

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 19.06.2014. godine, imenovana je komisija u sastavu:

1. Dr sc. Olivera Čudina, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor, predsednik komisije
2. Dr sc. Bojan Marković, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Katarina Nikolić, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. Dr sc. Sote Vladimirov, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
5. Dr sc. Vesna Jačević, viši naučni saradnik, Centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Dizajniranje, sinteza, fizičko-hemijske i biološke osobine amida kortiinskih kiselina antiinflamatornih steroida**“, kandidata dipl. farm. Vladimira Dobričića, istraživača saradnika na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

1. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dipl. farm. Vladimira Dobričića pod nazivom „**Dizajniranje, sinteza, fizičko-hemijske i biološke osobine amida kortiinskih kiselina antiinflamatornih steroida**“ napisana je na 212 strana, sadrži 43 slika, 3 šeme i 30

tabela. Sastoji se od sledećih poglavlja: Uvod, Cilj rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura, Prilozi i Biografija. U doktorskoj disertaciji citirano je 245 literaturnih referenci.

Za izvođenje eksperimenata na životinjama dobijena je saglasnost Etičkog Komiteta Vojnomedicinske akademije u Beogradu (broj dozvole: 03/10-2013).

2. Opis postignutih rezultata

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršena je sinteza dvadeset dva 17β -karboksamidna derivata glukokortikoida. Sintetisani derivati predstavljaju amide kortienskih kiselina iz pet glukokortikoida (hidrokortizon, prednizolon, metilprednizolon, deksametazon i betametazon) sa metil i etil estrima aminokiselina. Kortijske kiseline su metaboliti glukokortikoida koji ne poseduju antiinflamatornu aktivnost. Izbor aminokiselina koje su korišćene u sintezi amida je izvršen primenom *docking* studija. Ispitano je vezivanje osamnaest 17β -karboksamidnih derivata glukokortikoida (amidi kortienskih kiselina iz hidrokortizona, prednizolona i metilprednizolona sa metil i etil estrima šest aminokiselina - L-glicin, L-alanin, β -alanin, L-serin, L-histidin i L-fenilalanin) za glukokortikoidni receptor (GR). Energije vezivanja i efikasnost liganda ovih derivata su upoređene sa deksametazonom i kortienschom kiselinom iz prednizolona. Odabrane su četiri aminokiseline (L-glicin, L-alanin, β -alanin i L-fenilalanin), a njihovi metil i etil estri su iskorišćeni za sintezu 17β -karboksamidnih derivata konvencionalnih glukokortikoida. Formiran je i troparametarski eksponencijalni model kojim je izvršeno predviđanje afiniteta odabranih jedinjenja za GR.

Sinteza amida kortienskih kiselina je izvršena u dve faze. Prva faza je perijodna oksidacija glukokortikoida (hidrokortizona, prednizolona, metilprednizolona, deksametazona i betametazona) do odgovarajuće kortijske kiseline. U ovoj reakciji je upotrebljen vodeni rastvor perijodne kiseline, a kortijske kiseline su sintetisane u visokom prinosu (90 - 97,5%). U drugoj fazi izvršena je sinteza amida reakcijom između kortienskih kiselina i metil, odnosno etil estara odabranih aminokiselina. Amidi su

sintetisani primenom kuplujućeg reagensa (N,N'-dicikloheksilkarbodiimid (DCC) ili 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC)) i 1-hidroksibenzotriazola (HOBt) u prisustvu trietilamina (TEA) prema sledećim postupcima:

1. jednostepeni postupak, uz upotrebu EDC, HOBt i TEA
2. dvostepeni postupak, uz upotrebu DCC, HOBt i TEA

Dvostepenim postupkom su sintetisani amidi u značajno boljem prinosu (31,8 – 83,5 %) u odnosu na jednostepeni postupak (15,3 - 61 %). Strukture i čistoća sintetisanih jedinjenja potvrđene su hromatografskim tehnikama (TLC i HPLC), određivanjem temperature topljenja i spektroskopskim metodama (UV/VIS, FT-IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, MS TOF i MS-MS).

Lipofilnost sintetisanih jedinjenja je ispitana primenom konvencionalne *shake-flask* metode i izračunati su particioni koeficijenti oktanol/voda (logP). Na osnovu dobre korelacije između logP i izračunatih hromatografskih parametara, predložen je RP-TLC sistem za jednostavnu i brzu procenu lipofilnosti i formirani su matematički modeli za predviđanje logP vrednosti novosintetisanih amida kortienskih kiselina.

