnost jedinjenja u fazi jetre vršeno je ispitivanje *in vivo* antimalarijske aktivnosti *N*¹-(1-adamantilmetil)-*N*³-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamina. Eksperimenti su vršeni na C57BL miševima inficiranim PbA-LuciGFP sporozoitima *P. berghei*. U dva paralelna ogleda *N*¹-(1-adamantilmetil)-*N*³-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin je primenjen oralno u dozama od 50 odnosno 80 mg/kg tokom tri dana u kontinuitetu (D-1, D0 i D+1). Procena *in vivo* inhibitorne aktivnosti jedinjenja u fazi jetre određuje se 48h posle inficiranja merenjem relativnog intenziteta luminiscencije jetre živih miševa. Primenom *N*¹-(1-adamantilmetil)-*N*³-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamina u dozi od 50 mg/kg smanjuje se nivo parazitemije u fazi jetre za 84% (relativni nivo parazitemije koji se određuje u odnosu na slepu probu). Kada se primeni u većoj dozi od 80 mg/kg aminohinolin snižava nivo parazitemije za 92%.

♦ Kako *N*¹-(1-adamantilmetil)-*N*³-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin i pored loše *in vitro* aktivnosti iskazuje značajnu *in vivo* aktivnost u eritrocitnoj fazi, kao i u fazi jetre, u nastavku istraživanja vršene su detaljnije metaboličke studije kojima je ispitana

metabolička stabilnost jedinjenja u prisustvu hepatocita miša i čoveka i određen njegov metabolički profil. Utvrđeno je da unutrašnji klirens, odnosno brzina kojom se jedinjenje eliminiše iz hepatocita miša i čoveka iznosi $8,7 \mu\text{L}/\text{min}/10^6$ odnosno $8,9 \mu\text{L}/\text{min}/10^6$. Vreme poluživota u prisustvu hepatocita miša ($t_{1/2} = 79 \text{ min}$) i čoveka ($t_{1/2} = 78 \text{ min}$) ukazuje na značajnu metaboličku stabilnost N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamina i u nesaglasnosti je sa njegovim kratkim vremenom poluživota u prisustvu mikrozomalne suspenzije iz jetre miša ($t_{1/2} = 21 \text{ min}$), odnosno mikrozomalne suspenzije čoveka ($t_{1/2} = 13 \text{ min}$).

U okviru metaboličkih studija vršena je identifikacija metabolita koji nastaju inkubacijom N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamina sa hepatocitima. Posle dvočasovne inkubacije pored polaznog jedinjenja (37% u ogledu u prisustvu hepatocita miša, 32% u prisustvu humanih hepatocita) MS/MS spektroskopijom detektovani su isključivo proizvodi hidrosilacije $[M+16]^+$ i dihidrosilacije $[M+32]^+$ (M^+ : $[M+16]^+$: $[M+32]^+$ = 33 : 26 : 1 u ogledu sa hepatocitima miša, odnosno 35 : 26 : 1 u ogledu sa humanim hepatocitima). Proizvodi druge faze metabolizma nisu detektovani.

U cilju ispitivanja potencijalne kardiotoksičnosti najaktivniji fluorni derivat, N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin i njegov izosterni H-C(3) analog, N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin podvrgnuti su testu blokade hERG kanala. Testom je pokazano da jedinjenja nisu kardiotoksična. Određene IC_{50} vrednosti derivata veće su od $5 \mu\text{M}$ (u istom ogledu kinidinu kao pozitivnoj kontrolnoj probi određena je IC_{50} vrednost $2,67 \mu\text{M}$). Takođe oba jedinjenja, pri najvišoj koncentraciji na kojoj je vršen hERG test $5 \mu\text{M}$, pokazuju nisku inhibiciju kalijumovih kanala (N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin: 11,7% i N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin: 8,54%).

Ispitivan je i mutageni potencijal N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamina Ames testom. Eksperimenti su vršeni pri koncentraciji jedinjenja od $500 \mu\text{M}$, na sojevima *Salmonella typhimurium* sa defektom u genu za biosintezu histidina (TA98 i TA100), sa i bez prisustva S9 (+S9, -S9). Negativni rezultati testa ukazuju na to da ispitivano jedinjenje kao ni njegovi metaboliti nisu genotoksični i da ne ispoljavaju štetni efekat na nivou DNK molekula.

