

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na sednici održanoj 29.01.2021. godine, donelo je **Odluku (broj 158/2 od 29.01.2021.)** kojom je imenovana **Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije** pod naslovom: „**Dizajniranje, sinteza i *in vitro* ispitivanja derivata propiofenona kao potencijalnih inhibitora enzima HIV-1 proteaze**“, kandidata **Nemanje Turkovića**, doktora farmacije, studenta doktorskih akademskih studija Farmaceutskog fakulteta u Beogradu na modulu Farmaceutska hemija.

Komisija u sastavu:

1. **Dr sc. Bojan Marković, vanredni profesor,**
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
2. **Dr sc. Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor,**
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
3. **Dr sc. Silva Dobrić, redovni profesor,**
Univerzitet Odbrane - Medicinski fakultet VMA

pročitala je priloženu doktorsku disertaciju, pregledala kompletnu dokumentaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta sledeći

I Z V E Š T A J

1. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija doktora farmacije Nemanje Turkovića pod nazivom „**Dizajniranje, sinteza i *in vitro* ispitivanja derivata propiofenona kao potencijalnih inhibitora enzima HIV-1 proteaze**“ napisana je na 196 strana standardnog formata (prored 1; font *Times New Roman* – 12 pt). Doktorska disertacija sadrži sledeće delove: Naslovnu stranu na srpskom i engleskom jeziku, kao i Strane sa podacima o mentorima i članovima Komisije, Sažetke na srpskom i engleskom jeziku (Izvod, Ključne reči, Naučna oblast i Uža naučna oblast), Listu skraćenica, Sadržaj i tekst disertacije podeljen po poglavljima. Tekst disertacije se sastoji iz sledećih poglavlja: **1. Uvod** (48 strana), **2. Cilj rada** (3 strane), **3. Eksperimentalni deo** (28 strana), **4. Rezultati i diskusija** (78 strana), **5. Zaključak** (3 strane), **6. Literatura** (11 strana), **7. Prilozi** (9 strana). U prilogu ovog Izveštaja nalazi se Spisak publikovanih radova i saopštenja koji čine deo doktorske disertacije, kratka Biografija kandidata, potpisana Izjava o autorstvu, potpisana Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada i Izjava o korišćenju.

Disertacija je napisana jasnim stilom, pregledna je i sadrži 49 slika (13 u **Uvodu**, 8 u **Eksperimentalnom delu** i 28 u **Rezultatima i diskusiji**), 34 tabele (1 u **Uvodu**, 4 u **Eksperimentalnom delu**, 25 u **Rezultatima i diskusiji** i 4 u **Prilogu**) i 149 literaturnih navoda.

U **Uvodu** je, kroz 7 potpoglavlja dat pregled naučnih saznanja značajnih za predmet proučavanja doktorske disertacije: *Opšti deo; HIV; Molekulski docking; Halkoni; Lipofilnost; Redoks aktivnost i Kvantitativni odnos strukture i dejstva.*

U prvom potpoglavlju **Uvoda** koncizno su prikazani opšti podaci u vezi sa HIV-om, epidemiologijom, trenutno dostupnom terapijom protiv HIV-a i propiofenonima, kao potencijalnim anti-HIV lekovima.

Drugi deo **Uvoda** je posvećen HIV-u. U ovom delu je opisano poreklo virusa i njegovo otkriće, podela HIV-a na tipove i filogenetske grupe i prikazana struktura virusa. Detaljnim pregledom literaturnih navoda opisana je replikacija virusa, patogeneza, tok HIV infekcije i predstavljeni su epidemiološki podaci koji se odnose na HIV infekciju. Dat je pregled karakteristika anti-HIV lekova po grupama pri čemu je značajna pažnja posvećena lekovima iz grupe inhibitora HIV-1 proteaze. Detaljno su opisani struktura i funkcija HIV-1 proteaze sa posebnim osvrtom na rezistenciju koju virus stiče na poznate inhibitore HIV-1 proteaze.

U trećem potpoglavlju **Uvoda** je opisana savremena metoda dizajniranja novih lekova primenom molekuskog *docking*-a. Kandidat je podrobno opisao komponente *docking* programa, algoritme za pretragu koji učestvuju u generisanju pretpostavljene orijentacije/konformacije liganda (poze) koja će se vezati za ciljno mesto dejstva, kao i funkciju za bodovanje, koja služi za procenu kvaliteta *dock*-ovanih kompleksa. Takođe, predložene su karakteristike programa *AutoDock Vina* koji se koristi za molekulski *docking* i virtuelni skrining (*virtual screening*).

U četvrtom potpoglavlju uvodnog dela doktorske disertacije opisani su propiofenonski derivati – halkoni. Jasno su prikazana farmakološka dejstva ove grupe jedinjenja, kao i literaturni podaci koji se odnose na anti-HIV-1 proteaznu aktivnosti halkona.

Peti deo **Uvoda** je posvećen lipofilnosti. Kandidat je dao opsežan opis parametara lipofilnosti, kao i metoda za njihovo određivanje (*Shake flask* metoda, hromatografske metode, računarske metode za predviđanje parametara lipofilnosti). Na kraju potpoglavlja prikazani su osnovi kvantitativne veze između strukture i retencije (engl. *Quantitative structure-retention relationship* - QSRR).

U šestom potpoglavlju **Uvoda** su izloženi najznačajniji podaci o redoks aktivnosti. Opisani su: oksidativni stres, slobodni radikali i antioksidansi. Posebna pažnja je posvećena oksidativnom stresu i AIDS-u, tj. antioksidativnom dejstvu halkona.

U poslednjem potpoglavlju **Uvoda**, kandidat je dao osvrt na kvantitativni odnos strukture i dejstva (engl. *quantitative structure-activity relationship* - QSAR). Opisane su karakteristike molekulskih deskriptora, uključujući i *GRid-INdependent* Deskriptore (GRIND). Poseban akcenat je dat na opis metode 3D-QSAR.

Osnovni cilj istraživanja je definisan na jasan način - dizajniranje i sinteza novih jedinjenja, derivata propiofenona kao potencijalnih inhibitora HIV proteaze. **Ciljevi** doktorske disertacije obuhvataju: 1. Dizajniranje novih nepeptidnih inhibitora HIV-1 proteaze; 2. Sintezu propiofenonskih derivata (halkona); 3. Određivanje lipofilnosti novosintetisanih halkona; 4. *In vitro* ispitivanje anti-HIV-1 proteazne aktivnosti sintetisanih jedinjenja fluorimetrijskom metodom; 5. Ispitivanje redoks aktivnosti novosintetisanih halkona u serumskom pulu zdravih ispitanika i 6. Izvođenje studija kvantitativnog odnosa između strukture i dejstva propiofenonskih derivata.

Kandidat je postavljene ciljeve realizovao kroz šest koraka istraživačkog rada, čiji opis je dat u eksperimentalnom delu rada.

U poglavlju **Eksperimentalni deo** navedene su karakteristike korišćenih reagenasa i prikazan je detaljan opis eksperimentalnih procedura, uređaja, opreme i kompjuterskih programa koji su korišćeni kako bi se realizovali postavljeni ciljevi istraživanja. Eksperimentalni rad odvijao se kroz šest koraka.

U prvom koraku je izvršen molekulski *docking* derivata propiofenona. 3D struktura HIV-1 proteaze kokristalisana sa ligandom je preuzeta iz baze podataka *RCSB Protein Data Bank*. Primenom kompjuterskog programa *ChemOffice v7.0 Ultra* optimizovani su komercijalno dostupni inhibitori HIV proteaze (lopinavir, ritonavir i darunavir), osnovne *trans*-1,3-diaril-2-propen-1-onske strukture i mono-, di- i tri- supstituisani derivati *trans*-1,3-diaril-2-propen-1-onske strukture. Ispitivanje potencijalnih interakcija halkona (derivata *trans*-1,3-diaril-2-propen-1-on) sa aminokiselinama u aktivnom mestu HIV-1 proteaze kao i uticaja različitih supstituenata na pozicioniranje i formiranje dodatnih interakcija u aktivnom mestu je izvedeno *docking* studijama, primenom programa *AutoDock Vina*. Validacija izvedene *docking* studije je izvršena poređenjem konformacije liganda iz kokristala sa ciljnim mestom (koja je snimljena primenom

X-ray difrakcije) sa konformacijom iz *docking* proračuna (predviđena konformacija liganda na vezivnom mestu enzima) pri čemu je dobijena vrednost RMSD od 0,71 Å potvrdila uspešno predviđanje. Za vizuelizaciju interakcija ispitivanih jedinjenja sa ciljnim mestom korišćen je računarski program *Discovery Studio Visualizer 2017*. Procena fizičko-hemijskih osobina sintetisanih jedinjenja je izvedena na osnovu topoloških i geometrijskih deskriptora dobijenih primenom softvera *MarvinSketch 19.3*.