In vitro procena permeabilnosti i retencije u koži sintetisanih amida je izvršena primenom paralelnog testa permeabilnosti na veštačkim membrana (*eng. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, PAMPA*) i bioparticione micelarne hromatografije (BMC). Svi derivati metil estra L-fenilalanina i amid kortijske kiseline iz metilprednizolona sa etil estrom β-alanina (MPEA) imaju veću retenciju u odnosu na polazne glukokortikoide, a od ovih derivata jedino MPEA nema značajno veću permeabilnost u odnosu na polazni metilprednizolon, što ga izdvaja kao derivat sa potencijalno najpovoljnijim osobinama za lokalnu primenu na koži. Isti zaključak o permeabilnosti je dobijen i primenom BMC hromatografskog sistema, kojim se simuliraju uslovi u koži. Ispitan je kvantitativni odnos strukture i osobina (*eng. Quantitative Structure - Property Relationship, QSPR*) i kvantitativni odnos strukture i retencije (*eng. Quantitative Structure - Retention Relationship, QSRR*) ispitivanih jedinjenja. Formirani su QSPR i QSRR modeli koji uspostavljaju funkcionalnu zavisnost između geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih

deskriptora i odgovarajućih PAMPA ($\log P_e$ i R) i BMC (k) parametara. Na osnovu odgovarajućeg QSPR(R) modela, predložene su strukturne promene koje bi trebalo da poboljšaju retenciju u koži ispitivanih jedinjenja.

Lokalna antiinflamatorna aktivnost sintetisanih jedinjenja je ispitana primenom testa inhibicije edema izazvanog krotonskim uljem na uhu pacova. Vrednosti maksimalne inhibicije edema za sve derivate metil estra L-fenilalanina, kao i za amide kortijske kiseline iz hidrokortizona sa metil estrom L-alanina, etil estrom β -alanina i etil estrom L-glicina (HA, HEA i HEG) su niže, dok su za ostale derivate slične ili više u odnosu na maksimalnu inhibiciju edema određenu za deksametazon. Maksimalna inhibicija edema se kod svih jedinjenja postiže sa znatno nižim koncentracijama u odnosu na deksametazon (4,58 μ M, u odnosu na 45,8 μ M), što je potvrđeno za većinu derivata značajno nižom EC_{50} vrednošću u odnosu na deksametazon. Derivati sa najboljom lokalnom aktivnošću (najnižim vrednostima EC_{50} i najvišim vrednostima maksimalne inhibicije edema) su MPEA i amidi kortijske kiseline iz betametazona sa etil estrom L-glicina (BEG), odnosno metil estrom L-glicina (BG). Sistemske neželjene efekte ova tri derivata su značajno niži u odnosu na sistemske neželjene efekte deksametazona. Metabolizam jedinjenja sa najnižom EC_{50} vrednošću (MPEA) predviđen je primenom programa *Metabolizer*. Primenom *docking* studija predviđena je mogućnost vezivanja za GR i potencijalna glukokortikoidna aktivnost najverovatnijeg metabolita MPEA. Na osnovu visokih vrednosti energije vezivanja i efikasnosti liganda, kao i odsustva interakcije C3-karbonilne grupe sa GR, može se očekivati slaba glukokortikoidna aktivnost nastalog metabolita. Na osnovu toga, može se pretpostaviti da na bolju sistemsku podnošljivost ovih jedinjenja utiču metabolizam i slaba aktivnost glavnih metabolita.

3D analizom kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (eng. *3D Quantitative Structure - Activity Relationship*, 3D-QSAR) ispitivanih jedinjenja definisane su farmakofore sa najvećim uticajem na lokalnu antiinflamatornu aktivnost. Formiran je 3D-QSAR model i predložene su strukturne promene koje bi trebalo da dovedu do poboljšanja lokalne antiinflamatorne aktivnosti. Za predložena nova jedinjenja, predviđena je maksimalna inhibicija edema (3D-QSAR modelom), afinitet za glukokortikoidni receptor (troparametarskim eksponencijalnim modelom), kao i vrednosti

PAMPA parametara $\log Pe$ i R (odgovarajućim QSPR modelima) i izdvojen je derivat sa potencijalno najboljim osobinama za primenu na koži.

