

Универзитет у Београду – Хемијски факултет
Наставно-научном већу Хемијског факултета

Предмет: Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације **Јелене М. Константиновић**, асистента запосленог на Универзитету у Београду - Хемијском факултету.

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета, одржаној 8. фебруара 2018. године, изабрани смо у Комисију за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације **Јелене М. Константиновић**, асистента запосленог на Универзитету у Београду - Хемијском факултету, под насловом: „**Дизајн и синтеза инхибитора ботулиnum неуротоксина А и паразита *Plasmodium falciparum*: бензотиофенски и стероидни деривати аминоксинолина**“. Пошто смо прегледали поднету дисертацију, подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Јелене М. Константиновић написана је на 259 страна и има 176 литературних навода. Текст дисертације садржи 16 шема, 69 слика, 21 табелу и 7 графика. Прилог садржи 10 слика, 6 табела и 18 графика. Теза садржи следећа поглавља: 1. *Увод*, 2. *Општи део*, 3. *Наши радови*, 4. *Експериментални део*, 5. *Закључак на српском језику*, 6. *Закључак на енглеском језику*, 7. *Прилог*, 8. *Литература*. Поред наведеног, дисертација садржи: *сажетак на српском језику* (2 стране), *сажетак на енглеском језику* (2 стране), *листу скраћеница* (3 стране), *садржај* (2 стране) и *захвалницу* (1 страна).

У *Уводу* кандидат дефинише тему докторске дисертације, указујући на значај синтезе нових малих молекула инхибитора ботулиnum неуротоксина серотипа А и паразита *Plasmodium falciparum*.

У *Општем делу* дати су подаци о ботулиnum неуротоксину, описан је механизам његовог дејства, дат је преглед литературе у којој су описани најновији инхибитор овог токсина, као и домети у пољу развоја лека. Укратко је приказана тренутна ситуација у погледу распрострањености маларије, преглед лекова који се тренутно користе, као и нових структура са обећавајућом антималаријском активношћу.

У *Нашим радовима* приказан је дизајн и синтеза нових стероидних и бензотиофенских деривата аминоксинолина, дати су резултати испитивања њихове инхибиторне активности према кратком низу (ланцу) ботулиnum неуротоксина серотипа А (BoNT/A LC), холотоксину BoNT/A унутар неурона, као и антималаријска активност бензотиофенских деривата аминоксинолина. Приказана је и детаљна фармакокинетичка анализа стероидног деривата који је показао најбољу активност према BoNT/A унутар неурона.

У *Експерименталном делу* детаљно су описани поступци синтезе свих једињења. Наведене су физичке карактеристике и резултати структурних анализа једињења добијених применом инструменталних техника. Приказана је чистоћа једињења (одређена HPLC методом) која су употребљена у биолошким тестовима. Такође, описане су методе употребљене за испитивање биолошке активности.

У *Закључку* на српском и енглеском језику дат је преглед најважнијих резултата остварених у оквиру ове докторске дисертације. Дат је *Прилог*, у коме су табеларно приказане активности једињења тестираних у неуронима; хроматограми добијени приликом фармакокинетичке анализе, дијаграми расподеле за одређивање рКа, графици одређивања растворљивости и графици активности једињења у тесту одређивања инхибиције настајања бета-

хематина (хемозоина) из хематина (ВНІА експеримент). Дат је списак литературе и на крају, дата је кратка биографија кандидата, неопходне изјаве и списак радова и саопштења проистеклих из ове тезе. Као електронски прилог на CD-у дати су спектри свих синтетисаних једињења (NMR, IR, HRMS, GC-MS), HPLC хроматограми, микроанализе и вредности оптичке ротације.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