Drugi korak u *Ekspermentalnom delu* obuhvatio je sintezu derivata propiofenona i strukturnu analizu sintetisanih jedinjenja. Dat je detaljan pregled reagenasa, opreme i aparata, kao i opis pripreme rastvora koji su korišćeni u sintezi. Za sintezu derivata halkona korišćena je poznata, i u literaturi opisana *Claisen-Schmidt*-ova reakcija. Izbor polaznih *orto*- i *para*-, mono- i di- supstituisanih benzaldehida kao i *orto*- i *para*-, mono- i di- supstituisanih acetofenona je izvršen na osnovu izvedenih *docking* studija. Reakcijom aldolne kondenzacije, iz polaznih jedinjenja dobijeni su supstituisani derivati halkona. Za prečišćavanje sintetisanih jedinjenja korišćena je *dry flash* hromatografija na koloni ili preparativna tankoslojna hromatografija na silikagelu. Jedinjenja su dodatno prečišćena prekrizalizacijom. Fizičko-hemijska karakterizacija sintetisanih jedinjenja je izvršena određivanjem tačke topljenja i primenom instrumentalnih metoda: IC spektroskopija, NMR i MS-MS spektroskopija.

Treći korak istraživanja predstavlja određivanje lipofilnosti derivata propiofenona primenom metode RP-TLC i kompjuterskih metoda. Opisani su reagensi, oprema i aparati, računarski programi, priprema rastvora za hromatografsku analizu, kao i metoda hromatografske analize. Korišćenjem tri RP-TLC sistema (acetonitril/voda, etanol/voda i aceton/voda) izračunati su parametri R_M^0 , S i C_0 na osnovu kojih je procenjeno retenciono ponašanje sintetisanih jedinjenja. Eksperimentalno dobijene vrednosti particionih koeficijenata ($\log P$) su korelisane sa kompjuterski izračunatim $\log P$ vrednostima, koje su dobijene primenom programa *ChemDraw 17* i *MarvinSketch*. Za izračunavanje 1D, 2D i 3D *Chemopy* molekulskih deskriptora korišćen je web program *ChemDes*. Na osnovu QSRR analize formirani su modeli koji predstavljaju korelaciju između odabranog hromatografskog parametra i molekulskih deskriptora. Interpretacija molekulskih deskriptora koji formiraju statistički najrelevantniji model identifikovala je najbitnije strukturne i fizičko-hemijske osobine koje utiču na retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja.

Sledeći korak istraživanja je podrazumevao *in vitro* ispitivanje anti-HIV-1 proteazne aktivnosti sintetisanih halkona primenom fluorimetrijske metode, korišćenjem komercijalno dostupnog kita *SensoLyte® 490 HIV-1 Protease Assay Kit* (fluorimetric) (*AnaSpec*, Fremont, SAD). Dat je prikaz korišćene metode kao i postupak izvođenja enzimske reakcije. Ispitivanja anti HIV-1 proteazne aktivnosti je obuhvatilo sve sintetisane supstituisane derivate halkona i tri komercijalna inhibitora HIV-proteaze (*lopinavir*, *ritonavir* i *darunavir*) (raspon koncentracija od 0,001 do 100 μM).

Peti korak istraživanja u *Eksperimentalnom delu* je obuhvatio QSAR analizu anti-HIV-1 proteazne aktivnosti sintetisanih jedinjenja. Prikazani su korišćeni računarski programi, opisani koraci u formiranju 3-D QSAR modela, kao i validacija modela. *In silico* ispitivanje ADMET osobina je izvedeno pomoću programa *ADMET Predictor 9.5*.

Poslednji, šesti korak istraživanja se odnosio na ispitivanje antioksidativne aktivnosti derivata propiofenona. Ispitivanje i poređenje antioksidativnog potencijala novosintetisanih halkona je izvedeno korišćenjem biološkog materijala - serumskog pula zdravih ispitanika u nativnim uslovima. Prikazane su metode za određivanje sledećih pokazatelja oksidativnog stresa: totalni oksidativni status, TOS; prooksidativno-antioksidativni balans, PAB; pokazatelji antioksidativne zaštite: totalni antioksidativni status, TAS; koncentracija ukupnih sulfhidrilnih grupa, SHG. Prooksidativni i antioksidativni skorovi su računati primenom z-skor statistike prema obrascu: $(X-\mu)/\sigma$, gde su X-vrednost određenog parametra redoks statusa; μ -populaciona srednja vrednost i σ -populaciona standardna devijacija tog parametra određene u serumima zdravih osoba.

Poglavlje **Rezultati i diskusija**, koje prati šest prethodno navedenih koraka eksperimentalnog rada, je prikazano na 78 strana teksta, uključujući 28 slika i 25 tabela. Ovo poglavlje doktorske disertacije je podeljeno na šest potpoglavlja: *Rezultati i diskusija docking-a*; *Rezultati i diskusija sinteze*; *Rezultati i diskusija određivanja lipofilnosti derivata propiofenona primenom RP-TLC i kompjuterskih metoda*; *Rezultati i diskusija in vitro ispitivanja anti-HIV-1 proteazne aktivnosti derivata propiofenona*; *Rezultati i diskusija QSAR studije* i *Rezultati i diskusija ispitivanja redoks aktivnosti derivata propiofenona*. Analiza rezultata i diskusija dobijenih rezultata i postavljenih hipoteza je iznesena na razumljiv način i uz sveobuhvatno poređenje sa podacima dobijenim u sličnim relevantnim naučnim istraživanjima.

U poglavlju **Zaključak** je kroz šest tačaka dat pregled izvedenih zaključaka iz analize dobijenih rezultata u svakom koraku eksperimentalnog rada.

U poglavlju **Literatura** naveden je spisak od 149 referenci citiranih u okviru doktorske disertacije.

2. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Rezultati doktorske disertacije podeljeni su u šest celina, shodno postavljenim ciljevima i u skladu sa načinom izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja.