(v) Sintetisani su H-C(7) analozi najaktivnije adamantanske grupe jedinjenja, aminohinolini sa račvastim diaminoalkil-nizom kod kojih je mesto grananja u neposrednom susedstvu hinolinskog jezgra ($\text{CH}_3\text{-C}(\alpha)$). Dodatno, sintetisani su i odgovarajući analogni F-C(3) derivati sa diaminopropanskim nizom. Derivati H-C(7) serije pokazuju nižu aktivnost u odnosu na derivate inicijalne Cl-C(7) serije. Uvođenje fluora u položaj C(3) hinolinskog jezgra kod derivata des-hloraminohinolinske serije jedinjenja dovodi do dodatnog smanjenja inhibitorne aktivnosti.

(vi) Određen je procenat inhibicije metaloproteaze botulinum neurotoksina tipa A (BoNT/A LC) sintetisanih jedinjenja. Rezultati inhibitorne aktivnosti adamantanskih aminohinolina ukazuju da pojedini derivati pri koncentraciji od 20 μM vrše umerenu inhibiciju metaloproteaze, a deset aminohinolina je odabrano za *ex vivo* eksperimente, u kojima je određivana sposobnost jedinjenja da u motornom neuronu štite protein SNAP-25 od hidrolize kao posledice intoksikacije botulinum neurotoksinom. Najvišu *ex vivo* inhibitornu aktivnost imaju N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)- N^1 -metilbutan-1,3-diamin i N -(1-adamantilmetil)- N' -(7-hlorhinolin-4-il)- N -metilpropan-1,3-diamin. Kada se primene u koncentraciji od 10 μM ili 20 μM 30 min pre intoksikacije motornog neurona derivati štite SNAP-25 protein od dejstva BoNT/A holotoksina 63% (N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)- N^1 -metilbutan-1,3-diamin); 56% (N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)- N^1 -metilbutan-1,3-diamin) odnosno 72% (N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)- N^1 -metilbutan-1,3-diamin); 51% (N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)- N^1 -metilbutan-1,3-diamin). Dodatno, kada se primeni 30 odnosno 60 min nakon intoksikacije jedinjenje N -(1-adamantilmetil)- N' -(7-hlorhinolin-4-il)- N -metilpropan-1,3-diamin štite SNAP-25 od dejstva holotoksina BoNT/A 46,4% odnosno 39,5%. Pri istim eksperimentalnim uslovima N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)- N^1 -metilbutan-1,3-diamin ne pokazuje inhibitornu aktivnost.

C) Uporedna analiza rezultata kandidata sa podacima iz literature

Malarija je jedna od najrasprostranjenijih bolesti, koja prete približno polovini svetske populacije i koja je u zemljama u razvoju glavni uzrok smrtnosti dece uzrasta do 5 godina. Neprekidan razvoj otpornosti *P. falciparum* prema postojećim lekovima stvara potrebu za pronalaženjem novih jedinjenja koja su aktivna na različite forme plazmodijuma i koja inhibiranjem različitih razvojnih faza parazita doprinose odlaganju pojave rezistencije. Jedna od strategija za razvoj novih lekova, kojom se smanjuju troškovi i skraćuje vreme potrebno za pronalazak novih aktivnih supstanci je hemijska modifikacija postojećih hinolinskih antimalarika poznatog mehanizma dejstva.

U okviru ove doktorske teze izvršena je sinteza serije aminohinolinskih derivata kod koje su lipofilni adamantanski fragmenti preko amido-aminskih i diaminskih premostnih nizova povezani sa hinolinskim jezgrima. Dodatno je ispitivan uticaj promene elektronske gustine aminohinolinskog jezgra na antimalarijsku aktivnost. Dok je efekat različitih supstituenata u položaju C(5), C(6) i C(7) aminohinolinskog jezgra (B prsten) dobro ispitan, u literaturi je opisan mali broj derivata kod kojih je vršena modifikacija na hinolinskom prstenu A uz ispitivanje njihove antimalarijske aktivnosti. Od malobrojnih sintetisanih jedinjenja izdvaja se sontokin, analog CQ koji u položaju C(3) poseduje metil-grupu. Nakon što je ustanovljena umerena aktivnost i izražena toksičnost sontokina, u cilju optimizacije strukture usledila je sinteza serije farmakina (derivati sa različitim alkil- i aril-supstituentima u C(3) i *N*-alkilamino bočnim nizovima). Od sintetisanih derivata najbolju aktivnost iskazuje farmakin 203 derivat koji prema multirezistentnim sojevima pokazuje nanomolarnu *in vitro* aktivnost (IC_{50} (D6) = 0,9 nM).