Ботулинум неуротоксини су најјачи познати природни отрови и изазивачи ботулизма, потенцијално смртоносне неуропаралитичке болести. Осим интензивне вентилације, употреба антитела је за сада једини одобрен фармаколошки приступ за лечење интоксикације ботулинум неуротоксином. Терапија антителима има успеха једино пре него што токсин уђе у неурон, због чега се у последње време улажу значајни напори како би се развили нови инхибитори ботулинум неуротоксина серотипа А активни унутар неурона. У оквиру ове докторске дисертације извршена је синтеза и детаљно испитивање инхибиторне активности нових стероидних и бензотиофенских деривата 4-аминохинолина према кратком низу ботулинум неуротоксина (BoNT/A LC) и холотоксину (BoNT/A). У истраживању је коришћен *in vitro* есеј и ћелијски есеј у моторним неуронима развијеним из ембрионалних матичних ћелија миша (mES-MN). Додатно, молекулско моделовање и уклапање нових деривата у активно место ензима извршено је коришћењем програма Schrödinger Suite 2016-4. Синтетисани деривати су показали изузетне активности у *in vitro* есеју, са процентима инхибиције кратког низа до 85%. У физиолошким условима, протеин SNAP-25 је део трочлане групе протеина који омогућавају фузију везикула, које садрже неуротрансмитер ацетилхолин, и мембране неурона. Ослобађање ацетилхолина у синаптичку шупљину омогућава провођење нервних импулса и контракцију мишића. У случају када је дошло до интоксикације, BoNT/A LC врши хидролизу протеина SNAP-25, што води респираторној и мишићној парализи. Једињења синтетисана у оквиру ове докторске дисертације која су показала најбоље активности у *in vitro* есеју тестирана су у ћелијском есеју, пре и после интоксикације. У преинтоксикационом моделу, стероидни и бензотиофенски деривати аминокхинолина су остварили 88% и 68% заштите SNAP-25. У постинтоксикационом моделу, када се једињења додају ћелијској култури 30 или 60 минута после токсина, издвојио се један стероидни дериват аминокхинолина, који је омогућио заштиту SNAP-25 чак 99%. Значај овог резултата се огледа у могућности примене овог једињења у терапеутске сврхе. Извршена је детаљна *in vitro* и *in vivo* фармакокинетичка анализа овог једињења. Показано је да овај стероидни дериват аминокхинолина показује извршне ADMET карактеристике којима би се постигла одговарајућа пермеабилност, растворљивост, стабилност и биорасположивост у *in vivo* условима. Осим тога, примењен орално у моделу миша у дози 600 mg/kg не доводи до нежељених ефеката и достиже максималну концентрацију > 10 μ M у мишјем серуму. Ово једињење је први пример малих молекула који се понашају као инхибитори кратког низа BoNT/A, активних у mES-MN у постинтоксикационом моделу.

Маларија је једна од најраспрострањенијих паразитских болести на свету. Процењује се да годишње од маларије оболи више од 200 милиона људи, а око пола милиона умре. У последње три деценије, проблем контроле маларије је постао још израженији, због чињенице да је дошло до наглог пораста резистенције паразита према лековима и неповољних климатских промена. У оквиру ове докторске дисертације извршено је испитивање *in vitro* антималаријске активности једињења према асексуалним формама три *Plasmodium falciparum* соја (D6, W2, TM91C235) и према гаметоцитима у фази V соја 3D7. Најактивнија једињења су затим тестирана у моделу експерименталне маларије миша. Неколико бензотиофенских деривата аминокхинолина довело је до продужетка средњег времена преживљавања до четири пута у односу на инфицирану контролу. Најважније од свега, једно једињење је омогућило излечење свих заражених мишева инфицираних паразитима *P. berghei*.

В) Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Последњих неколико година, употреба различитих ћелијских есеја уместо *in vitro* есеја за тестирање активности једињења према BoNT/A привлачи све већу пажњу. На тај начин врши се симулација свих важних корака у процесу интоксикације, укључујући везивање холотоксина за површину моторних неурона, ендоцитозу, транслокацију кратког низа у цитосол неурона и испољавање његове протеолитичке активности. Једињења која су испитана у оквиру ове докторске дисертације тестирана су у моторним неуронима развијеним из ембрионалних матичних ћелија миша, високо селективном моделу за BoNT/A који се сматра супериорнијим у односу на континуалне ћелијске линије и примарне неуроне (Kiris, E.; Kota, K. P.; Burnett, J. C.; Soloveva, V.; Kane, C. D.; Bavari, S. *Expert Rev Mol Diagn.* **2014**, *14*, 153–168.). Бензотиофенски и стероидни деривати аминоксинолина који су синтетисани у оквиру ове дисертације остварују изузетно висок проценат заштите SNAP-25. Посебну пажњу привукао је један стероидни дериват аминоксинолина, који је омогућио заштиту SNAP-25 до 99%, чиме се издвојио не само у односу на друга једињења синтетисана у оквиру ове дисертације, него и у односу на све до сада познате мале молекуле инхибиторе BoNT/A LC (Eubanks, L. M.; Nixon, M. S.; Jin, W.; Hong, S.; Clancy, C. M.; Tepp, W. H.; Baldwin, M. R.; Malizio, C. J.; Goodnough, M. C.; Barbieri, J. T.; Johnson, E. A.; Boger, D. L.; Dickerson, T. J.; Janda, K. D. *PNAS*, **2007**, *104*, 2602-2607; Ruthel, G.; Burnett, J. C.; Nuss, J. E.; Wanner, L. M.; Tressler, L. E.; Torres-Melendez, E.; Sandwick, S. J.; Retterer, C. J.; Bavari, S. *Toxins* **2011**, *3*, 207-217; Videnović, M.; Opsenica, D. M.; Burnett, J. C.; Gomba, L.; Nuss, J. E.; Selaković, Ž.; Konstantinović, J.; Krstić, M.; Šegan, S.; Zlatović, M.; Sciotti, R. J.; Bavari, S.; Šolaja, B. A. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4134-4153; Jacobson, A. R.; Adler, M.; Silvaggi, N. R.; Allen, K. N.; Smith, G. M.; Fredenburg, R. A.; Stein, R. L.; Park, J.-B.; Feng, X.; Shoemaker, C. B.; Deshpande, S. S.; Goodnough, M. C.; Malizio, C. J.; Johnson, E. A.; Pellett, S.; Tepp, W. H.; Tzipori, S. *Toxicon* **2017**, *137*, 36-47). Детаљном провером литературних података установљено је да је ово први пример малих молекула инхибитора кратког низа BoNT/A са антагонистичким дејством према холотоксину BoNT/A у моторним неуронима развијеним из ембрионалних матичних ћелија миша у постинтоксикационом моделу. Инхибитор кратког низа BoNT/A који је ефикасан у *in vivo* условима када се примени после интоксикације још увек не постоји. Тренутно, једини мали молекули са активношћу у моделу миша је **Dyngo-4a**, који омогућава преживљавање 30% заражених мишева након 24 h (Seki, H.; Xue, S.; Nixon, M. S.; Pellet, S.; Remes, M.; Johnson, E. A.; Janda, K. D. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6226-6229). Због свега наведеног, остварени резултати представљају врло добру основу за детаљније проучавање сличне класе једињења.

У другом делу дисертације, испитана је *in vitro* антималяријска активност свих синтетисаних бензотиофенских деривата аминоксинолина према асексуалним формама три *Plasmodium falciparum* соја (D6, W2, TM91C235). Уопштено говорећи, деривати су показали бољу активност у односу на стандардни лек хлорокин, указујући на значајан допринос бензотиофенског језгра добро познатој антималяријској активности аминоксинолина. Сва једињења су остварила индекс резистенције (RI) нижи од хлорокина, док је неколико деривата показало $RI < 1$. Осим тога, поједина једињења су показала до 3,5 пута успешнију инхибицију формирања хемозоина у поређењу са хлорокином. Када је реч о утицају бензотиофенског језгра на антималяријску активност, у литератури до сада постоје подаци за две групе деривата са овим структурним мотивом, а који показују умерену активност према *P. falciparum* паразитима. Док једињење познато у литератури петог дана инхибира раст паразита у мишу до 66% у дози 50 mg/kg/дан × 4 дана (Pérez-Silanes, S.; Berrade, L.; García-Sánchez, R. N.; Mendoza, A.; Galiano, S.; Pérez-Solórzano, B. M.; Nogal-Ruiz, J. J.; Martínez-Fernández, A. R.; Aldana, I.; Monge, A. *Molecules*, **2009**, *14*, 4120-4135), применом једног бензотиофенског деривата аминоксинолина синтетисаног у оквиру ове дисертације у дози 40 mg/kg/дан × 4 дана паразити нису детектовани у крвном размазу закључно са једанаестим даном. Још важније, ово једињење доводи до излечења свих мишева при дози 160 mg/kg/дан × 3 дана. На основу свега изнетог закључује се да је истраживање спроведено у оквиру

ове дисертације довело до открића једињења са побољшаном антималаријском активношћу у *in vitro* и *in vivo* условима.