U *prvom delu* su prikazani rezultati i diskusija *docking-a*. *Docking* eksperimenti su izvedeni pod pretpostavkom da osnovne propiofenonske strukture kao i njihovi derivati ostvaruju interakcije sa konzerviranom aminokiselinskom sekvencom Ala25Gly27Thr26 koja je od značaja za hidrolitičku aktivnost enzima kao i aminokiselinskim sekvencama sa kojima registrovani inhibitori (lopinavir, ritonavir i darunavir) ostvaruju interakcije. Prikazane su hemijske strukture, energije vezivanja, najverovatnije konformacije i orijentacije kao i dominantne interakcije sa izdvojenim aminokiselinskim sekvencama. Preliminarnom *docking* simulacijom potvrđeno je da se sve četiri osnovne propiofenonske strukture vezuju u aktivnom mestu enzima. Izdvojeno je nekoliko aminokiselinskih ostataka: Ile47, Ile50, Ala28 i Val32 sa kojima benzilidenski deo (aromatični prsten A) ostvaruje zajedničke hidrofobne Pi-sigma, Pi-alkil i alkil-alkil interakcije, kod sve četiri osnovne strukture kao i tri registrovana inhibitora. Za razliku od prstena A, koji je nesupstituisan, sve četiri osnovne strukture u položaju C2 prstena B sadrže fenolnu grupu za koju se, u sprovedenim *docking* eksperimentima, pokazalo da je od značaja za građenje vodonične veze sa aminokiselinama *konzervirane* aminokiselinske sekvence (AspA25-ThrA26-GlyA27, odnosno AspB25-ThrB26-GlyB27) aktivnog mesta enzima. U skladu sa dobijenim rezultatima koji su zadovoljili početne ciljeve, u sledećoj fazi *docking* studije ispitan je uticaj supstitucije u prstenu A na pozicioniranje (broj i tip interakcija) četiri osnovne propiofenonske strukture u aktivnom mestu enzima. U *orto-*, *meta-* ili *para-* položaje prstena A uvedene su grupe sa izrazito negativnim induktivnim (-I) efektom (-fluoro i -trifluorometil), izrazito negativnim rezonantnim (-R) efektom (-nitro) i grupe kod kojih su ovi efekti umerenog (-hloro, -metoksi) ili slabog (-metil) intenziteta. Pokazano je da uvođenje grupe sa jakim -I efektom (-CF₃, -F) u prsten A povoljno utiče na formiranje dodatnih interakcija molekula u aktivnom mestu enzima (derivati C1-42-Ch14, C3-23-Ch16, C6-48-Ch4 i C7-20-Ch19). Dalje, pokazano je da grupe sa jakim -R efektom (-NO₂) smanjuju elektronsku gustinu u prstenovima A i B što nepovoljno utiče na formiranje dodatnih interakcija u aktivnom mestu enzima (Ch12 i Ch13). Struktura III, od koje su izvedene preostale tri osnovne strukture, poslužila je za dizajniranje najvećeg broja derivata. U cilju ispitivanja uticaja sternih i elektronskih efekata uvedenih supstituenata na pozicioniranje i interakcije molekula u aktivnom mestu enzima izvedeni su *docking* eksperimenti. Analizom sprovedenih *docking* studija pokazano je da elektronski efekti supstituenata na benzenovim prstenovima A i B osnovne 1,3-difenil propenonske strukture doprinose formiranju dodatnih interakcija sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mestu enzima i stabilizaciji kompleksa halkan-enzim i to:

1. *orto* disupstitucija prstena B fenolnim grupama (kao proton akceptorskim grupama) omogućava građenje vodoničnih veza sa aminokiselinskim ostacima aktivnog mesta;
2. supstitucija prstena A grupama sa jakim -I efektom (-F) kao i voluminoznim grupama sa jakim -I efektom (-CF₃) u velikoj meri doprinosi formiranju halogen interakcija i vodoničnih veza.

Drugi deo prikazuje rezultate sinteze derivata propiofenona. Na osnovu sprovedenih *docking* eksperimenata, a u cilju daljih bioloških ispitivanja, izvršena je sinteza 17 novih mono- i disupstituisanih halkona reakcijom bazno katalizovane aldolne kondenzacije. Sintetisana jedinjenja su prečišćena i izvršena je strukturna analiza primenom metoda IC, NMR i MS-MS spektroskopije, što je i prikazano u ovom delu.

Nakon sprovedenih *docking* studija, sinteze i karakterizacije, ispitano je hromatografsko ponašanje halkona primenom metode RP-TLC u kojoj je stacionarnu fazu predstavljao modifikovani silika gel, dok su mobilnu fazu činila tri dvokomponentna sistema rastvarača (acetonitril/voda, aceton/voda i etanol/voda). Rezultati ovog ispitivanja su prikazani u *trećem delu*. Posle određivanja R_f vrednosti, izračunate su R_M kao i zavisnost izračunatih R_M vrednosti od udela organskog modifikatora. Parametar lipofilnosti R_M^0 određen je ekstrapolacijom R_M vrednosti na nula zapreminskog udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Izračunata je koncentracija organskog modifikatora za koju je raspodela supstance između dve faze jednaka (C_0). Prikazane su vrednosti za nagibe pravih (S), koeficijenti determinacije (R^2), parametar lipofilnosti (R_M^0) i C_0 za sva tri ispitivana hromatografska sistema. Dobijeni rezultati su pokazali statistički značajnu linearnu zavisnost što potvrđuju vrednosti koeficijenata determinacije $R^2 > 0,98$. Visoki koeficijenti korelacije između R_M^0 i S ukazuju da ispitivana jedinjenja formiraju kongenerični skup što znači da na njihovo retenciono ponašanje utiču slični mehanizmi. U svim hromatografskim sistemima primećena je visoka korelacija između R_M^0 i S ($r = 0,87 - 0,97$), što je posledica visokog stepena strukturne sličnosti ispitivanih jedinjenja i može se očekivati da u svakom primenjenom sistemu u kome je stacionarna faza modifikovani silikagel postoje slični mehanizmi odgovorni za interakcije jedinjenja sa stacionarnom fazom (nespecifične hidrofobne interakcije). Na osnovu izračunatih R_M vrednosti ispitivanih jedinjenja u sva tri hromatografska sistema zaključeno je da je retencija ispitivanih jedinjenja najmanja u sistemu u kome je organski modifikator etanol. Pored eksperimentalnog određivanja parametara lipofilnosti, lipofilnost ispitivanih jedinjenja (izražena kao vrednost $\text{Log}P$) je izračunata primenom kompjuterskih programa *ChemDraw 8* (*Viswanadhan LogP*, *Brotto LogP*, *Crippen LogP* i *CLogP*) i *MarvinSketch*. Iako se izračunate $\text{Log}P$ vrednosti za jedno isto jedinjenje međusobno razlikuju (posledica primene različitih algoritama koji su inkorporirani u kompjuterskim programima), dobijene vrednosti za koeficijent korelacije, koje su se kretale u opsegu od 0,96 do 1,00, ukazuju na visok stepen slaganja između izračunatih vrednosti $\text{Log}P$. Da bi se ustanovilo koji hromatografski sistem je najpouzdaniji za dobijanje parametara koji opisuju lipofilnost jedinjenja (R_M^0 , C_0 i S) izvršena je komparacija izračunatih $\text{Log}P$ vrednosti sa eksperimentalno određenim parametrima, za sva tri hromatografska sistema. Najveći stepen slaganja postoji između izračunatih $\text{Log}P$ vrednosti i C_0 vrednosti za hromatografski sistem acetonitril/voda (r vrednost od 0,80 do 0,84), pa je zaključeno da se jednačina koja opisuje ovu zavisnost može upotrebiti za predviđanje retencije novih halkona. Za dalje detaljnije proučavanje odnosa između strukture i retencije kongenerisanih halkona odabran je sistem acetonitril/voda kao najpouzdaniji. U cilju formiranja modela koji bi na najbolji način kvantitativno opisao vezu između C_0 (parametar lipofilnosti) i molekulskih deskriptora koji bi se mogli koristiti u predviđanju lipofilnosti nosintetisanih halkona upotrebljene su različite regresione analize MLR, PLS i SVM. Formirana su tri QSRR modela. Vrednosti C_0 , određene u RP-TLC sistemu acetonitril/voda su korišćene kao zavisno promenljive, dok nezavisno promenljive predstavljaju odabrani molekularski deskriptori. Izračunati statistički parametri, $r = 0,83$, $R^2_{\text{pred}} = 0,94$, $Q^2 = 0,68$ ukazuju da formirani SVM (C_0) model u poređenju sa MLR(C_0) i PLS(C_0) modelima pokazuje najbolju moć predviđanja i zaključeno je da se kao takav može koristiti za predviđanje retencije i

lipofilnosti novih strukturno sličnih jedinjenja. Za formiranje SVM (C_0) modela odabrana su tri deskriptora: bcutp8, ATSp4 i kappam2.

