

Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Predmet: Izveštaj Komisije za ocenu doktorske disertacije

Kandidat: Miloš Jovanović, magistar farmacije

Naziv teme: „Sinteza longamida B i analoga ramnolipida i njihova fizičko-hemijska i biološka karakterizacija”

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 30. januara 2020. godine, izabrani smo u Komisiju za ocenu doktorske disertacije Miloša Jovanovića, magistra farmacije, asistenta na Katedri za organsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, prijavljene pod naslovom:

„ Sinteza longamida B i analoga ramnolipida i njihova fizičko-hemijska i biološka karakterizacija“

Pošto smo podnetu disertaciju pregledali, podnosimo Nastavno-naučnom veću sledeći

IZVEŠTAJ

Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Tekst doktorske disertacije magistra farmacije Miloša Jovanovića podeljen je u sledeće celine: Uvod, Naši radovi, Zaključak, Eksperimentalni deo i Literatura.

U uvodnom delu doktorske disertacije napravljen je literaturni pregled biosurfaktanata u kontekstu njihovog značaja i primene, sa posebnim osvrtom na ramnolipide kao jednim od predstavnika sa najvećim potencijalom za širu komercijalnu

upotrebu. Prikazane su sintetske metodologije za dobijanje ramnolipida kao i do sada u naučnoj literaturi objavljene modifikacije ramnolipida. Drugi deo uvoda fokusiran je na antimikrobne bromopirolske alkaloidne te je napravljen pregled do sada razvijenih sinteza njihovih značajnijih derivata.

U odeljku naši radovi kandidat opisuje rezultate svojih istraživanja u nekoliko celina. U prvom delu prikazane su sistematske strukturne modifikacije ramnolipida koje obuhvataju zamenu ramnoze drugim šećerima, heterociklusima i aminokiselinama, varijaciju dužine alifatičnog niza i funkcionalizaciju karboksilne grupe. Nakon toga detaljno je opisano istraživanje uticaja strukturnih modifikacija na fizičko-hemijske osobine (kritična micelarna koncentracija, površinski napon, indeks pene itd.) Profilisanje analoga ramnolipida uključivalo je i evaluaciju antimikrobnih osobina molekula na dve potencijalno patogene vrste: *Pseudomonas aeruginosa* i *Candida albicans*. Nakon inicijalnog skrininga utvrđeno je da aminokiselinski derivati pokazuju potentno inhibitorno dejstvo na formiranje biofilma *C. albicans*. SAR studijom pokazano je da najaktivniji derivati imaju u svom sastavu leucinske ostatke, kao i da se sa povećanjem lipofilnosti alifatičnog lanca povećava aktivnost jedinjenja. U nastavku, serijom dodatnih bioloških testova utvrđeno je da se anti-biofilm aktivnost jedinjenja zasniva na njihovoj sposobnosti da inhibiraju adheziju *C. albicans* na površine.

U drugom delu naših radova prikazan je razvoj strategije za sintezu bromopirolskih alkaloida. Retrosintetskom analizom je pretpostavljeno da se osnovni skelet ovih prirodnih proizvoda može dobiti reakcijama hidroaminacije aminoalena. Nakon retrosintetske analize sintetisan je ključni prekursor, aminoalen dobijen iz L-prolina. Dalje, ispitivanjem reakcije ciklizacije u prisustvu različitih prelaznih metala optimizovani su uslovi reakcije koji su podrazumevali korišćenje AgNO_3 i CaCO_3 kao aditiva. U narednim koracima ciklizacioni proizvod preveden je strukturnim modifikacijama u bromopirolske alkaloidne longamid B i stilizin D. Metodologija je proširena razvojem reakcija karboaminacija katalizovanih paladijumom na istom ciklizacionom prekursoru. Ovaj tip reakcije omogućio je funkcionalizaciju longamida B arilnim supstituentom. Naposletku je ispitana antimikrobna aktivnost odabranih derivata longamida.

