

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

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na sednici održanoj 14.09.2017. godine, donelo je **Odluku (broj 1660/2)** kojom je imenovana **Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije** pod naslovom: „**Derivati etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline sa potencijalnim citotoksičnim dejstvom – *in silico/in vitro* fizičko-hemijska i *ADME* karakterizacija**“, kandidata **mr sc. Biljane Tubić**, višeg asistenta na Katedri za farmaceutsku hemiju Medicinskog fakulteta – studijski program Farmacija, Univerziteta u Banjoj Luci i pomoćnika direktora za Sektor za lekove u Agenciji za lijekove i medicinska sredstva Bosne i Hercegovine.

Komisija u sastavu:

- 1. Dr sc. Bojan Marković, vanredni profesor, mentor, predsednik komisije,**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 2. Dr sc. Sote Vladimirov, redovni profesor,**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
- 3. Dr sc. Tibor Sabo, redovni profesor,**
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet
- 4. Dr sc. Svjetlana Stojisavljević-Šatara, redovni profesor,**
Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet
- 5. Dr sc. Vladimir Dobričić, docent,**
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

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

I Z V E Š T A J

1 PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija mr sc. Biljane Tubić pod nazivom „**Derivati etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline sa potencijalnim citotoksičnim dejstvom – *in silico/in vitro* fizičko-hemijska i *ADME* karakterizacija**“ napisana je na 226 strana standardnog

formata (prored 1,5; font *Book Antiqua* - 12). Doktorska disertacija sadrži **Rezime** na srpskom i **Abstract** na engleskom jeziku, a sastoji se iz sledećih poglavlja: **1. Uvod**, **2. Cilj rada**, **3. Eksperimentalni deo**, **4. Rezultati i diskusija**, **5. Zaključak**, **6. Literatura**, **7. Prilozi**.

Disertacija sadrži 58 slika, 35 tabela i 163 literaturna navoda.

2 OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U ovoj doktorskoj disertaciji opisan je razvoj i validacija savremene separacione hromatografske metode UHPLC (visoko efikasne tačne hromatografije – eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) u sprezi sa MS/MS tandem masenom detekcijom (eng. *Tandem Mass Spectrometry*). Razvijena i validirana bioanalitička UHPLC-MS/MS metoda namenjena je za kvalitativno i kvantitativno određivanje (*S,S*)-*O,O*-dietil-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoata (DE-EDCP) i potencijalnog metabolita (*S,S*)-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline (EDCP) u biološkom materijalu (komercijalni serum miša) uz primenu (*S,S*)-*O,O*-dibutil-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoata (DB-PDCP) kao internog standarda. Navedene supstance ekstrahovane su iz biološkog materijala primenom metode precipitacija proteina. Razvijena bioanalitička metoda validirana je ispitivanjem sledećih validacionih parametara: selektivnost, linearnost, tačnost, preciznost, limit kvantifikacije, *recovery*, efekat matriksa i stabilnost rastvora ispitivanih supstanci. Dobijene su zadovoljavajuće vrednosti validacionih parametara. Izvršen je i međulaboratorijski transfer bioanalitičke metode, pri čemu je ispitana ponovljivost i robusnost. Na osnovu vrednosti *cross*-validacionih parametara i *Passing and Bablok* regresione analize pokazano je da je metoda robusna.

U okviru fizičko-hemijske karakterizacije ispitivanih supstanci, razvijena i validirana UHPLC-MS/MS metoda upotrebljena je za ispitivanje rastvorljivosti. Rastvorljivost supstanci DE-EDCP i EDCP eksperimentalno je ispitana u vodenim rastvorima sledećih pH vrednosti: 3, 5, 9 i 12. Rastvorljivost navedenih supstanci izračunata je i primenom računarskog programa *MarvinSketch*. Profili pH zavisne rastvorljivosti dobijeni eksperimentalno i *in silico* su upoređeni i pokazana je zadovoljavajuća podudarnost. Najveća rastvorljivost kiseline (EDCP) se postiže u izrazito baznoj i izrazito kiseljoj sredini, dok je rastvorljivost estra (DE-EDCP) povećana u izrazito kiseljoj sredini.

U okviru fizičko-hemijske karakterizacije ispitana je lipofilnost 14 jedinjenja. Ispitana je (*S,S*)-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina (EDCP) i odgovarajući estri sa metanolom (DM-EDCP), etanolom (DE-EDCP), propanolom (DP-EDCP), butanolom (DB-

EDCP) i izobutanolom (DIB-EDCP). Ispitana je i (*S,S*)-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina i odgovarajući estri sa metanolom (DM-PDCP), etanolom (DE-PDCP), propanolom (DP-PDCP), butanolom (DB-PDCP), izobutanolom (DIB-PDCP), pentanolom (DPE-PDCP) i izopentanolom (DIPE-PDCP). Lipofilnost je ispitana primenom *shake-flask* metode. Eksperimentalno određene vrednosti particionih koeficijenta *n*-oktanol-voda ($\text{Log}D_{7,4}$) ukazuju da lipofilnost supstanci raste sa povećanjem dužine alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama, kao i da je lipofilnost derivata 1,3-propandiamina veća u odnosu na odgovarajuće analoge 1,2-etandiamina. Razvijena je i brza hromatografska UHPLC-MS/MS metoda za ispitivanje lipofilnosti. Određene su vrednosti hromatografskih parametara lipofilnosti primenom metode izokraskog eluiranja (retencioni faktor k ($\log k$) i retenciono vreme (t_R)) i primenom metode gradijentnog eluiranja (indeks hidrofobnosti (CHI)).