U četvrtoj delu **Rezultati i diskusija** prikazani su rezultati *in vitro* ispitivanja anti-HIV-1 proteazne aktivnosti. Za odabir halkona koji su korišćeni za ispitivanje aktivnosti postavljen je kriterijum: $E_v \geq 8,0$ kcal. Ispitivanje inhibitornog delovanja novosintetisanih halkona prema HIV-1 proteazi obuhvatalo je tri faze. Istraživanje je započeto tzv. preliminarnom fazom u kojoj je ispitana aktivnost 20 odabranih halkona i 3 registrovana inhibitora (lopinavir, ritonavir i darunavir) u tri koncentracije od $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ i $100 \mu\text{M}$. Cilj preliminarne faze je bio da se ispita potencijal inhibitorne aktivnosti halkona i izdvoje oni koji inhibiraju aktivnost proteaze približno 50%. Rezultati eksperimenata su pokazali da 19 ispitivanih halkona pokazuju zadovoljavajuću aktivnost u koncentraciji od $1 \mu\text{M}$, dok je halkan C11-51-Ch9 zadovoljavajuću aktivnost postigao u koncentraciji od $10 \mu\text{M}$. Sledeća faza ispitivanja obuhvatila je ispitivanje aktivnosti pomenutih 19 halkona u koncentracijama od 0,01; 0,10; 0,50; 1,00 i $10,00 \mu\text{M}$. Od 19 ispitivanih jedinjenja inhibiciju od približno 50% enzimske aktivnosti je pokazivalo šest halkona u koncentraciji od $0,01 \mu\text{M}$, šest u koncentraciji od $0,10 \mu\text{M}$ dok su ostali halkoni isti efekat pokazivali u koncentraciji od $1,00 \mu\text{M}$. Ispitana je aktivnost halkona: C1-42-Ch1, C9-54-Ch21, C10-26-Ch22, C14-18-Ch24, C13-52-Ch6, C8-22-Ch20, kao i 3 registrovana inhibitora i pri 10 puta nižoj koncentraciji od $0,001 \mu\text{M}$. Od 6 ispitivanih halkona, samo je halkan C1-42-Ch1 pokazao bolju aktivnost u koncentraciji od $0,001 \mu\text{M}$. Pokazano je da je kod preostalih 5 halkona inhibitorna aktivnost u koncentraciji $0,001 \mu\text{M}$ slabija nego pri koncentraciji od $0,010 \mu\text{M}$. Dobijeni rezultati pokazuju da *orto* disupstitucija prstena B 1,3-difenil-2-propen-1-onske strukture fenolnim grupama, kao i disupstitucija prstena A fluoro grupama doprinose inhibitornoj aktivnosti halkona. Fluor je mali atom koji je sličnog dijametra kao i vodonik i ne predstavlja sternu smetnju, ali zbog svoje visoke elektronegativnosti doprinosi ostvarivanju jakih halogen interakcija i vodoničnih veza u aktivnom mestu enzima, a time i inhibitornom efektu halkona. Rezultati ukazuju da je osnovna struktura II obećavajuća struktura za modifikacije i dalje istraživanje u području anti-HIV-1 proteazne aktivnosti halkona.

U cilju identifikacije najvažnijih strukturnih karakteristika koje su odgovorne za anti-HIV-1 proteaznu aktivnost sintetisanih halkona sprovedene su 3D-QSAR studije čiji rezultati su prikazani u *petom delu*. Izračunavanjem GRIND deskriptora iz molekulskih polja interakcija započeto je formiranje 3D-QSAR modela. Kao nezavisno promenljive vrednosti (x) korišćeni su molekulski deskriptori, dok je zavisno promenljiva (y) predstavljala negativan dekadni logaritam inhibitorne aktivnosti halkona (pIC_{50}). Dobijene vrednosti statističkih parametara $R^2 = 0,91$; $Q^2 = 0,55$; $\text{RMSEE} = 0,564$; $\text{RMSEP} = 0,871$; $R^2_{\text{pred}} = 0,677$ potvrđuju da formirani 3D-QSAR model ima dobru moć predviđanja i da se kao takav može primeniti u dizajniranju novih jedinjenja sa boljom inhibitornom aktivnošću. Parametri r^2_m , r'^2_m , r^2_m (vrednost veća od 0,5) i parametar Δr^2_m (vrednost manja od 0,2), kao parametri čije vrednosti predstavljaju najstrožiji kriterijum eksterne validacije, dodatno potvrđuju kvalitet formiranog modela. Na osnovu rezultata 3D-QSAR studije sintetisanih halkona izdvojene su pozitivne varijable koje pokazuju najveći uticaj na aktivnost jedinjenja: v187 (TIP-TIP), koja definiše rastojanje između supstituenata na benzenovim prstenovima A i B i varijabla v466 (N1-TIP) koja definiše udaljenost između keto grupe (kao akceptora vodonične veze) i sternog centra na benzenovom prstenu A (vodonik ili supstituent). Pokazano je da se varijable koje optimalno opisuju kreirani model formiraju gotovo kod svih jedinjenja data seta u jonizovanom i nejonizovanom obliku, ali sa razlikama koje su kvantitativne prirode (vrednosti varijabli). Dobijene dve varijable (v466 (N1-TIP), v187 (TIP-TIP)) ukazuju na moguće strukturne modifikacije koje potencijalno vode ka dizajniranju aktivnijih jedinjenja. Najaktivnije jedinjenje iz data seta (C1-42-Ch14) poslužilo je kao *lead* jedinjenje za dizajniranje novih derivata halkona koji bi pokazivali bolju inhibitornu aktivnost prema HIV-1 proteazi. U dizajniranju su upotrebljene dve strategije:

1. Supstitucija sternog centra, vodonikovog atoma u *para* položaju prstena B koji učestvuje u formiranju pozitivne varijable v187 (TIP-TIP) (R_1 supstituent);

2. Modifikacija trifluorometil grupe koja učestvuje u formiranju pozitivnih varijabli v187 (TIP-TIP) i v466 (N1-TIP). Modifikacija podrazumeva promenu položaja i/ili supstituciju trifluorometil grupe grupama koje će potencirati formiranje pozitivnih varijabli (v187 (TIP-TIP) i v466 (N1-TIP)), ali istovremeno sprečiti formiranje varijable v158 (TIP-TIP) sa negativnim uticajem na aktivnost (supstituent R₂ i R₃).

Podaci dobijeni za sve dizajnirane strukture nalaze se unutar definisanog domena primenljivosti kreiranog 3D-QSAR modela. U cilju odabira jedinjenja sa povoljnim farmakokinetičkim profilom kao potencijalnog kandidata za buduće lekove korišćen je program *ADMET predictor*. Izračunate su ADMET osobine jedinjenja data seta kao i dizajniranih jedinjenja. Analizom rezultata dobijenih za dizajnirana jedinjenja i poređenjem sa rezultatima dobijenim za najaktivnije jedinjenje C1-42-Ch14 došlo se do sledećih zaključaka:

- Dizajnirana jedinjenja kao i *lead* jedinjenje C1-42-Ch14 nisu supstrati za PGP;
- Rizik od oksidacije enzimima iz grupe *CYP450* za jedinjenja: D1, D2 i D8 je veći u odnosu na *lead* jedinjenje;
- Potencijalna konkerogenost (*MUT_Rizik*), kao i toksičnost (*TOX_Rizik*) daleko je manja kod dizajniranih jedinjenja, sa izuzetkom jedinjenja F3;
- Kardiotoksičnost dizajniranih jedinjenja nije uočena sa izuzetkom jedinjenja D5;
- Za razliku od *lead* jedinjenja, jedinjenja: D1, D2, D3, D4, D5, D7, D8 i F2 ne zadovoljavaju sva pravila po Lipinskom;
- Na osnovu predviđenih ADMET osobina dizajnirana jedinjenja: D6, D9, E1, E2, E3, E4, F1 i F4 su izdvojena kao potencijalni kandidati za buduću sintezu i biološka ispitivanja.

U poslednjem, *šestom delu*, prikazane su izračunate vrednosti parametara oksidativnog stresa: totalni oksidativni status, TOS; prooksidativno-antioksidativni balans, PAB; kao i pokazatelja antioksidativne zaštite: totalni antioksidativni status, TAS; koncentracija ukupnih sulfhidrilnih grupa, SHG, u uzorcima sa i bez dodatka oksidansa (TBH). Takođe, prikazane su i vrednosti oksidativnog skorova za ispitivana jedinjenja. Najniže vrednosti oksidativnog skora kod jedinjenja: C4-27-Ch17, C1-42-Ch14, C5-32-Ch18, C10-26-Ch-22 (derivati osnovne strukture II) su objašnjene povećanjem elektronske gustine u molekulu usled prisustva grupa sa pozitivnim rezonantnim i induktivnim efektima (dodatna fenolna grupa u *orto* položaju), što pojačava njihove antioksidativne sposobnosti. Antioksidativne osobine ovih jedinjenja objašnjene su prisustvom α , β -nezasićenog ketona i fenolnih grupa. Ista jedinjenja su pokazala i najbolju anti-HIV proteaznu aktivnost. Rezultati dobijeni u *in vitro* studijama i *docking* eksperimentima ukazuju da upravo *orto* disupstitucija prstena B 1,3-difenil-2-propen-1-onske strukture fenolnim grupama doprinosi i inhibitornoj aktivnosti halkona. Vrednosti oksidativnog skorova su bile veće u slučajevima postojanja većeg broja halogena u samoj strukturi halkona (C12-17-Ch23, C9-54-Ch21, C16-14-Ch25), što je objašnjeno time da grupe koje smanjuju elektronsku gustinu u molekulu umanjuju i antioksidativni potencijal halkonskog derivata. Jedinjenje C16-14-Ch25 koje ima jednu od najvećih vrednosti oksidativnog skora ujedno pokazuje i najslabiju inhibitornu aktivnost.

3. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Od izbijanja epidemije AIDS-a, ogromni naponi naučne zajednice su usmereni na razvoj antivirusnih lekova, posebno onih koji deluju na HIV tip 1 (HIV-1). U to vreme mogućnosti za antivirusnu terapiju bile su ograničene: postojao je amantadin protiv virusa gripa A i nukleozidni analog aciklovir protiv herpes virusa, ali još uvek nisu otkriveni lekovi za antiretrovirusnu terapiju (1). Identifikacija HIV retrovirusa i akumulirano znanje o ulozi različitih elemenata u njegovom životnom ciklusu naveli su istraživače širom sveta da razvijaju inhibitore koji su imali za cilj inhibiciju virusnih enzima koji se isključivo eksprimiraju virusom i koji nisu prisutni u ljudskom genomu. Prvi u nizu enzima za koje su otkriveni inhibitori bili su reverzna transkriptaza (RT) i integraza (IN) a prvi uvedeni nukleozidni antiretrovirusni lek bio je

zidovudin (AZT). Otkriće zidovudina brzo su pratili i drugi nukleozidni analozi poput didanozina (ddI), stavudina (d4T) i lamivudina (3TC).

Međutim, lečenje nukleozidnim inhibitorima nije dovelo do dugotrajne supresije virusne replikacije, već do brzog razvoja rezistencije (1). Činjenica da je virus rezistentan na primenu samo jedne grupe lekova usmerila je terapiju ka aditivnoj i sinergističkoj kombinaciji lekova. Antiretrovirusna terapija je dodatno poboljšana razvojem nenukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze (NNRTI) sredinom 1990-ih (2).

Sledeći kritični korak koji je otkriven u životnom ciklusu HIV-a, a koji je poslužio kao ciljno mesto dejstva novih lekova, bio je proteolitičko cepanje prekursora polipeptida u zrele enzime i strukturne proteine, tj. procesa katalizovanih enzimom HIV proteaza. Pokazalo se da nezrele virusne čestice koje sadrže katalitički neaktivnu proteazu ne mogu sazrevati u infektivni oblik. Neophodnost ovog enzima u životnom ciklusu virusa činilo ga je obećavajućom metom za terapiju HIV infekcije (3). Prvi odobreni inhibitor HIV proteaze bio je sakvinavir, što je dovelo do značajnog proširenja antiretrovirusne terapije. Kombinovana terapija dva nukleozidna analoga sa inhibitorima proteaze ili NNRTI dala je nadu da će se uspostaviti imunitet kod većine pacijenata. Međutim, ovakav pristup ima izvesna ograničenja koja se ogledaju u velikom broju tableta koje pacijent uzima i, posledično, pojavom brojnih neželjenih efekata (4).

Antiretrovirusni lekovi koji se danas koriste za lečenje HIV infekcije se, prema ciljnom mestu dejstva dele u šest glavnih grupa: inhibitori reverzne transkriptaze; nukleozidni i nenukleozidni inhibitori; inhibitori proteaze; inhibitori integraze; inhibitor fuzije (enfuvirtid) i antagonist hemokinih receptora 5 (maravirok) (5). Američka Uprava za hranu i lekove (FDA) je odobrila 26 anti-HIV jedinjenja od kojih su deset inhibitori HIV proteaze.

Temeljna istraživanja molekularne strukture HIV proteaze omogućila su razvoj inhibitora koji se vezuju za aktivno mesto enzima (6). HIV proteaza cepa virusne poliproteine na manje funkcionalne proteine i na taj način omogućava formiranje zrelih virusnih čestica. Strukturno, HIV proteaza je simetrični homodimer koji se sastoji od dva identična nekovalentno vezana polipeptida sastavljena od 99 aminokiselina. Svaki monomer sadrži konzerviranu sekvencu od tri aminokiselinska ostatka (Asp25-Thr26-Gly27) s aspartil grupom koja ima važnu ulogu u reakciji katalize. Aktivno mesto enzima smešteno je na dodirnoj površini dve podjedinice.

Inhibitori HIV-1 proteaze se mogu podeliti u dve grupe: inhibitori prve generacije - peptidomimetici koji pokazuju sličnost sa supstratom: sakvinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir i amprenavir; i inhibitori druge generacije: fosamprenavir, lopinavir, atazanavir, darunavir i tipranavir. Inhibitori proteaze se primenjuju zajedno sa malim dozama ritonavira, kao farmakokinetičkog „pojačivača“, kojim se prevazilaze njihovi farmakokinetički nedostaci, što dovodi i do smanjenja razvoja rezistencije (7).

Trenutno se kao najefikasnija terapija AIDS-a primenjuje kombinovana terapija inhibitora HIV proteaze, inhibitora reverzne transkriptaze i/ili inhibitora integraze, tzv. visoko aktivna antiretrovirusna terapija (HAART). Kombinacija tri (ili više) lekova ima za cilj: postizanje sinergizma između različitih jedinjenja koja deluju na različita ciljna mesta dejstva; smanjenje pojedinačne doze leka kako bi se smanjili njihovi toksični neželjeni efekti; i smanjenje verovatnoće razvoja rezistencije na lekove.

I pored navedenog postoji stalna potreba za razvojem bezbednijih i jeftinijih lekova, efikasnih protiv multirezistentnih sojeva virusa, sa visokim antivirusnim dejstvom, boljim farmakokinetičkim svojstvima i sa kojima se postiže bolja komplijansa koja se ogleda u ređem doziranju i manjem ispoljavanju neželjenih dejstava. Kako su inhibitori HIV proteaze lipofilna jedinjenja koja imaju malu bioraspoloživost i kratko biološko poluvreme eliminacije, osnovni ciljevi u razvoju inhibitora HIV proteaze su povećanje hidrofilitnosti, bioraspoloživosti, povećanje metaboličke stabilnosti i razvoj novih lekova protiv multirezistentnih sojeva.

Istraživanje koje je prikazano u okviru ove doktorske disertacije ima za cilj sintezu novih nepeptidnih jedinjenja, derivata propiofenona (halkona) koji pokazuju anti-HIV-1 proteaznu aktivnost. Halkoni su prirodni propiofenonski derivati rasprostranjeni u voću, povrću, čajevima. Nastaju u biljkama kao intermedijeri u sintezi flavonoida koja se odvija pod dejstvom enzima

halkon-sintaze, ali se mogu dobiti i polu- ili totalnom sintezom, reakcijom aldolne kondenzacije (*Claisen-Schmidt*-ova reakcija). Hemijski gledano, halkoni predstavljaju *seco* flavonoidne strukture kod kojih su dva aromatična prstena povezana preko α,β -nezasićenog ketonskog mosta. Derivati su 1,3-diaril-2-propen-1-ona (8).

Dugogodišnja naučna istraživanja su pokazala da halkoni pokazuju različitu biološku aktivnost: antiinflamatornu (9), antioksidativnu (10), antibakterijsku (11,12), fungicidnu (13), antiproliferativnu (14), tuberkulostatsku (15). Noviji literaturni podaci pokazuju da postoje i druga dejstva halkona kao što su antikancerogena (16), antiprotozoična (17), antiulkusna (18).