U Zaključku su sumirani rezultati za obe pomenute oblasti istraživanja dobijeni u okviru ove doktorske disertacije.

U Eksperimentalnom delu kandidat daje detaljan opis eksperimentalnih procedura kojima su sintetisana nova jedinjenja. Navedene su i fizičko-hemijske osobine kao i strukturne karakteristike jedinjenja dobijene primenom savremenih instrumentalnih tehnika (NMR, IR, HRMS). Opisane su i procedure korišćene u ispitivanju fizičko hemijskih i antimikrobnih osobina sintetisanih jedinjenja.

Poslednje poglavlje, literatura, navodi originalne izvore 177 publikacija, citirane tokom pisanja doktorske disertacije, koji obuhvataju radove relevantne za problematiku predstavljenog istraživačkog rada.

Opis postignutih rezultata

Doktorska disertacija kandidata razmatra dva pristupa za dobijanje biološki aktivnih jedinjenja. Jedan pristup se zasniva na modifikacijama prirodnog proizvoda u cilju pronalaženja potentnijih molekula, dok drugi pristup obuhvata razvoj optimizaciju sintetskog postupka molekula od interesa i diverzifikaciju strukture kroz varijacije sintetskog postupka.

Ramnolipidni analozi

Sistematskim strukturnim modifikacijama kreirana je biblioteka ramnolipidnih analoga. Kao osnovni gradivni blok u ovoj studiji korišćena je 3-hidroksioktanska kiselina, dobijena iz biopolimera. Ovakva strategija omogućava ekološki prihvatljiv pristup pronalaženju novih jedinjenja ramnolipidnog tipa. Proučavani su strukturni elementi neophodni za ispoljavanje površinske aktivnosti, antimikrobne i anti-biofilm aktivnosti.

1) Utvrđeno je da zamenom ramnoze, ekonomski pristupačnijim šećerom poput glukoze ili laktoze, površinska aktivnost ostaje očuvana. U poređenju sa ramnolipidima i ovi derivati imaju niže kritične micelarne koncentracije i snižavaju površinski napon vode u proseku za 5 jedinica više od ramnolipida. Osim toga jedinjenja ovog tipa su u potpunosti biodegradabilna pa predstavljaju ekološki prihvatljivu alternativu komercijalnim surfaktantima.

2) Zamenom ramnoze polarnim fosfatnim ostatkom dobijen je derivat sa izraženom površinskom aktivošću (CMC 162 mg/L i γ 40 mN/m) i očuvanom biorazgradljivošću. Time je pokazano da se na jednostavan način iz pristupačnih molekula mogu dobiti jedinjenja sa karakteristikama biosurfaktanta.

3) Zamenom ramnoze aminokiselinama dobijena su jedinjenja koja imaju znatno drugačije fizičko-hemijske karakteristike u poređenju sa ramnolipidima. Ustanovljeno je da ovaj tip jedinjenja ne pokazuje površinsku aktivnost dok im je biorazgradivost potpuna. Sa druge strane ovakva derivatizacija rezultuje jedinjenjima sa izraženim antimikrobnim i anti-biofilm svojstvima.

4) Utvrđeno je da se uvođenjem peptidnog ostatka kod kojeg je N-terminalna aminokiselina lizin povećava antimikrobna aktivnost na *P. aeruginosa* i *C. albicans* u poređenju sa ramnolipidima. Dužina peptidnog niza nije imala uticaja na aktivnost.

5) Ustanovljeno je da je najpotentnije svojstvo peptidnih derivata njihova anti-biofilm aktivnost, tj. sposobnost inhibicije formiranja biofilma *C. albicans*. Lipopeptidi koji sadrže benzil ester i lipofilne aminokiselinske ostatke (leucin, fenilalanin i metionin) pokazali su najveći stepen inhibicije formiranja biofilma. Dužina alifatičnog lanca poboljšava njihova anti-biofilm svojstva ali isto tako povećava i njihovu *in vitro* citotoksičnost. Ustanovljeno je da je optimalan broj aminokiselina u peptidnom nizu jedna ili dve, a da dalje produženje peptidnog niza rezultuje slabljenjem njihove aktivnosti. Karboksilna grupa 3-hidroksikiseline može biti u obliku metil i benzil estera. Mada su jedinjenja sa obe grupe estara pokazivale aktivnost, najaktivniji derivati sadržali su benzil-estar.