3. Uporedna analiza rezultata doktorske disertacije sa podacima iz literature

Lokalni glukokortikoidi su lekovi izbora u lečenju inflamatornih i alergijskih oboljenja različite etiologije u dermatologiji, pulmologiji, oftalmologiji, reumatologiji i gastroenterologiji. Dugotrajna primena ovih lekova može dovesti do ozbiljnih lokalnih i sistemskih neželjenih efekata, što ograničava njihovu upotrebu.¹

U cilju dobijanja glukokortikoida sa visokom antiinflamatornom aktivnošću i minimalnim neželjenim efektima, krajem osamdesetih godina sintetisani su *soft* glukokortikoidi. *Soft* glukokortikoidi nastaju modifikacijom bočnog niza glukokortikoida na položaju C17 β . Ova modifikacija može da ide u dva pravca: perijodna oksidacija celog bočnog niza, čime nastaje kortienska kiselina,² ili oksidacija primarnog alkohola na položaju C21 do odgovarajuće karboksilne kiseline.³ *Soft* glukokortikoidi su estri ili amidi ovako sintetisanih kiselina.^{3,4} Primeri *soft* glukokortikoida derivata kortijske kiseline su loteprednoletabonat i etiprednoldikloacetat.^{5,6} Biotransformacijom ovih jedinjenja nastaju kortijske kiseline, koje su neaktivni i netoksični metaboliti.

Osim estara, sintetisan je i određen broj amida kortijskih kiselina sa alkil, cijanoalkil, oksialkil, aminoalkil i aromatičnim aminima.⁷⁻⁹ Prisustvo grupa u bočnom nizu na položaju C17 β koje grade vodonične veze sa GR je neophodno za glukokortikoidnu aktivnost.¹⁰ Formstecher i saradnici su sintetisali seriju 17 β -karboksamidnih derivata deksametazona sa različitim aminima i ispitali njihovu antiglukokortikoidnu aktivnost.⁸ Jedinjenja sa najboljom antiglukokortikoidnom aktivnošću su derivati alifatičnih i aromatičnih amina koji nemaju funkcionalne grupe koje mogu da grade vodonične veze sa GR. Ovi rezultati ukazuju na značaj vodoničnih veza ovog dela strukture za glukokortikoidnu aktivnost.

Za sintezu novih 17 β -karboksamidnih derivata glukokortikoida (amida kortijskih kiselina) kao potencijalnih *soft* lekova odabrane su aminokiseline. Aminokiseline su netoksične i predstavljaju potencijalne metabolite ovih jedinjenja. Pored toga, u C17 β bočnom nizu ovih derivata je prisutna estarska grupa, koja ima mogućnost da gradi vodonične veze sa GR. Izbor aminokiselina je izvršen na osnovu rezultata *docking* studija, u kojima je simulirana interakcija osamnaest 17 β -karboksamidnih derivata glukokortikoida sa GR. Ova jedinjenja su derivati tri glukokortikoida (hidrokortizona, prednizolona i metilprednizolona) i šest aminokiselina (metil estra L-glicina, metil estra L-alanina, metil estra L-fenilalanina, metil estra L-histidina, metil estra L-serina i etil estra β -alanina). Na osnovu energije vezivanja i efikasnosti liganda (EL),^{11,12} kao i slične orijentacije u receptoru i interakcija sa receptorom u poređenju sa deksametazonom, mogla bi se očekivati izvesna glukokortikoidna aktivnost svih ispitivanih jedinjenja. Jedinjenja sa velikim molekulskim masama i velikim brojem nevodonikovih atoma često daju lažno pozitivni rezultat u *docking* studijama. Zbog toga se EL koristi kao bolji kriterijum za rangiranje jedinjenja.¹² Najniže vrednosti EL su izračunate za derivate metil estra L-glicina, metil estra L-alanina i etil estra β -alanina, te se od ovih jedinjenja može očekivati dobra lokalna antiinflamatorna aktivnost.

Sinteza kortijskih kiselina vrši se perjodnom oksidacijom glukokortikoida, uz upotrebu perjodne kiseline ili natrijum-perjodata.^{13,14} Za oksidaciju glukokortikoida odabranih u ovoj studiji, primenjena su oba oksidaciona sredstva. Oksidacija betametazona i deksametazona natrijum-perjodatom nije bila potpuna, što je otežavalo postupak prečišćavanja ovih kortijskih kiselina i smanjivalo prinos reakcije. S druge strane, upotrebom perjodne kiseline postiže se potpuna oksidacija svih glukokortikoida odabranih za sintezu amida kortijskih kiselina. Na osnovu toga, perjodna kiselina je odabrana kao oksidaciono sredstvo, a kortijske kiseline su sintetisane u visokim prinosima (90 - 97,5%). Pored perjodne oksidacije, glukokortikoidi se mogu oksidisati do odgovarajućih kortijskih kiselina uvođenjem vazduha u reakcionu smešu u prisustvu kalijum-karbonata,¹⁵ odnosno upotrebom kalijum superoksida.¹⁶ Ova oksidaciona sredstva se najčešće koriste za oksidaciju glukokortikoida koji sadrže acetamid na položajima C16 α i C17 α (npr. fluocinolonacetamid), jer obezbeđuju bolji prinos kortijske kiseline u odnosu na perjodnu oksidaciju.

Sinteza amida kortijskih kiselina se vrši primenom kuplujućih reagenasa – EDC ili DCC. Reakcija može biti jednostepena ili dvostepena. Jednostepeni postupak podrazumeva dodatak EDC, HOBt i TEA u reakcionu smešu koja sadrži kortijsku kiselinu i amin.⁴ U prvom koraku dvostepenog postupka, kortijska kiselina reaguje sa DCC i HOBt, pri čemu nastaje estar kortijske kiseline sa HOBt. U drugoj fazi, dodaje se amin, pri čemu nastaje amid kortijske kiseline.¹⁷ Za sintezu amida kortijskih kiselina odabranih na osnovu rezultata *docking* studija, primenjena su oba postupka. Dvostepeni postupak omogućuje sintezu odabranih amida u značajno boljem prinosu (31,8 - 83,5%) u odnosu na jednostepeni postupak (15,3 - 61%). Sintetisani amidi su prečišćeni primenom preparativne hromatografije na gravitacionoj koloni i preparativne TLC. Strukture i čistoća sintetisanih jedinjenja potvrđene su hromatografskim tehnikama (TLC i HPLC), određivanjem temperature topljenja i spektroskopskim metodama (UV/VIS, FT-IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, MS TOF i MS-MS).

Particioni koeficijenti oktanol/voda (logP) sintetisanih amida određeni su primenom konvencionalne *shake-flask* metode. *Shake-flask* metoda se smatra standardnom metodom za ispitivanje lipofilnosti jedinjenja, ali je odlikuju izvesni nedostaci. Za ovo ispitivanje je potrebna relativno velika količina rastvarača i ispitivanih supstanci visokog stepena čistoće, a vreme izvođenja je relativno dugo. *Shake-flask* metoda je u mnogim slučajevima uspešno zamenjena hromatografskim tehnikama - HPLC i TLC (normalno-fazna (NP) i, mnogo češće, reverzno-fazna (RP) TLC).^{18,19,20} Maes i saradnici su odredili logP grupe 17β-karboksamidnih derivata deksametazona *shake-flask* metodom i predložili RP-HPLC metodu kao alternativu za procenu lipofilnosti ove grupe jedinjenja.¹⁸ Pregledom dostupne literature, TLC metoda nije primenjivana za procenu lipofilnosti amida kortijskih kiselina. U ovoj studiji ispitano je pet RP-TLC sistema, koji predstavljaju binarne smeše vode i organskog rastvarača (metanola, etanola, acetonitrila, tetrahidrofurana i acetona). Najbolja korelacija između izračunatih hromatografskih parametara i logP vrednosti je dobijena u sistemu etanol/voda. Formirani su i matematički modeli kojima je moguće jednostavno i pouzdano predviđanje logP vrednosti novosintetisanih amida kortijskih kiselina primenom RP-TLC sistema etanol/voda.

PAMPA test omogućuje brzu procenu permeabilnosti jedinjenja kroz biološke barijere. Za procenu permeabilnosti i retencije u koži primenjuju se dva PAMPA modela, koji se razlikuju po hemijskom sastavu veštačke membrane. Prvi model predstavlja smešu silikonskog ulja i izopropilmiristata, koji nisu prirodni sastojci humane kože,²¹ a drugi smešu certramida, holesterola i stearinske kiseline.²² Prvi model primenjen je za procenu permeabilnosti i retencije u koži C21 estara glukokortikoida.²³ Isti model primenjen je i u ovoj studiji. Za razliku od najvećeg broja ispitanih C21 estara glukokortikoida, koji pripadaju klasi III permeanata (visoka retencija, niska permeabilnost), svi amidi kortiinskih kiselina i polazni glukokortikoidi pripadaju klasi I permeanata (niska retencija, niska permeabilnost). Derivati metil estra L-fenilalanina (HF, PF, MPF i DF) i MPEA imaju značajno veću retenciju u odnosu na polazne glukokortikoide, dok derivat MPEA nema značajno veću permeabilnost u odnosu na polazni metilprednizolon, što ga izdvaja kao derivat sa potencijalno najboljim odnosom retencija/permeabilnost kroz kožu.