Zbog velike biološke aktivnosti halkoni su postali predmet stalnog interesovanja kako u akademskoj zajednici, tako i u industriji (19, 20). Na osnovu strukture halkona razvijena su i sintetisana jedinjenja različitog delovanja za koja su klinička ispitivanja pokazala da postižu zadovoljavajuću koncentraciju u plazmi i da nisu toksična. Međutim, veliki deo farmakološkog potencijala halkona još uvek nije iskorišćen zbog čega se intenzivno proučava mehanizam delovanja halkona, odnos strukture i aktivnosti i farmakološki skrining prirodnih i sintetskih halkona (21).

Literaturni podaci upućuju na zaključak da halkoni pokazuju antivirusnu aktivnost prema različitim virusima, kao što su virus hepatitisa C (HCV) i *Tobacco mosaic* virus (TMV) (22). Ako se analiziraju dostupni literaturni podaci vezani za anti-HIV-1 proteaznu aktivnost halkona i uporede sa podacima vezanim za druge biološke aktivnosti (antiproliferativnu, antimikrobnu, antioksidativnu i sl.) može se zaključiti da je antivirusna aktivnost znatno manje proučavana i publikovana.

Prva istraživanja anti-HIV-1 proteazne aktivnosti halkona su započeta sa jedinjenima dobijenim iz prirodnih izvora. Tako su Wu i saradnici (23) ispitivali anti HIV aktivnost prirodnih halkona sa metoksi grupom u aromatičnom prstenu iz roda *Desmos* ($EC_{50} = 0,022$ g / ml), dok su Cheenpracha i saradnici opisali aktivnost 2',4',6'-trihidroksihidrohalkona koji je izolovan iz rizoma *Boesenbergia pandurata* (24). Sinteza i ispitivanje anti-HIV aktivnosti novih supstituisanih halkona je predmet radova poslednjih godina (25). Novi derivati halkona su ispitivani kao nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (26). U priloženoj disertaciji opisana je sinteza 17 novih mono- ili di- supstituisanih halkona reakcijom bazno katalizovane aldolne kondenzacije. Strukture sintetisanih jedinjenja su potvrđene IC, NMR i MS-MS spektroskopijom. Značaj ove doktorske disertacije se ogleda u sintezi i ispitivanju derivata halkona kao potencijalnih inhibitora HIV-1 proteaze koji nisu opisani u literaturi.

Halkoni takođe spadaju u neenzimske antioksidanse, a njihov antioksidativni potencijal je u direktnoj vezi sa strukturom. Osobine i položaj supstituenata na aromatičnim prstenovima utiču na stepen antioksidativnog efekta. Fenolna grupa je jedna od ključnih funkcionalnih grupa koja u velikoj meri pojačava antioksidativnu aktivnost halkona što se objašnjava lakom konverzijom u odgovarajuće fenoksi radikale putem mehanizma prenosa atoma vodonika. Tako su Rezk i saradnici opisali mehanizam antioksidativne aktivnosti floretina (dihidrohalkonskog flavonoida) (27). Mnogi hidroksihalkoni sa izoprenil supstituentima na benzenovim prstenovima takođe pokazuju antioksidativnu aktivnost. Jedno od takvih jedinjenja je 3-hidroksiksantoangelol, izolovan iz plodova *Artocarpus nobilis*, koji je pokazao jaču sposobnost da vezuje radikale u odnosu na α -tokoferol. Ksantoangelol B i ksantokeizmini A, B i C, izolovani iz stabljika *Angelica keiskei*, pokazuju jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na resveratrol (21). Značajan doprinos disertacije predstavlja ispitivanje i potvrda antioksidativne aktivnosti novih jedinjenja što je u saglasnosti sa literaturnim podacima.

S obzirom da se HIV replicira u visoko oksidovanom okruženju i da je oksidativni stres uključen u patogenezu AIDS, antioksidativna aktivnost halkona je od višestrukog potencijalnog značaja u terapiji HIV-a. Istraživanja su pokazala neuravnoteženost u redoks statusu ispitanika tokom infekcije HIV-om. Friis-Moller i saradnici su pokazali smanjen nivo antioksidanasa u serumu i tkivu i povećanu koncentraciju proizvoda peroksidacije. Zabeleženo je smanjenje koncentracije glutaciona, superoksid dismutaze i porast koncentracije malondialdehida (28). Sonneborg i saradnici su takođe pokazali povećanje koncentracije malondialdehida kod

pacijenata inficiranih HIV-om (29). Pored brojnih neželjenih efekata koje sa sobom nosi, potvrđeno je da HAART povećava oksidativni stres (30). Otuda se javila potreba za razvojem antioksidativne adjuvantne terapije za pacijente sa HIV infekcijom.

U postupku ispitivanja supstituisanih derivata halkona koji pokazuju anti-HIV aktivnost ovo istraživanje se baziralo na *docking* studijama. Ispitivanje aktivnosti derivata halkona primenom *docking* studija je opisano u literaturi (31). Burmaoglu i saradnici (32) su primenili *docking* studiju za ispitivanje vezivanja bis-halkonskih derivata za aktivno mesto enzima ksantinoksidaza. Primena *docking* studija za ispitivanje antibakterijske i antioksidativne aktivnosti sintetisanih derivata halkona (33), antimalarijske aktivnosti halkona i flavonoida (34) kao i primena *dockinga* u razvoju novih inhibitora reverzne transkriptaze je takođe opisana u literaturi (35).

Doprinos ove doktorske disertacije se ogleda u primeni *docking* studija u ispitivanju anti-HIV-1 proteazne aktivnosti halkona. Analizom sprovedenih *docking* studija zaključeno je da elektronski efekti supstituenata na benzenovim prstenovima A i B osnovne 1,3-difenilpropenonske strukture doprinose formiranju dodatnih interakcija sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mestu enzima i stabilizaciji kompleksa halkon-enzim i to:

1. *orto* disupstitucija prstena B fenolnim grupama kao proton akceptorskim grupama, koje grade vodonične veze sa aminokiselinskim ostacima aktivnog mesta, što ide u prilog podatku da povećanje broja vodoničnih veza smanjuje mogućnost mutacija virusa (36, 37).
2. supstitucija prstena A grupama sa jakim -I efektom (-F) kao i voluminoznim grupama sa jakim -I efektom (-CF₃) u velikoj meri doprinosi formiranju halogen interakcija i vodoničnih veza.

Da bi se razjasnili farmakodinamski mehanizmi, kao i farmakokinetičke osobine nosintetisanih jedinjenja značajno je poznavanje fizičko-hemijske osobine među kojima jednu od značajnijih uloga ima lipofilnost molekula. Određivanje lipofilnosti halkona primenom RP-HPLC (38), kao i RP-TLC metode (39) je opisano u literaturi. Kako lipofilnost ima važnu ulogu u transportu molekula kroz biološke sisteme i može uticati na formiranje kompleksa između samog molekula i ciljnog mesta dejstva u priloženoj doktorskoj disertaciji ispitana je i određena lipofilnost nosintetisanih jedinjenja što predstavlja doprinos postojećim znanjima o derivatima propiofenona.

Uvidom i literaturne podatke zaključeno je da postoje radovi u kojima su opisane 3D-QSAR studije derivata halkona, flavonoida i biflavona (40). Sharma i saradnici (41) su primenili 3D-QSAR studije na derivatima halkona kao potencijalnim inhibitorima HIV-1 integraze. 3D-QSAR modeli koji su korišćeni u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali dobru moć predviđanja i predstavljaju dobru osnovu za dizajniranje novih jedinjenja koja pokazuju bolju inhibitornu aktivnost.