6) SAR studija je ukazala na veliku osetljivost anti-biofilm aktivnosti prema strukturnim karakteristikama aminokiselinskih komponenti. Primećeno je, između ostalog, da se zamenom leucina izoleucinom značajno umanjuje uticaj jedinjenja na formiranje biofilma *C. albicans*. Uzimajući u obzir ove stroge strukturne zahteve pretpostavljeno je da ispitivani lipopeptidi imaju specifične targete na površini *C. albicans* u vidu adhezina ili manoproteina.

7) Dodatni eksperimenti, ispitivanje uticaja jedinjenja na adheziju *C. albicans* i na prelazak *C. albicans* iz kvasolikog u filamentozni oblik, ukazali su na činjenicu da lipopeptidni derivati pri inhibiciji formiranja biofilma konkretno ispoljavaju svoje dejstvo u fazi adhezije. Poznato je da u ovoj fazi ključnu ulogu imaju adhezini i manoproteini na površini *C. albicans*.

8) Zapaženo je da najpotentnija jedinjenja, derivati leucina, inhibiraju formiranje biofilma bez uticaja na rast fungalnih ćelija. Na ovaj način se minimalno doprinosi razvoju rezistencije kod *C. albicans*. Stoga se može zaključiti da ovaj tip jedinjenja može poslužiti kao osnova za razvoj novih terapijskih opcija u borbi protiv infekcija izazvanih kandidom.

Bromopirolski alkaloidi

Drugi deo doktorske disertacije bavi se ispitivanjem ciklizacionih reakcija alena u cilju razvoja sintetskog puta za dobijanje bromopirolskih alkaloida.

1) Pretpostavljeno je da se osnovni strukturni motiv bromopirolskih alkaloida, piperazinonsko jezgro, može dobiti intramolekulskim nukleofilnim adicijama na alene katalizovanim prelaznim metalima. Ciklizacioni prekursor dobijen je serijom reakcija iz

prolina čija hiralnost omogućava stereoselektivnost ciklizacionog koraka.

2) Nakon serije eksperimenata utvrđeno je da se reakcija ciklizacije aminoalenskog prekursora uspešno odvija u prisustvu Ag, Au i Cu soli. U poređenju sa ostalim metalima, reakcija u prisustvu Ag ima znatno kraće reakciono vreme (18h u poređenju sa 5 dana). Od Ag soli po prinosu su se izdvojio AgNO₃ koji u prisustvu CaCO₃ u smesi acetona i vode omogućava potpunu konverziju do ciklizacionog proizvoda. Prinos nakon izolovanja iznosio je 83%. Proizvod je dobijen kao smesa dijastereoizomera u odnosu 17 : 83. Analizom ROESY spektara ustanovljeno je da je stereochemija glavnog proizvoda *trans* odnosno da odgovara stereochemiji prirodnog proizvoda – longamida B. U nastavku sintze uspešno je dobijen longamid B. Amidacijom longamida B dobijen je nedavno otkriveni stilizin D u prinosu od 81%.

3) Uporedo sa sintezom longamida B razvijena je i metodologija koja omogućava derivatizaciju ovog prirodnog proizvoda. U ovom procesu primenjene su reakcije karboaminacije aminoalena u prisustvu aril jodida katalizovane paladijumom. Robustnost reakcije potvrđena je uspešnom ciklizacijom sa serijom aril-jodida. Reakcija za razliku od reakcije hidroaminacije nije pokazivala gotovo nikakvu stereoselektivnost pa su dijastereoizomeri dobijeni u odnosu 1 : 1.