Д) Објављени радови који чине део докторске дисертације

Научни радови публиковани у међународним научним часописима:

1. **Konstantinović, J.**; Kiris, E.; Kota, K. P.; Kugelman-Tonos, J.; Videnović, M.; Cazares, L. H.; Terzić Jovanović, N.; Verbić, T. Ž.; Andjelković, B.; Duplantier, A. J.; Bavari, S.; Šolaja, B. A. New Steroidal 4-Aminoquinolines Antagonize Botulinum Neurotoxin Serotype A in Mouse Embryonic Stem Cell Derived Motor Neurons in Postintoxication Model. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 1595-1608. (категирија M21a) <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.7b01710>
2. **Konstantinović, J.**; Videnović, M.; Srbljanović, J.; Djurković-Djaković, O.; Bogojević, K.; Sciotti, R.; Šolaja, B. Antimalarials with Benzothioephene Moieties as Aminoquinoline Partners. *Molecules* **2017**, *22*, 343. (категирија M21) <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/3/343>

Конгреси и саопштења:

1. **Konstantinović, J. M.**; Anđelković, B. D.; Srbljanović, J. D.; Šolaja, B. A. Novi steroidni 4-aminohinolinski derivati kao antagonisti BoNT/A primenjeni posle intoksikacije u motornim neuronima razvijenim iz embrionalnih matičnih ćelija miša, Četvrta konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 5. novembar **2016**, izvodi radova HS P25, str. 61; ISBN 978-86-7132-064-1. (категирија M64)
2. **Konstantinović, J. M.**; Bogojević, B. K.; Zlatović, M. V.; Šolaja, B. A. New benzothioephene derivatives as inhibitors of BoNT/A. 35th Advanced Course of Medicinal Chemistry and “E. Duranti” National Seminar for PhD Students, ESMEC, Urbino, Italy, June 28- July 3, **2015**, Book of Proceedings, page 145. (категирија M34)
3. Bogojević, K. B.; **Konstantinović, J. M.**; Zlatović, M. V.; Šolaja, B. A. Uticaj položaja cijano-grupe u novim aminohinolinskim derivatima benzotiofena na inhibitornu aktivnost prema BoNT/A LC, Treća konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 24. oktobar **2015**, izvodi radova HS P12, str. 39; ISBN 978-86-7132-059-7. (категирија M64)
4. **Konstantinović, J. M.**; Bogojević, B. K.; Zlatović, M. V.; Šolaja, B. A. Primena benzotiofenskih derivata u inhibiciji BoNT/A, 52. savetovanje Srpskog hemijskog društva, Novi Sad, 29-30. maj **2015**, izvodi radova OH P 21, str. 135; ISBN 978-86-7132-056-2. (категирија M64)
5. **Konstantinović, J. M.**; Zlatović, M. V.; Šolaja, B. A. Dizajn i sinteza malih molekula kao inhibitora botulinum neurotoksina tipa A, 51. savetovanje Srpskog hemijskog društva, Niš, 5-7. juni **2014**, izvodi radova OH P 22, str. 112; ISBN 978-86-7132-054-2. (категирија M64)

Е) Закључак Комисије

Комисија је на основу детаљног прегледа докторске дисертације **Јелене М. Константиновић** под насловом „Дизајн и синтеза инхибитора ботулинум неуротоксина А и паразита *Plasmodium falciparum*: бензотиофенски и стероидни деривати аминокинолина“, закључила да резултати објављени у оквиру ове докторске дисертације представљају оригиналан и значајан научни допринос у органској и медицинској хемији подижући ниво истраживања посебно у области развоја лека против ботулинум неуротоксина. Резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације објављени су у оквиру једног међународног часописа изузетних вредности (M21a) и једног врхунског међународног часописа (M21). Такође, резултати истраживања су презентовани у оквиру једног научног саопштења штампаног у изводу на скупу међународног значаја и четири научна саопштења штампана у изводу на скуповима националног значаја.

Израда ове докторске дисертације омогућена је пројектима Министарства просвете, науке и технолошког развоја (172008), US National Institute of Health (1U01AI082051-01) и NATO CBP, EAP.SFPP 983638 и извршена је у сарадњи са Институтом за медицинска истраживања Универзитета у Београду, United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Frederick, Maryland, USA и Walter Reed Army Institute of Research, Silver Spring, Maryland, USA.

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета, да поднету докторску дисертацију кандидаткиње Јелене Константиновић прихвати и одобри одбрану докторске дисертације под наведеним насловом.

У Београду, 06. март 2018.

Комисија

Академик Богдан А. Шолаја,
професор Хемијског факултета
Универзитета у Београду у пензији (ментор)

др Драгана Милић,
професор Хемијског факултета
Универзитета у Београду

др Игор Опсеница,
ванредни професор Хемијског факултета
Универзитета у Београду

др Олгица Ђурковић-Ђаковић,
научни саветник Института за медицинска истраживања
Универзитета у Београду

Академик Владимир С. Костић,
професор Медицинског факултета
Универзитета у Београду

др Велимир Попсавин, дописни члан САНУ,
професор Природно-математичког факултета
Универзитета у Новом Саду