CITIRANA LITERATURA:

1. German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut). 'Human Immunodeficiency Virus (HIV)' Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie. 2016;43(3):203–222
2. Grob PM, Wu JC, Cohen KA, Ingraham RH, Shih CK, Hargrave KD et al. Nonnucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase: nevirapine as a prototype drug. AIDS Res Hum Retroviruses. 1992;8:145–152
3. Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RA et al. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85:4686–4690

4. Cohen J. AIDS therapy: failure isn't what it used to be...but neither is success. *Science*. 1998;279:1133–1134
5. Sierra S, Walter H. Targets for Inhibition of HIV Replication: Entry, Enzyme Action, Release and Maturation. *Intervirology*. 2012;55:84–97
6. Zhengtong Lv, Yuan Chu, Yong Wang. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV AIDS*. 2015;7:95–104
7. Pokorná J, Machala L, Řezáčová P, Konvalinka J. Current and Novel Inhibitors of HIV Protease. *Viruses*. 2009;1(3):1209–1239
8. Sahu NK, Balbhadra SS, Choudhary J, Kohli DV. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Curr Med Chem*. 2012;19:209–225
9. Chen YF, Wu SN, Gao JM, Liao ZY, Tseng YT, Fülöp F et al. The Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Properties of the Synthetic Chalcone Derivative AN07. *Molecules*. 2020;24:25(12):2907
10. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed. Oxford: Clarendon Press. 2015
11. Ansari FL, Nazir S, Noureen H, Mirza B. Combinatorial synthesis and antibacterial evaluation of an indexed chalcone library. *Chem Biodivers*. 2005;2(12):1656-1664
12. Solankee A, Lad S, Solankee S, Patel G. Chalcones, pyrazolines and aminopyrimidines as antibacterial agents. *Indian Journal of Chemistry B*. 2009;48(10):1442–1446
13. Lahtchev KL, Batovska DI, Parushev SP, Ubiyvovk VM, Sibirny AA. Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. *Eur J Med Chem*. 2008;43(10):2220-2228
14. Hiroshimi S, Yoshiko M, Mineko T, Satoshi Y, Yoshihiro U, Naruhiko I et al. Quantitative Structure–Cytotoxicity Relationship of Chalcones. *Anticancer Res*. 2017;37(3):1091-1098
15. Lin YM, Zhou Y, Flavin MT, Zhou LM, Nie W, Chen FC. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorg Med Chem*. 2002;10(8):2795-2802
16. Mateeva N, Eyunni SVK, Redda KK, Ononuju U, Hansberry TD, Aikens C et al. Functional evaluation of synthetic flavonoids and chalcones for potential antiviral and anticancer properties. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017;27(11):2350-2356
17. García E, Coa J, Otero E, Carda M, Vélez I, Robledo S et al. Synthesis and antiprotozoal activity of furanchalcone–quinoline, furanchalcone–chromone and furanchalcone–imidazole hybrids. *Medicinal Chemistry Research*. 2018;27:497–511
18. Sashidhara KV, Avula, SR, Mishra V, Palnati GR, Singh LR, Singh N et al. Identification of quinoline-chalcone hybrids as potential antiulcer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;89:638–653
19. Batovska DI, Todorova IT. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Review Curr Clin Pharmacol*. 2010;5(1):1-29
20. Sahu NK, Balbhadra SS, Choudhary J, Kohli DV. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Curr Med Chem*. 2012;19(2):209-225
21. Matos MJ, Vazquez-Rodriguez S, Uriarte E, Santana L. Potential pharmacological uses of chalcones: a patent review (from June 2011 - 2014). *Review Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(3):351-366
22. Wan Z, Hu D, Li P, Xie D, Gan X. Synthesis, Antiviral Bioactivity of Novel 4-Thioquinazoline Derivatives Containing Chalcone Moiety. *Molecules*. 2015;20(7):11861–11874
23. Wu JH, Wang XH, Yi YH, Lee KH. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus *Desmos*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13(10):1813-1815
24. Cheenpracha S, Karalai C, Ponglimanont C, Subhadhirasakul S, Tewtrakul S. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. *Bioorg Med Chem*. 2006;14:1710-1714

25. Cole AL, Hossain S, Cole AM, Phanstiel O. Synthesis and bioevaluation of substituted chalcones, coumaranones and other flavonoids as anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem.* 2016;24(12):2768-76.
26. Al-Hazam HA, Al-Shamkani ZA, Al-Masoudia NA, Saeed BA, Pannecouque C. New chalcones and thiopyrimidine analogues derived from mefenamic acid: microwave-assisted synthesis, anti-HIV activity and cytotoxicity as antileukemic agents. *Z. Naturforsch.* 2017;72(4)b: 249–256
27. Rezk BM, Haenen GRM, van der Vijgh WJ, Bast A. The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2002;295(1):9–13
28. Friis-Moller N, Reiss P, Sabin CA. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2007;356:1723-1735
29. Sonnerborg A, Carlin G, Akerlund B, Jarstrand C. Increased Production of Malondialdehyde in Patients with HIV Infection. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* 1988;20:287-290
30. Gil del Valle L, Hernández RG, Ávila JP. Oxidative stress associated to disease progression and toxicity during antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infection. *J Virol. Microbiol.* 2013
31. Mowlana MY, Jamal Abdul Nasser A. Synthesis and Molecular Docking studies of Heterocyclic Chalcone Derivatives as BRCA1 inhibitors. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry.* 2015;5(6):196-200
32. Burmaoglu S, Ozcan S, Balcioglu S, Gencel M, Abbas Ali Noma S, Essiz S et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of bis-chalcone derivatives as xanthine oxidase inhibitors and anticancer agents. *Bioorganic Chemistry.* 2019;91:103149
33. Sayed Alam M, Rahman SMM, Lee D-U. Synthesis, biological evaluation, quantitative-SAR and docking studies of novel chalcone derivatives as antibacterial and antioxidant agents. *Chemical Papers.* 2015;69 (8):1118–1129
34. Thillainayagam M, Malathi K, Ramaiah S. In-Silico molecular docking and simulation studies on novel chalcone and flavone hybrid derivatives with 1, 2, 3-triazole linkage as vital inhibitors of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase. *J Biomol Struct Dyn.* 2018;36(15):3993-4009
35. Tarasova O, Poroikov V, Veselovsky A. Molecular Docking Studies of HIV-1 Resistance to Reverse Transcriptase Inhibitors: Mini-Review. *Molecules.* 2018;23:1233
36. Ghosh AK, Osswald HL, Prato G. Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2016;59(11):5172–5208
37. Weber IT, Kneller DW, Wong-Sam A. Highly resistant HIV-1 proteases and strategies for their inhibition. *Future Med Chem.* 2015;7(8):1023–1038
38. Bašić J, Ivković B, Stevanović S, Lazarević A, Vujić Z. Determination of the lipophilicity of 2'-hydroxychalcones by RP HPLC method. *Hem. ind.* 2016;70(5):511–518
39. Rozmer Z, Perjési P, Takács-Novák K. Use of RP-TLC for determination of log *P* of isomeric chalcones and cyclic chalcone analogues. *JPC.* 2007;19(108):124–128
40. Mercader GA, Pomilio BA. 2D- and 3D-QSAR Studies of Flavonoids, Biflavones and Chalcones: Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antimycobacterial Activities. *Anti-Infective Agents.* 2012;10(1):41–54
41. Sharma H, Patil S, Sanchez TW, Neamati N, Schinazi RF, Buolamwini JK. Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR studies of 3-keto salicylic acid chalcones and related amides as novel HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2011; 19(6):2030–2045

4. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21):

1. Janković T, **Turković N**, Kotur-Stevuljević J, Vujić Z, Ivković B. Differences in antioxidant potential of chalcones in human serum: In vitro study. *Chemico-Biological Interactions*. 2020; 324: 109084
DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109084

Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22):

2. **Turković N**, Ivković B, Kotur-Stevuljević J, Tasić M, Marković B, Vujić Z. Molecular Docking, Synthesis and anti-HIV-1 protease Activity of Novel Chalcones. *Current Pharmaceutical Design*. 2020; 26(8): 802-814
DOI: 10.2174/1381612826666200203125557

Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima (M23):

3. Dobričić V, **Turković N**, Ivković B, Csuvik O, Vujić Z. Evaluation of the lipophilicity of chalcones by RP-TLC and computational methods. *JPC-J Planar Chromat*. 2020; 33: 245-253
DOI: 10.1007/s00764-020-00029-w

Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima štampani u izvodu (M34):

1. **Turković N**, Ivković B, Dimitrijević B, Kovačević I, Novaković R, Dragović Lukić G, Vujić Z. Validation of RP HPLC method for quantitative analysis of antiretrovirals drugs in human plasma samples, The 40th Symposium chromatographic methods of investigating the organic compounds, Katowice - Szczyrk, Poland, May 23rd - 26th, 2017.
2. Ivković B, **Turković N**, Marković M, Vujić Z. Synthesis and biological activity of propionophenone derivatives, VII Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, *Zajedno stvaramo budućnost farmacije*, Beograd, Srbija, 10-14. oktobar 2018.
3. **Turković N**, Tasić M, Ivković B, Kotur-Stevuljević J, Vujić Z. *In silico* and *in vitro* testing of anti-HIV protease activity of newly synthesized propiophenone derivatives. Kongres farmaceuta u Bosni i Hercegovini sa međunarodnim učešćem, Sarajevo, Federacija Bosne i Hercegovine, 10-13. oktobar 2019.
4. **Turković N**, Ivković B, Marković B, Božović Ž, Vujić Z. Docking studies of new HIV-1 protease inhibitors. The Third Congress of Pharmacists of Montenegro with International Participation, Bečići, Budva, Crna Gora, 9-12. maj 2019. S244

5. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Predmet naučnog istraživanja doktorske disertacije je dizajniranje, sinteza i *in vitro* ispitivanja derivata propiofenona (halkona) kao potencijalnih inhibitora enzima HIV-1 proteaze.