4) Iz proizvoda ciklizacije je potom, istom sekvencom reakcija kao kod longamida B, dobijen njegov derivat. Na ovaj način se uvodi supstituent u α položaju do karboksilne grupe longamida.

5) Longamid B i ispitivani derivati nisu ispoljili antimikrobnu aktivnost na sojevima *S. aureus*. Sa druge strane prekursor longamida B, (alkoholni derivat) u blagoj meri inhibira međubakterijsku komunikaciju *C. violaceum*, dok longamid B ima blago antibakterijsko dejstvo na isti soj.

Uporedna analiza rezultata kandidata sa podacima iz literature

Interesantan biološki profil i izražena površinska aktivnost i biodegradabilnost razlog su velikog interesovanja za ramnolipide. S obzirom na činjenicu da se se teško mogu dobiti u većim količinama i u čistoj formi najveći deo istraživanja ovih molekula fokusira se na optimizaciju njihove proizvodnje iz različitih bakterijskih vrsta. Sintetski pristup omogućava dobijanje čistih kongenera i jasno definisanje povezanosti aktivnosti i pojedinih strukturnih elemenata, što za sobom povlači i dizajn efikasnijih molekula. Mada su sintetski

postupci razvijani od 1988, svaki je praćen neekonomičnom hemijom (primena velikih količina zaštitnih grupa u hemiji ugljenih hidrata i visoka cena ramnoze).

Pristup kreiranju derivata ramnolipida korišćen u ovoj disertaciji zasniva se na primeni pristupačnih molekula koji oponašaju strukturne elemente ramnolipida. Pa je tako zamena ramnoze glukozom dala molekul boljih karakteristika u odnosu na matični molekul. Osim toga ovde je prvi put u sintezi derivata ramnolipida primenjen i pristup koji uključuje primenu biopolimera kao izvora hiralnog prekursora ((*R*)-3-hidroksioktanska kiselina). Ovim pristupom se na ekološki prihvatljiv način u jednom koraku dobija osnovni gradivni element ramnolipida.

U ovoj studiji su proučavane strukturno različite modifikacije ramnolipida pa su pored šećera korišćeni i peptidni i heterociklični fragmenti različitih polarnosti kako bi se utvrdio njihov uticaj na osobine molekula. Iz serije novosintetisanih derivata izdvojili su se peptidni derivati kao potentni inhibitori formiranja biofilma *C. albicans*.

Alkaloidi iz porodice bromopirolskih alkaloida privlače pažnju kako zbog svojih bioloških profila tako i zbog jedinstvenih strukturnih karakteristika. Mada su u literaturi mnogobrojne sintetske strategije ovo je prvi put da se u sintezi bromopirolskih alkaloida koriste reakcije alena sa nukleofilima. Ključni ciklizacioni prekursor se dobija iz pristupačnih molekula i osim sinteze longamida B može se primeniti i u sintezi njegovih derivata.

Razvijena metodologija uspešno koristi hiralni prekursor za indukciju stereoselektivnosti reakcije ciklizacije. S obzirom na činjenicu da se u reakciji ciklizacije dobijaju dijastereoizomeri čije je razdvajanje moguće, opisana metodologija može se primeniti i za sintezu enantiomera Longamida B.

Komplementarna metodologija koja podrazumeva korišćenje hemije paladijuma omogućava diverzifikaciju strukture iz istog ciklizacionog prekursora.

Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima – M21

1) **Jovanovic, M.**, Petkovic, M., Jovanovic, P., Simic, M., Tasic, G., Eric, S., and Savic, V. (2020). Proline Derived Bicyclic Derivatives through Metal Catalysed Cyclisations of Allenes: Synthesis of Longamide B, Stylosine D and their Derivatives. *European Journal of Organic Chemistry*, 3, 295-305. **IF₂₀₁₈=3,029** (Oblast – Chemistry, Organic).