Ustanovljena je direktna zavisnost između vrednosti particionih koeficijenata ($\text{Log}D_{7,4}$) određenih *shake-flask* metodom i hromatografskih parametara (CHI, φ_0) dobijenih UHPLC-MS metodom, kao i zavisnost između $\log D_{7,4}$ i retencionih vremena. Na osnovu hromatografskih parametara lipofilnosti razvijen je matematički model kojim se mogu predvideti vrednosti particionih koeficijenata ($\text{Log}D_{7,4}$) za potencijalne metabolite ispitivanih supstanci ili za nosintetisane derivate EDCP i PDCP. Razvijeni model je validiran primenom *leave-one-out* metode i pokazana je dobra prediktivna moć predloženog matematičkog modela ($Q^2 = 0,89$).

U okviru biofarmaceutске karakterizacije *in vitro* je procenjena gastrointestinalna permeabilnost i permeabilnost kroz krvno-moždanu barijeru primenom veštačkih membrana – PAMPA test (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*). Prikazani su rezultati dobijeni na veštačkoj membrani koju čini 1% lecitin u dodekanu – modelu za gastrointestinalnu (GIT) resorpciju i na veštačkoj membrani koju čine polarni lipidi svinjskog mozga – modelu permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru (BBB). Za sve ispitivane supstance izračunati su sledeći parametri membranske permeabilnosti: P_{app} (koeficijent permeabilnosti), $C_{A(t)}/C_{D(0)}$ (parametar permeabilnosti), Pe (koeficijent efektivne permeabilnosti), %*R* (retencija, odnosno zadržavanje ispitivane supstance u membrani) i *J*-flux (proticanje - brzina prenosa).

Na osnovu grafičkog prikaza zavisnosti %*R* i $C_{A(t)}/C_{D(0)}$ na veštačkoj membrani GIT-a utvrđeno je da sve ispitivane supstance pripadaju klasi III permeanata (visok % zadržavanja u membrani, a nizak % prolaznosti kroz membranu), osim supstanci EDCP, DPE-PDCP i DIPE-PDCP koje pripadaju klasi I permeanata (nizak % zadržavanja u membrani i nizak %

prolaznosti kroz membranu). Poređenjem dobijenih rezultata, utvrđeno je da se derivati 1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline u većem % zadržavaju u membrani, kao i da imaju više vrednosti P_{app} u odnosu na derivate 1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline. Najviše vrednosti za parametre %*R* i *Pe* dobijene su za dietil estre (DE-EDCP i DE-PDCP).

Na osnovu grafičkog prikaza zavisnosti %*R* i $C_{A(t)}/C_{D(0)}$ na veštačkoj membrani BBB-a ustanovljeno je da ispitivane supstance pripadaju klasi III permeanata (visok % zadržavanja u membrani i nizak % prolaznosti kroz membranu), osim supstanci EDCP i PDCP koje pripadaju klasi I permeanata (nizak % zadržavanja u membrani i nizak % prolaznosti kroz membranu) i supstance DIB-PDCP za koju je određeno da pripada klasi IV permeanata (visok % zadržavanja u membrani i visok % prolaznosti kroz membranu). Obe kiseline (EDCP i PDCP) pokazuju nisku permeabilnost i nizak % retencije na obe ispitane veštačke membrane (klasa I permeanata). Esterifikacijom karboksilnih grupa dobijaju se više vrednosti parametara permeabilnosti. Kod dietilestra obe kiseline (DE-EDCP i DE-PDCP) značajno se povećava zadržavanje u membrani, a raste i efektivna membranska permeabilnost. Međutim, sa daljim produžavanjem alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama nije zabeleženo povećanje zadržavanja u membrani ili povećanje permeabilnosti.

Uporedo sa *in vitro* biofarmaceutskom karakterizacijom ispitivanih supstanci urađena je njihova *in silico* biofarmaceutska karakterizacija primenom odgovarajućih računarskih programa. Izvršena su predviđanja najverovatnijih metaboličkih reakcija primenom računarskog programa *Metabolizer*. Najverovatnija metabolička reakcija i kod derivata 1,2-etandiamina i kod derivata 1,3-propandiamina je hidroliza jedne ili obe estarske grupe pri čemu se dobija odgovarajuća kiselina. Za derivate 1,2-etandiamina predviđena su još dva metabolička puta, kojima podleže kiselina EDCP, kao potencijalni metabolit svih estarskih derivata 1,2-etandiamina. Tokom ove metaboličke reakcije dolazi do intramolekulske ciklizacije i nastaje laktam-alkilestar, odnosno, daljom hidrolizom i druge estarske grupe nastaje laktam-karboksilat.

Predviđanje apsorpcije, distribucije, metabolizma, eliminacije i toksičnosti za sve ispitivane supstance, potencijalne metabolite i oficinalne lekove - citostatike iz grupe platinskih derivata: cisplatin, karboplatin, oksaliplatin i satraplatin, urađeno je primenom računarskog programa *ADME(T) predictor*. Sve ispitivane supstance i potencijalni metaboliti pokazuju hepatotoksičnost, osim DE-PDCP. Za sve ispitivane supstance i potencijalne metabolite, osim onih sa najnižim vrednostima particionog koeficijenta (EDCP, DM-EDCP,

PDCP i DM-PDCP) utvrđen je rizik da se u velikoj meri mogu metabolisati uz pomoć enzima CYP3A4.

Molekulski *docking* na računarskom programu *Autodock Vina* upotrebljen je za predviđanje molekularnog mehanizma dejstva ispitivanih supstanci. Odabir ciljnih mesta na kojima je rađen *docking* vršen je u odnosu na rezultate prethodno izvedenih *in vitro* ispitivanja na ćelijskim linijama sa ispitivanim supstancama (ćelijska linija akutne promijelocitne leukemije HL-60 i ćelijska linija humanog glioma U251 su se pokazale kao najosetljivije na citotoksično delovanje novosintetisanih supstanci) i na osnovu podataka iz literature o ostvarivanju antiproliferativnog dejstva dostupnih hemioterapeutika. *Docking* studija je izvedena za ciljna mesta uključena u signalne ćelijske puteve (različite protein kinaze), ciljna mesta - matriks-metaloproteaze i ciljna mesta uključena u mitohondrijalni put smrti. Rezultati izvedene *docking* studije ukazali su na sledeće ključne interakcije:

- ⇒ Vodonične veze karboksilnih grupa i sekundarnog amina sa aminokiselinskim ostacima na ciljnim mestima;
- ⇒ Hidrofobne alkil i π -alkil interakcije između cikloheksil funkcionalne grupe i aminokiselinskih ostataka na ciljnim mestima;
- ⇒ Nespecifične interakcije između CH- grupa i aminokiselinskih ostataka na ciljnim mestima.

Na osnovu prikazanih rezultata dobijenih u sprovedenim *docking* studijama može se pretpostaviti da ispitivane supstance antiproliferativno dejstvo ostvaruju putem više mehanizama (ćelijski signalni put, matriks-metaloproteaze i mitohondrijalni put). Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da je esterifikacija ispitivanih supstanci neophodna kako bi se osigurala njihova optimalna lipofilnost. Produžetak niza radikala koji ulaze u sastav estarskih funkcionalnih grupa otežava hidrolizu. Ujedno, membranska permeabilnost ispitivanih supstanci nije direktno zavisna od dužine ovih radikala. Navedeni podaci ukazuju na hipotezu da su aktivne kiseline i neki od potencijalnih metabolita: laktam-karboksilat i laktam-alkilestar, a estri su *pro drug* supstance.

3 UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Ispitivane supstance su derivati (*S,S*)-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline čija sinteza je opisana u literaturi¹⁻³ i derivati (*S,S*)-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina čija sinteza je takođe opisana u literaturi.^{3,4} *In vitro* citotoksična aktivnost derivata 1,2-etandiamina ispitana je na humanim leukemijskim

ćelijama i mononuklearnim ćelijama izolovanim iz uzorka periferne krvi zdravih dobrovoljaca i obolelih od leukemije: humana promijelocitna leukemija (HL-60), limfocitna (REH), mijelogena eritroleukemija (K562), akutna mijelogena (KG-1), akutna limfoblastna (MOLT-4) i B-promijelocitna leukemija (JVM-2).⁵ U sprovedenim ispitivanjima najveću aktivnost je pokazao dietilestar (DE-EDCP), a sa povećavanjem alkil niza uočeno je smanjenje aktivnosti: etil-estar>metil-estar>propil-estar>butil-estar=kiselina.⁵ HL-60 ćelijska linija pokazala se kao najosetljivija na citotoksično dejstvo ispitivanih jedinjenja. Citotoksičnost etil-estarskog derivata 1,2-etandiamina ispitana na HL-60 ćelijskoj liniji iznosi $IC_{50}=10,7-45,4 \mu M$ što je bilo statistički značajno ($p<0,05$) i istog je reda veličine kao i citotoksičnost cisplatine iako DE-EDCP ne sadrži platinu.⁵ U subtoksičnim dozama DE-EDCP dovodi do diferencijacije HL-60 ćelija, a poznato je da viši stepen diferencijacije maligne ćelije znači i manji stepen njene agresivnosti. Objavljeni rezultati dosadašnjih ispitivanja ukazuju i na selektivno delovanje DE-EDCP jedinjenja, jer su na citotoksično dejstvo osetljivije maligne ćelije u odnosu na zdrave.⁵

In vitro citotoksična aktivnost jedinjenja PDCP, DM-PDCP, DE-PDCP, DP-PDCP, DB-PDCP i DIB-PDCP ispitana je na pet tumorskih ćelijskih linija: gliom pacova (C6) i humani gliom (U251), mišji fibrosarkom (L929), humani neuroblastom (SHSY-5Y) i humana promijelocitna leukemija (HL-60).⁴ *In vitro* citotoksična aktivnost jedinjenja DIB-PDCP, DPE-PDCP, DIPE-PDCP ispitana je na šest tumorskih ćelijskih linija: karcinom grlića materice (HeLa), alveolarni bazalni adenokarcinom (A549), karcinom dojke (MDA-MB-231), kolorektalni adenokarcinom (LS-174), humana ćelijska linija fibroblasta iz pluća (MRC-5) i humana ćelijska linija endotela (EA.hy 926).⁴

U cilju sprovođenja prekliničkih ispitivanja sa novosintetisanim jedinjenjima i ispitivanja citotoksične aktivnosti u *in vivo* uslovima bilo je potrebno razviti bioanalitičku metodu za kvalitativnu i kvantitativnu analizu supstanci iz biološkog materijala. Da bi se bioanalitička metoda primenila, potrebno je aktivnu supstancu ekstrahovati iz biološkog materijala. U literaturi su opisane metode za ekstrakciju analita iz biološkog materijala.^{6,7} Za sprovođenje ekstrakcije derivata 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina odabrana je metoda precipitacija proteina, primenom pet zapremina acetonitrila (ACN) i ultracentrifugiranjem na niskoj temperaturi. Ispitivane supstance su estarske prirode i prisustvo kiselina ili baza, koje se koriste kod drugih vidova ekstrakcije mogu izazvati hidrolizu. U literaturi su opisane sledeće bioanalitičke metode za farmaceutske supstance:

- ⇒ klasične hromatografske tehnike udružene sa masenom spektrometrijom:
- ⇒ gasna hromatografija spregnuta sa masenom spektrometrijom (GC-MS),

- ⇒ tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) ili pod ultra visokim pritiskom (UHPLC) spregnuta sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS),
- ⇒ tehnike vezivanja liganada (RIA, ELISA).

Bioanalitička metoda koja je razvijena i validirana za ispitivane supstance je UHPLC-MS/MS. U razvoju metode upotrebljen je model analitičke metode određivanja etambutola u biološkom materijalu.⁸ Etambutol kao i ispitivane supstance imaju u molekulskoj strukturi diaminski most. Validacija metode izvršena je prema smernicama EMA⁹ i FDA.¹⁰ U sklopu validacije metode urađen je i međulaboratorijski transfer.¹¹⁻¹⁴ Bilo je značajno pokazati da je razvijena UHPLC-MS/MS metoda robusna i ponovljiva, jer je namenjena za praćenje ispitivanih supstanci u *in vivo* uslovima tokom prekliničkih ispitivanja.

Razvijena metoda validirana je i u rastvoru, u fosfatnom puferu pH=7,4, a potom upotrebljena za ispitivanje rastvorljivosti DE-EDCP i EDCP. Ispitivanje rastvorljivosti je važan korak u biofarmaceutskoj karakterizaciji aktivnih supstanci. Rastvorljivost je ispitana na osnovu metoda OECD smernica,¹⁵ a dobijeni rezultati su ocenjeni prema podacima iz poglavlja „*General Notice*“ važeće 9. Evropske Farmakopeje (Ph.Eur) i poglavlja „Opšti podaci“ V Jugoslovenske Farmakopeje (Ph.Jug). Eksperimentalno dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenim primenom programa *MarvinSketch* i uočena je zadovoljavajuća podudarnost.

Za biofarmaceutsku karakterizaciju supstanci bitno je odrediti parametre lipofilnosti. Lipofilnost supstance izražava se kao *n*-oktanol/voda particioni koeficijent (LogP) ukoliko su u pitanju nenaelektrisane (neutralne) molekule, odnosno, kao distribicioni koeficijent (LogD) ukoliko su u pitanju naelektrisane (jonizovane) molekule.¹⁶ *Shake-flask* metoda predstavlja klasičnu proceduru za direktno određivanje LogP i LogD.¹⁷ Za određivanje lipofilnosti farmaceutskih supstanci razvijene su nove *in vitro* metode: imobilisane hromatografske tehnike, veštačke membrane, ili raspodela lipozom-voda.¹⁸⁻²⁴ U ovoj doktorskoj disertaciji za određivanje particionog koeficijenta $\text{Log}D_{7,4}$ ispitivanih supstanci upotrebljena je tradicionalna *shake-flask* metoda. Za određivanje hromatografskih parametara lipofilnosti ($\log k'$, CHI, φ_0) razvijena je UHPLC-MS/MS metoda. Matematički modeli, koji predstavljaju korelaciju parametara lipofilnosti dobijenih primenom *shake-flask* metode i primenom hromatografskih parametara se validiraju. Ukoliko trening set supstanci nije veliki, najčešće primenjivana validaciona tehnika je *leave-one-out* (LOO).²⁵ Pomenuta tehnika je primenjena za validaciju razvijenog matematičkog modela kojim je uspostavljena korelacija između parametara lipofilnosti dobijenih primenom *shake-flask* metode i primenom UHPLC-MS/MS metode čime su stvorene mogućnosti za predviđanje particionog koeficijenta za potencijalne

metabolite i novosintetisane derivate 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina na osnovu hromatografskih parametara. Rezultati ispitivanja pokazuju da parametri lipofilnosti ispitivanih supstanci imaju više vrednosti sa porastom alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama.

Permeabilnost farmaceutske supstance je veoma značajan parametar na osnovu kojeg se predviđa bioraspoloživost. Za ispitivanje permeabilnosti koristi se PAMPA tehnika, koju su prvi put uveli Kansy i saradnici, a koristi se za brzu procenu permeacije lekova, koja se uglavnom odvija pasivnom difuzijom i transcelularnim transportom. Metoda ima veliku primenu u postupku ocene kandidata za budući lek.²⁶⁻²⁹ U doktorskoj disertaciji primenjena je PAMPA tehnika u jednostavnim uslovima (jednokomponentna membrane, izokratski pH, sobna temperatura). Kao veštačka membrana upotrebljen je 1 % rastvor lecitina jajeta kojim se simulira membrana GIT-a i u drugom eksperimentu polarni svinjski lipidi kojima se simulira BBB. Rezultati ispitivanja pokazuju da parametri membranske permeabilnosti ispitivanih supstanci nemaju porast vrednosti sa porastom alkil niza na estarskim funkcionalnim grupama.

In silico tehnike se koriste za predviđanje biofarmaceutskih karakteristika molekula: lipofilnost, permeabilnost, apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija, toksičnost, način vezivanja za ciljna mesta, kao i za određivanje odnosa strukture i dejstva. Njihovom primenom moguće je predvideti ponašanje analiziranih supstanci u *in vivo* uslovima. U pojedinim situacijama mogu biti adekvatna zamena za životinjske eksperimentalne modele. Imaju prednost u prekliničkim ispitivanjima, jer se njihovom primenom izbegava nekritično i prekomereno korišćenje životinjskih eksperimentalnih modela. Značajne su zbog racionalizacije primene eksperimentalnih životinja u razvoju lekova. Russell je sa saradnicima prvi put uveo 3R princip 1959. godine. 3R princip daje dobru osnovu i podršku razvoju i primeni *in silico* tehnika.³⁰ Za *in silico* biofarmaceutsku karakterizaciju supstanci koriste se različiti računarski programi: *ADME(T) predictor*, *Metabolizer*, *AutoDock Vina* i dr. *AutoDock Vina* je računarski program u kojem se izvodi molekularski *docking* i *virtual screening*. Molekularski *docking* ili metoda uklapanja je široko korišćena metoda kojom se objašnjavaju molekularni mehanizmi dejstva lekova, a koristi se i za racionalizaciju odnosa strukture i dejstva.³¹ U radu su primenjeni *Metabolizer* za predviđanje najverovatnijih metaboličkih reakcija i metabolita, *ADME(T)-predictor* za predviđanje apsorpcije, distribucije, metabolizma, eliminacije i toksičnosti i Molekularski *docking* za predviđanje molekularnog mehanizma citotoksičnog dejstva.

CITIRANA LITERATURA:

1. Atoh M., Kashiwabara K., Fujita J. Preparation and Stereochemistry of Cobalt (III) Complexes Containing (3 S, 8 S)-3, 8-Dimethyl-1, 1, 10, 10-tetraphenyl-4, 7-diaza-1, 10-diphosphadecane or (4 S, 9 S)-2, 4, 9, 11-Tetramethyl-5, 8-diaza-2, 11-diphosphadodecane (SS-Me₂-mm-PNNP). Molecular Structure of (+) 589-Λ-cis β-[Co (acac)(SS-Me₂-mm-PNNP)](ClO₄) 2· H₂O (acac=C₅H₇O₂⁻). *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 3492-3499.
2. Haydock D., Mulholland T. Some derivatives of NN'-biscarboxymethyl-and NN'-bis-(β-carboxyethyl)-ethylenediamine. *J.Chem.Soc.C.* **1971**, 2389-2395.
3. Kaluđerović G.N., Schmidt, H., Steinborn, D., Sabo, T. J. Inorganic Biochemistry, Research progress, 1st Edn. Nova Science Publisher, Inc, New York, **2008**, p. 305.
4. Savić A., Misirlić-Denčić S., Dulović M., Mihajlović-Lalić L.E., Jovanović M., Grgurić-Šipka S., Marković I., Sabo T.J. Synthesis, characterization and ROS-mediated cytotoxic action of novel (S, S)-1, 3-propanediamine-N, N'-di-2-(3-cyclohexyl) propanoic acid and corresponding esters. *Bioorg. Chem.* **2014**, *54*, 73-80.
5. Misirlic Dencic S., Poljarevic J., Vilimanovich U., Bogdanovic A., Isakovic A.J., Kravic Stevovic T., Dulovic M., Zogovic N., Isakovic A.M., Grguric-Sipka S., Bumbasirevic V., Sabo T., Trajkovic V., Markovic I. Cyclohexyl analogues of ethylenediamine dipropanoic acid induce caspase-independent mitochondrial apoptosis in human leukemic cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 931-939.
6. Prabu S.L., Suriyaprakash T. Extraction of drug from the biological matrix: a review. Applied biological engineering-principles and practice: InTech; 2012.
7. Otašević B., Protić A., Golubović J., Zečević M., Cerović M., Bralović L. Razvoj metode čvrsto-tečne ekstrakcije za prečišćavanje mikofenolne kiseline iz uzoraka salive. *Arh. Farm. (Belgr).* **2014**, *64*, 247-260.
8. Jia L., Tomaszewski J.E., Noker P.E., Gorman G.S., Glaze E., Protopopova M. Simultaneous estimation of pharmacokinetic properties in mice of three anti-tubercular ethambutol analogs obtained from combinatorial lead optimization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 793-799.
9. Viswanathan C., Bansal S., Booth B., DeStefano A.J., Rose M.J., Sailstad J., Shah V.P., Skelly J.P., Swann P.G., Weiner R. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1962-1973.

10. Zimmer D. New US FDA draft guidance on bioanalytical method validation versus current FDA and EMA guidelines: chromatographic methods and ISR. *Bioanalysis*. **2014**, *6*, 13-19.
11. Peters F.T., Maurer H.H. Review: Bioanalytical method validation—How, how much and why? *Toxicchem Krimtech*. **2001**, *68*, 116-126.
12. Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D., McDowall R. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 193-218.
13. Branch S.K. Guidelines from the international conference on harmonisation (ICH). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 798-805.
14. Rozet E., Dewé W., Morello R., Chiap P., Lecomte F., Ziemons E., Boos K., Boulanger B., Crommen J., Hubert P. Risk-based approach for the transfer of quantitative methods: Bioanalytical applications. *J. Chromatogr. A*. **2008**, *1189*, 32-41.
15. OECD. Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method. OECD Publishing.
16. Xuan X., Xu L., Li L., Gao C., Li N. Determination of drug lipophilicity by phosphatidylcholine-modified microemulsion high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pharm.* **2015**, *490*, 258-264.
17. Andrés A., Rosés M., Ràfols C., Bosch E., Espinosa S., Segarra V., Huerta J.M. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *76*, 181-191.
18. Odovic J.V., Markovic B.D., Injac R.D., Vladimirov S.M., Karljikovic-Rajic K.D. Correlation between ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and reversed-phase thin-layer chromatography hydrophobicity data for evaluation of angiotensin-converting enzyme inhibitors absorption. *J. Chromatogr. A*. **2012**, *1258*, 94-100.
19. Escuder-Gilabert L., Martinez-Pla J., Sagrado S., Villanueva-Camañas R., Medina-Hernández M. Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption. *J. Chromatogr. B*. **2003**, *797*, 21-35.
20. Henchoz Y., Bard B., Guillarme D., Carrupt P.-A., Veuthey J.-L., Martel S. Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 707-729.

21. Kotecha J., Shah S., Rathod I., Subbaiah G. Prediction of oral absorption in humans by experimental immobilized artificial membrane chromatography indices and physicochemical descriptors. *Int. J. Pharm.* **2008**, *360*, 96-106.
22. Liu X.-Y., Nakamura C., Yang Q., Kamo N., Miyake J. Immobilized liposome chromatography to study drug–membrane interactions: correlation with drug absorption in humans. *J. Chromatogr. A.* **2002**, *961*, 113-118.
23. Corti G., Maestrelli F., Cirri M., Furlanetto S., Mura P. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption: I. Assessment of artificial membrane composition. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *27*, 346-353.
24. van Balen G.P., Caron G., Bouchard G., Reist M., Carrupt P.A., Fruttero R., Gasco A., Testa B. Liposome/water lipophilicity: methods, information content, and pharmaceutical applications. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 299-324.
25. Todeschini R., Consonni V. Molecular descriptors for chemoinformatics, volume 41 (2 volume set). Vol 41. John Wiley & Sons, **2009**.
26. Zhu C., Jiang L., Chen T.-M., Hwang K.-K. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *37*, 399-407.
27. Kansy M., Senner F., Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1007-1010.
28. Sugano K., Hamada H., Machida M., Ushio H. High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. *J. Biomol. Screen.* **2001**, *6*, 189-196.
29. Wohnsland F., Faller B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 923-930.
30. Russell W.M.S., Burch R.L., Hume C.W. The principles of humane experimental technique. **1959**.
31. Atanasov A.G., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E.-M., Linder T., Wawrosch C., Uhrin P., Temml V., Wang L., Schwaiger S., Heiss E.H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1582-1614.

4 OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Spisak radova objavljenih u međunarodnim časopisima:

1. **B. Tubić**, B. Marković, S. Vladimirov, S. Savić, J. Poljarević, T. Sabo, A new model to determine lipophilicity of 1,2-ethanediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid and 1,3-propanediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid derivatives with antiproliferative activity by combining shake flask procedure and UHPLC-MS method, *Pharmazie* **2017** (72): 317-323. (M22)
2. **B. Tubić**, B. Marković, S. Vladimirov, S. Ristić, B. Ivković, M. Savić, J. Poljarević, T. Sabo, Highly sensitive UHPLC-MS/MS method for quantification of ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl) propanoic acid derivatives in mouse serum, *Acta Chromatographica* **2017** (29)2: 235-252. (M23)

Usmena saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova štampana u celini (M31):

1. **B. Tubić**, S. Vladimirov, B. Marković, Inter-laboratory reproducibility of bioanalytical UHPLC-MS/MS method, The 9th International Working Conference - Total quality management – advanced and intelligent approaches, Belgrade, 5th – 7th June 2017:
 - a. *Total quality management - advanced and intelligent approaches – proceedings*; **2017**: 59-63 (UDC 005.334;615),
 - b. *International Journal of advanced quality*; **2017** (45)2: 49-53.

Radovi prezentovani na međunarodnim naučnim skupovima štampani u celini (M33):

1. **B. Tubić**, B. Marković, S. Vladimirov, A. Savić, J. Poljarević, T. Sabo, Estimation of lipophilicity data for derivatives of alkandiamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid with potential antineoplastic activity, UHPLC-MS method, IFMBE Proceedings **2017** (62): 402-409.

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

1. **B. Tubić**, B. Marković, J. Vučković, V. Dobričić, S. Vladimirov, *In vitro/in silico* characterisation of novel substances with cytotoxic activity: 1,2-ethanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid and 1,3-propanediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid derivatives, Book of abstracts of the Conference on the 65th Anniversary of Faculty of Pharmacy, Comenius University in Bratislava - 46th EuroCongress on Drug Synthesis and Analysis, **2017**; 21-22.
2. **B. Tubić**, S. Pilipović, M. Petrović, O. Petrović, B. Ivković, B. Marković, S. Vladimirov, Estimation of permeability on artificial membrane for derivatives of alkandiamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid, *Arh.farm.* **2016**; *66/Special Issue*/161-162.
3. **B. Tubić**, S. Vladimirov, B. Marković, Inter-laboratory transfer of new UHPLC-MS/MS bioanalytical method for non-clinical, 21st International Symposium on Separation Sciences June 30th - July 3rd, **2015**, Ljubljana, Slovenia, Book of Abstracts, p. 71
4. **B. Tubić**, B. Marković, S. Vladimirov, D. Stanković, S. Ristić, M. Savić, B. Ivković, S. Vladimirov, T. Sabo, Highly sensitive ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of DE-EDCP and EDCP in mouse serum, 21st International Symposium on Separation Sciences June 30th - July 3rd, **2015**, Ljubljana, Slovenia, Book of Abstracts, p. 70
5. **B. Tubić**, B. Marković, S. Ristić, S. Vladimirov, B. Ivković, D. Stanković, T. Sabo, Highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of L3 in mouse serum, 2nd International Conference on Label Free Technologies Conference information, Mart, **2015**,
<https://elsevier.conference-services.net/secureProgramme.asp?conferenceID=3795&cuID=697936>

5 ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Hemioterapija malignih oboljenja koja su značajan uzrok mortaliteta, predstavlja veliki izazov u medicini. Lečenje obolelih sa malignim tumorima sprovodi se prema standardnim kliničkim protokolima, koji obuhvataju hirurško lečenje, radio-, hemio-, ciljanu i biološku terapiju. Odabir terapijskog modaliteta vrši se na osnovu lokaliteta malignog tumora, stadijuma razvijenosti, stepena diferencijacije malignih ćelija, dostupnosti nabrojanih terapijskih opcija i karakteristika samog pacijenta. Nedostaci u farmakoterapiji malignih tumora su nedovoljna selektivnost - posledično visoka toksičnost, kao i razvoj rezistencija na terapiju i otežano dopremanje leka kroz krvno-moždanu barijeru. Intenzivno se radi na otkrivanju novih terapijskih opcija, koje bi umanjile razvoj rezistencije, veću selektivnost, zaustavljanje rasta ćelije u G0/G fazi, čime bi lečenje malignih tumora bilo uspešnije.

Estri (*S,S*)-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline sa metanolom, etanolom, propanolom, butanolom i izobutanolom kao i estri (*S,S*)-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline sa metanolom, etanolom, propanolom, butanolom, izobutanolom, pentanolom i izopentanolom dizajnirani su kao ligandi za Pt(IV) komplekse, ali su i u nevezanom obliku pokazali značajan citotoksični efekat.

U ovoj doktorskoj disertaciji opisan je razvoj i validacija nove UHPLC-MS/MS bioanalitičke metode za buduća pretklinička ispitivanja dietil estra (*S,S*)-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline koji je u *in vitro* ispitivanjima pokazao najveću citotoksičnu aktivnost, kao i njegovog potencijalnog metabolita (*S,S*)-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline. Ispitana je međulaboratorijska ponovljivost razvijene metode što je od značaja za buduća pretklinička ispitivanja i pokazano je da je metoda robusna. Potom je na osnovu *in silico* i *in vitro* testiranja sveobuhvatno sagledan potencijal četrnaest supstanci - derivata 1,2-etandiamina i derivata 1,3-propandiamina. Razvijena metoda je primenjena za *in vitro* biofarmaceutsku karakterizaciju ispitivanih supstanci. Ispitana je i ocenjena rastvorljivost primenom *in vitro* i *in silico* metoda, a zatim su određeni parametri lipofilnosti primenom *shake-flask* metode (particioni koeficijent $\text{Log}D_{7,4}$), kao i korišćenjem tečne hromatografije, odnosno razvijene UHPLC-MS/MS metode (hromatografski parametri lipofilnosti: $\log k'$, CHI, φ_0). Razvijen je i validiran matematički model koji predstavljaju korelaciju parametara lipofilnosti dobijenih primenom *shake-flask* metode i primenom hromatografske tehnike. Razvijen matematički model pruža mogućnost da se mogu predvideti vrednosti partitionog koeficijenta ($\text{Log}D_{7,4}$) za potencijalne metabolite

ispitivanih supstanci ili za novosintetisane supstance derivate (*S,S*)-1,2-etandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i (*S,S*)-1,3-propandiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline na osnovu hromatografskih parametara lipofilnosti. Gastrointestinalna apsorpcija, kao i permeabilnost kroz krvno-moždanu barijeru je procenjena *in vitro* korišćenjem PAMPA metode. *In silico* predviđanje metaboličkih reakcija i metabolita izvršeno je primenom računarskog programa *Metabolizer* i utvrđeno je da su glavne metaboličke reakcije hidrolize estara i naknadno intramolekulska ciklizacija (građenje laktama). *In silico* predviđanje apsorpcije, distribucije, metabolizma, eliminacije i toksičnosti za sve ispitivane supstance, potencijalne metabolite i oficinalne lekove izvršeno je primenom programa *ADME(T) predictor*. Na osnovu rezultata dobijenih primenom molekuskog *docking*-a može se pretpostaviti da ispitivane supstance antiproliferativno dejstvo ostvaruju putem više mehanizama, a da su aktivne kiseline i potencijalni metaboliti: laktam-karboksilat i laktam-alkilestar, dok su estri verovatno *pro drug* supstance sa povoljnim osobinama da osiguraju dovoljnu bioraspoloživost na ciljnim mestima delovanja

Dobijeni rezultati predstavljaju adekvatne smernice za dalji pretklinički razvoj ispitivanih supstanci u cilju razumevanja mehanizma citotoksičnog dejstva, selekcije najboljih kandidata za nastavak I faze kliničkih ispitivanja, za proučavanje metabolita u *in vivo* uslovima, kao i za sintezu novih derivata 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da treba da se istraži postojanje metabolita laktam-karboksilata i laktam-alkilestra u biološkom materijalu i da se izvrše pretklinička ispitivanja sa dietilestarskim derivatima 1,2-etandiamina i 1,3-propandiamina. Bolji prolazak kroz krvno-moždanu barijeru utvrđen u *in vitro* ispitivanjima za derivate 1,3-propandiamina ukazuje da treba detaljno ispitati citotoksičnu aktivnost na glioma ćelijama.

Predlog Komisije

Na osnovu izloženog, Komisija zaključuje da je kandidat mr sc. Biljana Tubić uspešno realizovala postavljene ciljeve istraživanja i da rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti Farmaceutske-medicinske hemije i strukturne analize.

Rezultati doktorske disertacije publikovani su u 2 rada u časopisima međunarodnog značaja (jedan rad u međunarodnom časopisu (M23), jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)), 1 predavanje po pozivu sa međunarodnog skupa štampano u celini (M31), 1

saopštenje na međunarodnom naučnom skupu štampano u celini (M33), 5 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u izvodu (M34).

Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju mr sc. Biljane Tubić i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 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:

„Derivati etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline sa potencijalnim citotoksičnim dejstvom – *in silico/in vitro* fizičko-hemijska i *ADME* karakterizacija”

Članovi Komisije:

1. _____
Dr sc. Bojan Marković, vanredni profesor,
mentor, predsednik komisije,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. _____
Dr sc. Sote Vladimirov, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. _____
Dr sc. Tibor Sabo, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet
4. _____
Dr sc. Sveltana Stojisavljević Šatara, redovni profesor,
Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet
5. _____
Dr sc. Vladimir Dobričić, docent,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

U Beogradu, 16. 11. 2017.