BMC predstavlja *in vitro* tehniku za brzu procenu permeabilnosti jedinjenja kroz biološke membrane. Hromatografski sistem kojim se simuliraju uslovi u ljudskoj koži čine C18 kolona (stacionarna faza) i rastvor nejonskog surfaktanta polioksietilen(23)lauril etra (Brij35) u puferu pH = 5,5 (mobilna faza), na temperaturi od 36,5°C.²⁴ Retenciono ponašanje sintetisanih amida kortiinskih kiselina i polaznih glukokortikoida ispitano je u ovom BMC sistemu. Najveće vrednosti retencionog faktora (*k*) imaju derivati metil estra L-fenilalanina (HF, PF, MPF i DF), te se od ovih jedinjenja očekuje najveća permeabilnost kroz kožu.

Primenom QSPR i QSRR analize rezultata PAMPA testa i BMC ispitivanja identifikovane su funkcionalne grupe koje bi trebalo da imaju najveći uticaj na permeabilnost i retenciju u koži. Formirani su modeli koji se mogu koristiti za predviđanje permeabilnosti i retencije u koži novih amida kortiinskih kiselina.

Ispitivanje lokalne antiinflamatorne aktivnosti izvršeno je modifikovanim testom inhibicije edema izazvanog krotonskim uljem na uhu pacova, koji su predložili Tonelli i saradnici.²⁵ Svi sintetisani amidi dostižu maksimalnu inhibiciju edema u znatno nižoj koncentraciji (4,58 µM) u odnosu na deksametazon (45,8 µM), što je za većinu derivata potvrđeno značajno nižim EC₅₀ vrednostima (0,72 - 22,92 µM) u odnosu na

deksametazon (37,13 μM). Amid kortijske kiseline iz metilprednizolona sa metil estrom L-glicina (MPG), MPEA, BG i BEG imaju značajno više, dok ostali derivati imaju slične ili niže vrednosti maksimalne inhibicije edema u odnosu na deksametazon. Sistemski neželjeni efekti glukokortikoida i njihovih derivata (uključujući *soft* glukokortikoide) se javljaju zbog interakcije ovih jedinjenja sa glukokortikoidnim receptorima u organizmu (npr. u timusu i slezini). Kim i saradnici su sintetisali nekoliko 20-karboksamidnih derivata prednizolona, ispitali njihovu lokalnu antiinflamatornu aktivnost i sistemske neželjene efekte.²⁶ Derivati sa najboljom lokalnom antiinflamatornom aktivnošću su imali i najizraženije sistemske neželjene efekte. Pretpostavlja se da je brza metabolička inaktivacija ovih jedinjenja onemogućena zbog hidrolitičke stabilnosti amidne grupe.²⁷ Procena sistemskih neželjenih efekata jedinjenja ispitivanih u ovoj disertaciji je izvršena nakon jednokratne primene krotonskog ulja i petodnevne primene tri derivata sa najboljom lokalnom antiinflamatornom aktivnošću (MPEA, BEG i BG). Sistemski neželjeni efekti su izraženi kao procenat smanjenja mase timusa i slezine u odnosu na kontrolnu grupu. Sistemski neželjeni efekti ovih derivata su značajno niži u odnosu na deksametazon. Metabolizam i uticaj metabolita na sistemske neželjene efekte procenjeni su *in silico* na derivatu sa najnižom EC_{50} vrednošću (MPEA), primenom softvera *Metabolizer*.²⁸ Metabolit sa najvećom verovatnoćom nastanka u organizmu je kiselina koja nastaje hidrolizom estarske grupe u $\text{C17}\beta$ bočnom nizu ovih derivata. Interakcija ovog metabolita sa glukokortikoidnim receptorom je ispitana primenom *docking* studija. Na osnovu visokih vrednosti energije vezivanja i EL, može se očekivati slaba glukokortikoidna aktivnost ovog metabolita, što bi trebalo da značajno doprinosi eksperimentalno potvrđenim nižim stepenom sistemskih neželjenih efekata ovih derivata u odnosu na deksametazon.

Citirana relevantna literatura

1. Avery M.A., Chittiboyina A.G. Anti-inflammatory glucocorticoids. In: Abraham D.J, Rotella D.P. (Eds.). *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development 7th edition*. Wiley-Interscience, **2010**, Vol. 5, pp. 35-152.

2. Bladh H., Burkamp F., Gabos B., Hansen P. Novel derivatives of steroidal[3,2-c]pyrazole compounds with glucocorticoid activity, WO 2010/114476 A1 (2010).
3. Khalil M., Lay J., Lee H. Synthesis of new anti-inflammatory steroidal acid ester: methyl 11 β -hydroxy-3,20-dioxo-1,4-pregnadien-21-oate. *J. Pharm. Sci.* **1985**, *74*, 180-183.
4. Anthes J.C., McCormick K.D., Hey J.A., Aslanian R.G., Biju P.J., Berlin M.Y., Solomon D. M., Wang H., Lim Y.-H., Lee Y.J., Bitar R.D. C20-C21 substituted glucocorticoid receptor agonists, WO 2009/085879 A2 (2009).
5. Bodor N., Buchwald P. Corticosteroid design for the treatment of asthma: structural insights and the therapeutic potential of soft corticosteroids. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 3241-3260.
6. Bodor N., Loftsson T., Wu W.M. Metabolism, distribution, and transdermal permeability of a soft corticosteroid, loteprednol etabonate. *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 1275–1278.
7. Formstecher P., Lustenberger P., Dautrevaux M. Synthesis of steroidal 17 β -carboxamide derivatives. *Steroids* **1980**, *35*, 265-272.
8. Formstecher P.A., Lefebvre P., Burollaud T. Hormones and antihormones. The steroidal model. *J. Pharm. Belg.* **1991**, *46*, 37-48.
9. Manz B., Rehder M., Heubner A., Kreienberg R., Grill H.J., Pollow K. 17 β -carboxamide steroids: highly effective inhibitors of the phytohaemagglutinin mediated blastogenesis of normal human peripheral lymphocytes. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1984**, *22*, 209-214.
10. Duax W. L., Griffin J. F., Rohrer D. C., Weeks C. M. In: *Hormone Antagonists* (Agarwal, M. K., ed.), Walter de Gruyter, Berlin, **1982**.
11. Andrews P.R., Craik D.J., Martin J.L. Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1648-1657.
12. Hopkins A.L., Groom C.R., Alex A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 430-431.
13. Bladh H., Burkamp F., Gabos B., Hansen P. Novel derivatives of steroidal[3,2-c]pyrazole compounds with glucocorticoid activity, WO 2010/114476 A1 (2010).
14. Bodor N. Soft steroids having anti-inflammatory activity, US 4710495 A (1987).
15. Alvarez F.S. Chemical process for preparing androsta-4-ene 17 α -carboxylic acid, US 4198336 A (1980).
16. Ashton M.J., Karlsson S.J.-A., Vacher B.Y.J., Withnall M.T. New steroids, WO 94/14834 (1994).

17. Formstecher P., Lustenberger P., Dautrevaux M. Synthesis of steroidal 17 β -carboxamide derivatives. *Steroids* **1980**, *25*, 265-272.
18. Maes P., Formstecher P., Lustenberger P., Dautrevaux, M. High-performance liquid chromatography in the evaluation of the lipophilicity of 17 β -carboxamide steroid derivatives. *J. Chromatogr.* **1988**, *445*, 409-416.
19. Csermely T., Kalasz H., Deak K., Hasan M., Darvas F., Petroianu G. Lipophilicity determination of some ACE inhibitors by TLC. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, **2008**, *31*, 2019-2034.
20. Odović J., Aleksić M., Stojimirović B., Milojković-Opsenica D., Tešić Ž. Normal-phase thin-layer chromatography of some angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and their metabolites. *J. Serb. Chem. Soc.* **2009**, *74*, 677-688.
21. Ottaviani G., Martel S., Carrupt P.-A. Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3948-3954.
22. Sinkó B., Kökösi J., Avdeef A., Takács-Novák K. A PAMPA study of the permeability-enhancing effect of a new ceramide analogues. *Chem. Biodivers.* **2009**, *6*, 1867-1874.
23. Markovic B., Vladimirov S., Cudina O., Odovic J., Karljickovic-Rajic K. A PAMPA assay as fast predictive model of passive human skin permeability of new synthesized corticosteroid C-21 esters. *Molecules* **2012**, *17*, 480-491.
24. Martinez-Pla J. J., Martín-Biosca S., Villanueva-Camañas R. M., Medina-Hernández M. J. Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability. *Biomed. Chromatogr.* **2003**, *17*, 530-537.
25. Tonelli G., Thibault L., Ringler I. A bio-assay for the concomitant assessment of the antiphlogistic and thymolytic activities of topically applied corticoids. *Endocrinology* **1965**, *77*, 625-634.
26. Kim H., Bird J., Heiman A., Hudson G., Taraporewala I., Lee H. Synthesis of new antiinflammatory steroidal 20-carboxamides: (20R)- and (20S)-21-(N-substituted amino)-11 β ,17,20-trihydroxy-3,21-dioxo-1,4-pregnadiene. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 2239-2244.
27. Omar M., Khan F, Lee H.J. Synthesis and pharmacology of anti-inflammatory steroidal antedrgs. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 5131-5145.
28. Metabolizer, **2014**, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

4. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

Spisak radova publikovanih u međunarodnim časopisima

1. **V. Dobričić**, B. Marković, K. Nikolic, S. Vladimirov, O. Čudina, 17 β -carboxamide steroids – in vitro prediction of human skin permeability and retention using PAMPA technique, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2014) 52, 95-108 **M21**
2. **V. Dobričić**, K. Nikolic, S. Vladimirov, O. Čudina, Biopartitioning micellar chromatography as a predictive tool for skin and corneal permeability of newly synthesized 17 β -carboxamide steroids, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2014) 56, 105-112 **M21**
3. **V. Dobričić**, B. Marković, N. Milenković, V. Savić, V. Jačević, N. Rančić, S. Vladimirov, O. Čudina, Design, Synthesis and Local Anti-inflammatory Activity of 17 β -carboxamide Derivatives of Glucocorticoids, *Archiv der Pharmazie*, DOI: 10.1002/ardp.201400165 **M22**

Usmeno saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M32)

1. **V. Dobričić**, B. Marković, N. Milenković, V. Savić, V. Jačević, N. Rančić, S. Vladimirov, O. Čudina, Design, synthesis and local anti-inflammatory activity of novel 17 β -carboxamide steroids, 4th Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Hradec Kralove, Czech Republic, June 20-22, 2014.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

1. **Dobricic, V**; Markovic, B; Savic, V; Milenkovic, N; Vladimirov, S; Cudina, O., Molecular docking studies, synthesis and structural characterization of two novel soft

- corticosteroids, 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, September 24-28, 2012.
2. **V. Dobričić**, A. Stanišić, B. Marković, S. Vladimirov, O. Čudina, Development of reversed-phase thin-layer chromatography (RP-TLC) assay for lipophilicity assessment of 17 β -carboxamide derivatives of prednisolone and dexamethasone, 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, September 22-26, 2014 (prihvaćeno za poster sekciju).

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. **V. Dobricic**, N. Milenkovic, B. Markovic, S. Vladimirov, O. Cudina, Molecular docking as a predictive tool in rational design of soft corticosteroids derived from prednisolone, 2nd Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Ljubljana, Slovenia, September 9-11, 2012.
2. **Vladimir Dobričić**, Bojan Marković, Sote Vladimirov, Olivera Čudina, Evaluation of passive human skin permeability and human skin retention of newly synthesized 17 β -carboxamide derivatives of methylprednisolone using PAMPA test, 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Belgrade, Serbia, June 27-29, 2013.

5. Obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršena je sinteza dvadeset dva nova 17 β -karboksamidna derivata glukokortikoida. Sintetisana jedinjenja su amidi kortienskih kiselina iz hidrokortizona, prednizolona, metilprednizolona, deksametazona i

betametazona sa metil i etil estrima L-glicina, L-alanina, β -alanina i L-fenilalanina. Na osnovu *in vivo*, *in vitro* i *in silico* rezultata prikazanih u ovoj disertaciji, može se zaključiti da sintetisana jedinjenja predstavljaju potencijalno nove *soft* lekove sa boljom lokalnom antiinflamatornom aktivnošću u odnosu na konvencionalne glukokortikoide.

Docking studije su omogućile izdvajanje derivata sa potencijalno najboljom lokalnom antiinflamatornom aktivnošću i identifikaciju ključnih interakcija između glukokortikoidnog receptora (GR) i ispitivanih jedinjenja. Na osnovu energija vezivanja, efikasnosti liganda i rezultata *in vivo* ispitivanja lokalne antiinflamatorne aktivnosti sintetisanih jedinjenja, može se zaključiti da uvođenje voluminoznih i aromatičnih grupa u C17 β bočni niz ima negativan, a uvođenje manje voluminoznih supstituenata ima pozitivan efekat na vezivanje za GR i lokalnu antiinflamatornu aktivnost. Važan preduslov za dobru lokalnu antiinflamatornu aktivnost je prisustvo grupe u C17 β bočnom nizu koja gradi vodonične veze sa GR, a to je u slučaju ispitivanih derivata omogućeno prisustvom estarske grupe aminokiselina. Troparametarskim eksponencijalnim modelom je izvršeno predviđanje afiniteta odabranih jedinjenja za GR.

Predložen je najoptimalniji postupak za sintezu amida kortijskih kiselina, koji podrazumeva oksidaciju glukokortikoida perjodnom kiselinom u prvoj, odnosno dvostepeni postupak građenja amida upotrebom kupljućeg reagensa DCC u drugoj fazi sinteze. Na ovaj način, sintetisani su amidi visokog stepena čistoće (potvrđeno hromatografskim tehnikama - TLC i HPLC) u zadovoljavajućem prinosu (31,8 - 83,5%).

Procena lipofilnosti jedinjenja koja se primenjuju lokalno na kožu predstavlja važno fizičko-hemijsko ispitivanje, jer lipofilnost utiče na permeabilnost i retenciju u koži, kao i na biološku aktivnost. Lipofilnost se najčešće ispituje *shake-flask* metodom, ali se poslednjih godina u ovu svrhu sve češće koriste hromatografske tehnike (TLC i HPLC). U ovoj disertaciji je predložena RP-TLC metoda i formirani su matematički modeli koji se mogu koristiti za jednostavno i brzo predviđanje logP vrednosti novih amida kortijskih kiselina.

QSPR i QSRR analizama dobijenih rezultata PAMPA testa i BMC ispitivanja identifikovane su najvažnije funkcionalne grupe koje utiču na permeabilnost i retenciju ovih derivata u koži. Formirani QSPR i QSRR modeli uspostavljaju funkcionalnu

zavisnost između geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora i odgovarajućih PAMPA ($\log P_e$ i R) i BMC (k) parametara.

Primenom testa inhibicije edema izazvanog krotonskim uljem na uhu pacova utvrđeno je da se maksimalna inhibicija edema kod svih jedinjenja postiže na znatno nižoj koncentraciji u odnosu na deksametazon (uz značajno niže EC_{50} vrednosti). Lokalna antiinflamatorna aktivnost je za većinu derivata slična ili viša u odnosu na deksametazon. Sistemski neželjeni efekti derivata sa najboljom lokalnom antiinflamatornom aktivnošću (MPEA, BEG i BG) su značajno niži u poređenju sa deksametazonom. 3D-QSAR analizom definisane su farmakofore sa najvećim uticajem na lokalnu antiinflamatornu aktivnost i formiran je 3D-QSAR model.

Zaključci izvedeni iz *docking* studija, troparametarski eksponencijalni model za predviđanje afiniteta za GR, QSPR, QSRR i 3D-QSAR modeli se mogu upotrebiti kao polazna tačka u dizajniranju novih amida kortijskih kiselina sa povoljnim odnosom retencija/permeabilnost kroz kožu i dobrom lokalnom antiinflamatornom aktivnošću.

6. Zaključak i predlog Komisije

Doktorska disertacija, koja je obuhvatila dizajniranje, sintezu, ispitivanje fizičko-hemijskih i bioloških osobina dvadeset dva amida kortijskih kiselina konvencionalnih glukokortikoida, predstavlja značajan naučni doprinos za oblast Farmaceutsko-medicinska hemija i strukturna analiza. Rezultati doktorske disertacije publikovani su u **3 rada** u časopisima od međunarodnog značaja (2 u vrhunskom međunarodnom časopisu **M21** i 1 u istaknutom međunarodnom časopisu **M22**), kao i u vidu **1 usmenog saopštenja** sa međunarodnog skupa štampanog u izvodu (**M32**), **2 saopštenja** sa međunarodnih skupova štampana u celini (**M33**) i **2 saopštenja** sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (**M34**).

Uzimajući u obzir sve što je izloženo, predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj i uputi Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Vladimira Dobričića pod nazivom:

**„Dizajniranje, sinteza, fizičko-hemijske i biološke osobine amida kortienskih
kiselina antiinflamatornih steroida“**

1. _____
Dr sc. Olivera Čudina (mentor, predsednik komisije),
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu –
Farmaceutski fakultet

2. _____
Dr sc. Bojan Marković, docent, Univerzitet u
Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. _____
Dr sc. Katarina Nikolić, docent, Univerzitet u
Beogradu – Farmaceutski fakultet

4. _____
Dr sc. Sote Vladimirov, redovni profesor, Univerzitet
u Beogradu – Farmaceutski fakultet

5. _____
Dr sc. Vesna Jačević, viši naučni saradnik, Centar za
kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija,
Beograd

U Beogradu, 18.07.2014.