Većina sintetisanih aminohinolinskih derivata poseduje zadovoljavajuću *in vitro* antimalarijsku aktivnost, pri čemu su najvišu, jako dobru, *in vivo* inhibitornu aktivnost (prema *P. berghei*, u aseksualnoj eritrocitnoj fazi u uslovima modifikovanog Thompson-ovog testa) ispoljile H-i F-izostere: N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin i N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin. Prilikom oralne primene u dozi od 160 i 80 mg/kg/danu ova jedinjenja dovode do izlečenja 5 od 5 inficiranih miševa (MCD za oba jedinjenja iznosi 80 mg/kg/dan). Rezultati BHIA testova

daju indikacije o mehanizmu dejstva i upućuju da jedinjenja u eritrocitnoj razvojnoj fazi parazita utiču na proces detoksifikacije u FV (pri čemu je zapaženo da se fluorovani derivat dvostruko bolje vezuju za hematin u odnosu na H-izosteru).

Kako danas veliki izazov predstavlja sinteza jedinjenja koja deluju na obe faze ciklusa parazita (eritrocitnu i egzo-eritrocitnu fazu) u nastavku istraživanja ispitivane su *in vitro* inhibitorne aktivnosti najaktivnijih derivata i u fazi jetre.

Ustanovljeno je i da F-izostera, N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin, antimalarijsku aktivnost dodatno iskazuje u fazi jetre i prvi je aminohinolinski derivat koji značajnu inhibitornu aktivnost pored eritrocitne ispoljava i u egzoeritrocitnoj razvojnoj fazi parazita ($IC_{50} = 0,3 \mu M$). U *in vivo* eksperimentima vršenim na miševima inficiranim sporozoitima *P. berghei* u dozi od 80 mg/kg ovo jedinjenje snižava nivo parazitemije za 92%. Dodatna farmakološka ispitivanja su pokazala da N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin nije toksičan, da nije mutagen, da poseduje dobar hERG profil i da je metabolički stabilan u prisustvu hepatocita. Prednost jedinjenja koji deluju u fazi jetre je višestruka: sprečava se razvoj infekcije i bolest se zaustavlja u asimptomatskoj fazi, dok sa druge strane, delovanjem u fazi koju karakteriše prisustvo manjeg broja parazita smanjuje se i mogućnost razvoja rezistentnosti tokom vremena, pa samim tim ova jedinjenja predstavljaju bolju opciju za iskorenjivanje malarije.

Dodatno je utvrđena i inhibitorna aktivnost sintetisanih aminohinolina prema botulinum neurotoksinu tipa A (BoNT/A LC). Ustanovljeno je da pojedini derivati pri koncentraciji od 20 μM vrše umerenu inhibiciju metaloproteaze. N^1 -(1-Adamantilmetil)- N^3 -(7-hlorhinolin-4-il)- N^1 -metilbutan-1,3-diamin i N -(1-adamantilmetil)- N' -(7-hlorhinolin-4-il)- N -metilpropan-1,3-diamin poseduju najvišu *ex vivo* inhibitornu aktivnost i pri koncentraciji od 10 μM ili 20 μM , primenom 30 min pre intoksikacije motornog neurona holotoksinom BoNT/A štite SNAP-25 protein od hidrolize 63% i 56% odnosno 72% i 51%. Dodatno, kada se primeni 30/60 min nakon intoksikacije jedinjenje N -(1-adamantilmetil)- N' -(7-hlorhinolin-4-il)- N -metilpropan-1,3-diamin inhibira hidrolizu SNAP-25 od 46% odnosno 40%.

Direktna zavisnost između strukture i rezultata bioloških testova nije ustanovljena, što je pokazatelj različitih mehanizama kojima adamantanski aminohinolini deluju na istu ili različite patogene mete.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Naučni radovi publikovani u međunarodnim naučnim časopisima:

- 1) B. A. Šolaja, D. Opsenica, K. S. Smith, W. K. Milhous, N. Terzić, I. Opsenica, J. C. Burnett, J. Nuss, R. Gussio, S. Bavari: Novel 4-Aminoquinolines active against chloroquine-resistant and sensitive *P. falciparum* strains that also inhibit botulinum serotype A. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 4388-4391 (IF 5,079; M21).
- 2) Natasa Terzić, Jelena Konstantinović, Mikloš Tot, Jovana Burojević, Olgica Djurković-Djaković, Jelena Srbljanović, Tijana Štajner, Tatjana Verbić, Mario Zlatović, Marta Machado, Inês S. Albuquerque, Miguel Prudêncio, Richard J. Sciotti, Stevan Pecic, Sarah D'Alessandro, Donatella Taramelli, Bogdan A. Šolaja: Reinvestigating Old Pharmacophores: Are 4-Aminoquinolines and Tetraoxanes Potential Two-Stage Antimalarials? *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 264-281 (IF 5,589; M21).

Kongresi i saopštenja:

- 1) Nataša V. Terzić-Jovanović, Jovana V. Burojević, Olgica Đurković-Đaković, Jelena Srbljanović, Bogdan A. Šolaja, Novi adamantanski derivati 4-aminohinolina: sinteza, ispitivanje *in vitro* i *in vivo* antimalarijske aktivnosti 52. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 29-30. Maj 2015, izvodi radova OH P 12, str. 126; ISBN 978-86-7132-056-6

2) Srbljanović J., Bobić B., Štajner T., Terzić-Jovanović N., Šolaja A. B., Đurković-Đaković O., Antimalarial potential of novel quinoline derivatives, “*Malaria Gordon Research Seminar*”, Girona, Spain, 25-26. 07. 2015 Abstracts P67

E) Zaključak komisije

Komisija je na osnovu detaljnog pregleda doktorske teze Nataše Terzić-Jovanović pod naslovom „**Derivati diaminoalkiladamantana sa supstituisanim hinolinima kao inhibitori parazita *Plasmodium falciparum* i botulinum neurotoksina**“ zaključila da su rezultati dobijeni u toku izrade ove disertacije potpuno u skladu sa savremenim trendovima u organskoj i medicinskoj hemiji i da potpuno odgovaraju aktuelnim potrebama u iznalaženju novih jedinjenja koja bi mogla biti aktivna prema parazitima malarije i botulinum neurotoksinu. Štaviše, rezultati do kojih se došlo tokom izrade ove doktorske teze pomeraju granice poznatog i otvaraju nove oblasti istraživanja u medicinskoj hemiji antimalarika i inhibitora botulinum neurotoksina.

Neadekvatna i prekomerna upotreba hlorokina u lečenju i kontroli malarije, svojevremeno je dovela do pojave rezistentnih sojeva *P. falciparum*. Tek je nedavno primećena pojava ponovne osetljivosti CQR sojeva parazita prema CQ, kao rezultat njegove smanjene i kontrolisane upotrebe poslednjih godina. Usled mogućeg razvoja rezistentnosti, upotreba aminohinolinskih derivata u monoterapiji u budućnosti je malo verovatna, ali je izvesna njihova primena u kombinacionoj terapiji (primena aminohinolina u kombinaciji sa lekovima drugačijeg mehanizma dejstva).

Jedinjenja koja poput N^1 -(1-adamantilmetil)- N^3 -(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamina pokazuju aktivnost na više razvojnih faza parazita a pri tome su (kao i njegovi hepatocitni metaboliti) netoksična i nemutagena i sa dobrim hERG profilom imaju odličan potencijal da se razviju u inhibitore koji će ući u grupu postojećih antimalarijskih lekova.

Iz ove doktorske disertacije proistekla su dva rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (*Journal of Medicinal Chemistry*).

Na osnovu svega izloženog, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da kandidatu Nataši Terzić-Jovanović odobri odbranu doktorske disertacije pod navedenim naslovom.

У Београду, 23. 12. 2016.

Članovi komisije:

Akademik **Dr Bogdan Šolaja** (mentor)

Dr Igor Opsenica, docent
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Dragana Milić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

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