Iako danas postoji preko 20 anti-HIV lekova koji se primenjuju u terapiji, poznato je da postojeći lekovi pokazuju lošu farmakokinetiku, nedovoljnu biodistribuciju, hemijski su

nestabilni i ispoljavaju neželjene efekte koji često dovode do prekida terapije. Zbog toga terapija AIDS-a zahteva sintezu novih jedinjenja koja će biti efikasnija i bezbednija.

Sagledavajući prikazane rezultate i priloženu tezu u celini, može se zaključiti da je kandidat izveo sveobuhvatno istraživanje koje se ogleda u dizajniranju, sintezi i karakterizaciji novih jedinjenja, potencijalnih inhibitora HIV proteaze. Naučni doprinos doktorske disertacije je, pored određivanja anti-HIV proteazne aktivnosti i uporedna analiza antivirusne aktivnosti sa komercijalno dostupnim preparatima. Sistematičnim i detaljnim proučavanjem derivata halkona kandidat je dao značajan doprinos daljem razumevanju ove grupe jedinjenja.

Veliki doprinos doktorske disertacije predstavljaju rezultati dobijeni u delu istraživačkog rada koji se odnosi na *docking*, koji predstavlja osnovu ispitivanja supstituisanih derivata halkona sa anti-HIV dejstvom. Pokazano je da elektronski efekti supstituenata na benzenovim prstenovima A i B osnovne 1,3-difenil propenonske strukture doprinose formiranju dodatnih interakcija sa aminokiselinskim ostacima u aktivnom mestu enzima i stabilizaciji kompleksa halkon-enzim.

Takođe, rezultati doktorske disertacije predstavljaju nova ili dopunjena saznanja o lipofilnosti derivata propiofenona. Pokazano je da se formirani QSRR modeli mogu sa sigurnošću koristiti za predviđanje retencije i lipofilnosti novih strukturno sličnih derivata halkona.

Posebno su značajni rezultati koji su dobijeni u *in vitro* i *docking* ispitivanju anti-HIV-1 proteazne aktivnosti sintetisanih jedinjenja koji ukazuju na to da *orto* disupstitucija prstena B 1,3-difenil-2-propen-1-onske strukture fenolnim grupama kao i disupstitucija prstena A fluoro grupama doprinose inhibitornoj aktivnosti halkona.

Doprinos ove doktorske disertacije se ogleda i u primeni 3D-QSAR studija. Pokazano je da formirani 3D-QSAR modeli imaju dobru moć predviđanja što može biti od značaja za dizajniranje novih jedinjenja koja pokazuju bolju inhibitornu aktivnost.

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti i određivanje parametara oksidativnog stresa novosintetisanih jedinjenja predstavlja dodatnu vrednost doktorske disertacije. Rezultati su pokazali da sintetisani halkoni pokazuju antioksidativnu aktivnost koja zavisi od vrste supstituenata u osnovnoj strukturi. Da bi se dobilo jedinjenje sa potentnijim antioksidativnim dejstvom potrebno je sintetisati halkone sa više fenolnih ili sličnih grupa, a potrebno je izbegavati supstituente poput halogena i grupa koje smanjuju elektronsku gustinu.

Sagledavajući priložene rezultate Komisija je stava da opisano istraživanje sintetisanih derivata halkona može dovesti do potencijalno novih *lead* jedinjenja koja će se koristiti za dalji razvoj inhibitora HIV-1 proteaze i koji će, pored antivirusne, pokazivati i antioksidativnu aktivnost. Prednost supstituisanih derivata halkona u odnosu na komercijalno dostupne inhibitore HIV-1 proteaze je jednostavnost hemijske sinteze i nepeptidna struktura koja doprinosi stabilnosti i boljoj bioraspoloživosti. Takođe, rezultati istraživanja, posebno 3D QSAR analize otvara put ispitivanju novih derivata halkona kako u oblasti inhibicije HIV-1 proteaze tako i u ispitivanju drugih farmakoloških aktivnosti koje mogu biti od značaja kod pacijenata sa AIDS-om.

6. PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu izloženog Komisija zaključuje da je kandidat dr farm. Nemanja Turković uspešno realizovao postavljene ciljeve istraživanja i da rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti Farmaceutske-medicinske hemije.

Rezultati doktorske disertacije publikovani su u jednom radu u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), jednom radu u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), jednom radu u međunarodnom časopisu (M23) i četiri saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanim u izvodu (M34).

Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju dr farm. Nemanje Turkovića i sa zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Dizajniranje, sinteza i *in vitro* ispitivanja derivata propiofenona kao potencijalnih inhibitora enzima HIV-1 proteaze“

Članovi Komisije:

1. _____
Dr sc. Bojan Marković, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

2. _____
Dr sc. Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

3. _____
Dr sc. Silva Dobrić, redovni profesor,
Univerzitet Odbrane-Medicinski fakultet VMA

U Beogradu, 23.02.2021. godine

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU UNIVERZITETA U BEOGRADU – FARMACEUTSKOG
FAKULTETA**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU-DOKTORSKE STUDIJE

Predmet: Izveštaj o proveru originalnosti doktorske disertacije

Univerzitetska biblioteka „Svetozar Marković“ u Beogradu je korišćenjem programa iThenticate izvršila proveru originalnosti doktorske disertacije pod nazivom: „**Dizajniranje, sinteza i *in vitro* ispitivanja derivata propiofenona kao potencijalnih inhibitora enzima HIV-1 proteaze**“ kandidata dr farm. Nemanje Turković.

Dobijena vrednost za Similarity index iznosi 15% iz 114 izvora. Preklapanje teksta sa jednim izvorom je 6%, a u svim ostalim slučajevima je sličnost teksta iznosila manje od 1%.

Analizom izveštaja može se zaključiti da je ovaj stepen podudarnosti posledica prethodno publikovanih rezultata istraživanja samog autora koji su sastavni deo disertacije, upotrebe opštih izraza i oznaka koje se obično koriste u naučnoj i stručnoj literaturi u oblasti medicinske hemije.

Podudarnost teksta je izraženija u poglavljima Abstrakt (na engleskom jeziku) i Uvod, kao posledica korišćenja egzaktnih hemijskih simbola i nomenklature, standardnog predstavljanja primenjenih eksperimentalnih tehnika i opisa metoda kao i korišćenja akronima engleskih reči. Podudarnost teksta je najmanja u poglavlju Rezultati i diskusija.

Na osnovu iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2 Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izjavljujem da izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije i predlažem da se nastavi sa procedurom odobravanja i pripreme za odbranu.

Sa ovim izveštajem o originalnosti teksta upoznat je drugi mentor, dr Branka Ivković, vanredni profesor kao i članovi Komisije za pripremu izveštaja za ocenu i odbranu doktorske disertacije: Dr sc. Bojan Marković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Dr sc. Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet i Dr sc. Silva Dobrić, redovni profesor, Univerzitet Odbrane - Medicinski fakultet VMA.

U Beogradu, 14.02.2021. godine

Mentor:

Dr sc. Zorica Vujić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet