

**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 skraćénica*, *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  $\beta$ -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 ( $N^4\text{-(7-hlor-3-nitrohinolin-4-il)-4-metilbenzen sulfonohidrazid}$ ) 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  $\text{HBF}_4$  i  $\text{NaNO}_2$  je Balz-Schiemann-ovom reakcijom u dihlorbenzenu prevedena u odgovarajući fluorni derivat. Uvođenje joda u položaj C(4) izvedeno je pomoću LDA i  $\text{I}_2$  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** ( $N^4\text{-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)-}N,N\text{-dietilpropan-1,3-diamin}$ ). 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  $N^4\text{-(7-hlor-3-fluorhinolin-2-il)-}N,N\text{-dietilpropan-1,3-diamin}$ ).

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 Pd(OAc)<sub>2</sub> i upotrebom liganada DPEPhos i Sphos.

(v) Za sintezu fluorovanih adamantanskih derivata 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)) odabran je pristup kojim se prethodno sintetisani odgovarajući amino-adamantanski prekursori (*NH*<sub>2</sub>-C(α)-C(α')-*N*-C(α'))-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*<sup>1</sup>-(1-adamantimetil)propan-1,2-diamina i hinolinskih jezgara i nastajanja metiladamantanskih proizvoda (*N*<sup>1</sup>-(1-adamantimetil)-*N*<sup>2</sup>-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)propan-1,2-diamin i *N*<sup>1</sup>-(1-adamantimetil)-*N*<sup>2</sup>-(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*<sup>1</sup>-(1-adamantimetil)butan-1,3-diamina, *N*<sup>1</sup>-(1-adamantimetil)pentan-1,4-diamina, *N*<sup>1</sup>-[2-(1-adamantil)etil]butan-1,3-diamina i *N*<sup>1</sup>-[2-(1-adamantil)etil]pentan-1,4-diamina) dolazi primenom Buchwald–Hartwig-ove reakcije (Pd(OAc)<sub>2</sub>, Sphos/DPEPhos ligandi).

(vi) Des-hloraminohinolinski derivati normalnog niza (*N*-(1-adamantimetil)-*N'*-hinolin-4-il-propan-1,3-diamin i *N*-[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<sub>4</sub> 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 (C(α)-H i C(α')-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)<sub>2</sub> i SPhos kao liganda.

(vii) Selektivnim metilovanjem alifatične amino-grupe adamantanskih derivata pomoću 37% HCHO, u prisustvu ZnCl<sub>2</sub> i NaBH<sub>3</sub>CN 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 (IC<sub>50</sub> = 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 (IC<sub>90</sub>(D6) = 157 nM) osam puta nižu od aktivnosti CQ (IC<sub>90</sub>(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 (IC<sub>90</sub>) 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 ( $IC_{90} = 15,22$  nM) što je približno aktivnosti MFQ ( $IC_{90} = 19,14$  nM) i oko 50 puta bolje od aktivnosti CQ ( $IC_{90} = 736$  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  $\alpha$ -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  $\mu$ M). Pri koncentraciji od 5  $\mu$ 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  $\mu$ 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( $\alpha$ )-C( $\alpha'$ )- $N$ -C( $\alpha''$ )) kod kojih je mesto grananja u neposrednom susedstvu hinolinskog jezgra (Me-C( $\alpha$ )). 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( $\alpha'$ )). 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  $\beta$ -hematina jedinjenja sa fluorom i rezultati su upoređeni sa stepenom inhibicije nefluorovanih izostera . Vrednosti inhibicije građenja

$\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 IC<sub>50</sub> vrednosti u odnosu na odgovarajuće H-C(3) izostere (*N*<sup>1</sup>-(1-adamantilmetil)-*N*<sup>3</sup>-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin: IC<sub>50</sub> = 0,3 μM u odnosu na *N*<sup>1</sup>-(1-adamantilmetil)-*N*<sup>3</sup>-(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin: IC<sub>50</sub> = 1-2,5 μM i *N*<sup>1</sup>-[2-(1-adamantil)etil]-*N*<sup>3</sup>-(7-hlor-3-fluorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin f: IC<sub>50</sub> = 1-2,5 μM u odnosu na *N*<sup>1</sup>-[2-(1-adamantil)etil]-*N*<sup>3</sup>-(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin: IC<sub>50</sub> = 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*<sup>1</sup>-(1-adamantilmetil)-*N*<sup>3</sup>-(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*<sup>1</sup>-(1-adamantilmetil)-*N*<sup>3</sup>-(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*<sup>1</sup>-(1-adamantilmetil)-*N*<sup>3</sup>-(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*<sup>1</sup>-(1-adamantilmetil)-*N*<sup>3</sup>-(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*<sup>1</sup>-(1-adamantilmetil)-*N*<sup>3</sup>-(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 ( $t_{1/2} = 79$  min) i čoveka ( $t_{1/2} = 78$  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 ( $t_{1/2} = 21$  min), odnosno mikrozomalne suspenzije čoveka ( $t_{1/2} = 13$  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  $[\text{M}+16]^+$  i dihidrosilacije  $[\text{M}+32]^+$  ( $\text{M}^+ : [\text{M}+16]^+ : [\text{M}+32]^+ = 33 : 26 : 1$  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  $\text{IC}_{50}$  vrednosti derivata veće su od  $5 \mu\text{M}$  (u istom ogledu kinidinu kao pozitivnoj kontrolnoj probi određena je  $\text{IC}_{50}$  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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  ili 20  $\mu\text{M}$  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) Usporedna 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-adamantimetil)- $N^3$ -(7-hlorhinolin-4-il)butan-1,3-diamin i  $N^1$ -(1-adamantimetil)- $N^3$ -(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 indicacije 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  $\mu M$  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  $\mu M$  ili 20  $\mu M$ , 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) Srblijanović 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