2) **Jovanovic, M.**, Radivojevic, J., O'Connor, K., Blagojevic, S., Begovic, B., Lukic, V., Nikodinovic-Runic, J. and Savic, V. (2019). Rhamnolipid inspired lipopeptides effective in preventing adhesion and biofilm formation of *Candida albicans*. *Bioorganic Chemistry*, 87, 209-217. **IF₂₀₁₈=3,926** (Oblast – Chemistry, Organic).

Saopštenja na naučnim skupovima:

Saopštenja na skupovima od nacionalnog značaja sa međunarodnim učešćem štampanih u izvodu - M64:

1) Synthesis of bromopyrrole alkaloids longamide B and stylisine D and their derivatives via metal-catalyzed cyclizations of allenes, **M. Jovanović**, M. Petković, P. Jovanović and M. Simić, *Seventh Conference of the Young Chemists of Serbia*, Belgrade, Serbia, November 3rd, 2019., Book of abstracts, page 83.

Zaključak – obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Na osnovu detaljnog pregleda doktorske teze Miloša Jovanovića pod naslovom „Sinteza longamida B i analoga ramnolipida i njihova fizičko-hemijska i biološka karakterizacija“, komisija je zaključila da je kandidat sistematičnim i detaljnim proučavanjem derivata ramnolipida dao značajan doprinos daljem razumevanju hemijskog prostora oko ovih molekula. Doprinos rada se ogleda u novom pristupu u dizajnu molekula ramnolipidnog tipa što je rezultovalo sintetski pristupačnim molekulima sa izraženom površinskom aktivnošću i potpunom biorazgradivošću i predstavlja osnovu u potencijalnoj komercijalizaciji ovih jedinjenja. Sa druge strane ovaj pristup doprineo je i pronalaženju potentnih inhibitora formiranja biofilma fungalne vrste *Candia albicans*.

Doprinos je dat i u oblasti sinteze bromopiroolskih alkaloida. Ispitivanje reakcija ciklizacija alena u prisustvu prelaznih metala dovele su do razvoja efikasnog sintetskog puta za sintezu longamida B i stilizina D i njihovih derivata. Razvijena metoda je od opšteg karaktera i može se primenuti u sintezi ostalih bromopiroolskih alkaloida, kao i strukturno srodnih, pirolizidinskih alkaloida.


Disertacija je urađena prema odobrenoj prijavi, i predstavlja originalno i samostalno naučno delo. U toku izrade doktorske teze kandidat je objavio dva rada u vrhunskim međunarodnim časopisima i jedno saopštenje na skupu od nacionalnog značaja sa međunarodnim učešćem.

Na osnovu svega izloženog, komisija smatra da su ispunjeni svi uslovi da se rad

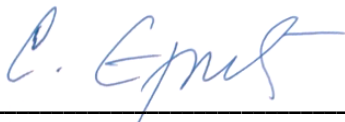
Miloša Jovanovića pod naslovom „**Sinteza longamida B i analoga ramnolipida i njihova fizičko-hemijska i biološka karakterizacija**“, prihvati kao doktorska teza, čime se stiču uslovi za sticanje akademskog stepena i zvanja doktora farmaceutskih nauka. Na osnovu toga, predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta da kandidatu Milošu Jovanoviću odobri odbranu doktorske teze pod navedenim naslovom.

U Beogradu, 10. 03. 2020. godine

Komisija:



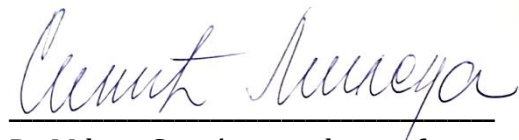
Dr Vladimir Savić, redovni profesor
Farmaceutski fakultet
Univerzitet u Beogradu



Dr Slavica Erić, redovni profesor
Farmaceutski fakultet
Univerzitet u Beogradu



Dr Jasmina Nikodinović-Runić, naučni savetnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu



Dr Milena Simić, vanredni profesor
Farmaceutski fakultet
Univerzitet u Beogradu



Dr Predrag Jovanović, docent
Farmaceutski fakultet
Univerzitet u Beogradu