

ПРЕДМЕТ: Образложење предлога теме докторске дисертације

Молим Наставно-научно веће Универзитета у Београду – Хемијског факултета да одобри пријаву теме докторске дисертације под насловом:

„Синтеза, *in vitro* и *in silico* испитивање нових хетероцикличних система као потенцијалних терапеутских инхибитора холинестераза ”

1. Научна област: Хемија (ужа научна област: Органска хемија)

2. Предмет научног истраживања

Планирани предмет истраживања ове докторске дисертације обухвата развој и оптимизацију синтезе две структурно различите, нове групе функционализованих *N*-бензилпиперидина. Обе групе су, у ширем смислу, структурни аналози донепезила (Donepezil, Aricept[®]), инхибитора ацетилхолинестеразе, који се широко користи за ублажавање раних симптома Алцхајмерове болести. Прва група обухвата једињења у којима је *N*-бензилпиперидински структурни мотив спојен са 1,2,3,4-тетрахидрохиноксалинским језгром, тако да као целина чине нов трициклични систем. Значајно је да су три атома азота у овом систему различито супституисани и могу се даље функционизовати. Друга група представља деривате основног, новог једињења, *N*-(4-(4-арилпиперазин-1-ил)фенил)пиперидин-4-амина, при чему је пиперидински азот типично супституисан бензил групом, док арил група саржи хало или алкокси супституенте. Планира се да поред синтезе већег броја ових једињења, буду по потреби оптимизоване и познате синтетичке методе, ради постизања што веће ефикасности и економичности општег синтетичког поступка. Те методе укључују аминолузу, *N*-ациловање, *N*-алкиловање, Buchwald-Hartwig-ово аминовање и др. У свим случајевима, структуре ће бити доказане свим стандардним спектроскопским методама.

У фармаколошком смислу, очекује се да једињења из обе групе могу бити потенцијални инхибитори ацетилхолинестеразе и/или бутирилхолинестеразе. С обзиром на то, у другом делу дисертације предмет истраживања биће фармаколошко *in vitro* испитивање инхибиторне активности новосинтетисаних једињења у односу на ацетил и бутирилхолинестеразу, а за једињења која покажу највећу инхибиторну активност, биће испитан и тип инхибиције. Коначно, планирано је и *in silico* проучавање обе групе једињења, где ће се компјутерским симулацијама испитати начин везивања и врста интеракција коју лиганди остварују са ензимом примењујући познату кристалну структуру ацетил односно бутирилхолинестеразе.

3. Основне хипотезе

Алцхајмерова болест представља неуродегенеративни поремећај који карактерише прогресивни губитак когнитивних функција као што су памћење, размишљање, учење, говор и оријентација.^{1,2} Према наводима Светске здравствене организације (World Health Organization, WHO), Алцхајмерова болест је најчешћи облик деменције, чинећи 60-70% од свих облика.³ Због компликоване етиопатогенезе узрок ове болести није до краја разјашњен. До данас није пронађена ефикасна терапија за лечење Алцхајмерове болести, а комерцијално доступни лекови у већој или мањој мери утичу само на ублажавање симптома и успоравање прогресије болести, уз неретко испољавање нежељених ефеката.^{1,2} Због тога је развој нових лекова за терапију Алцхајмерове болести од великог значаја за медицинску хемију и медицину уопште.

Азотни хетероцикли су веома важни структурни мотиви, присутни у фармаколошки активним једињењима природног или синтетичког порекла. Према наводима Управе за храну и лекове (Food and Drug Administration, FDA), скоро 75% свих одобрених лекова уопште, садрже азотни хетероциклични структурни мотив као фармакофору.⁴

Деривати 1,2,3,4-тетрахидрохиноксалина представљају важну класу азотних, хетероцикличних једињења, и налазе се у многим фармаколошки активним једињењима.⁵ Познате процедуре за синтезу 1,2,3,4-тетрахидрохиноксалинског језгра укључују хидрогенизацију хиноксалина, комбинацију циклизације и редукције или оксидације и циклизације, одговарајућих деривата анилина са различитим кетонима, дихидрокси једињењима или бутандионима. Недостаци ових реакција су ниски приноси и примена осетљивих катализатора високе цене.⁶ Нови трициклични систем који 1,2,3,4-тетрахидрохиноксалинско језгро директно кондензовано са пиперидинским прстеном, представља потенцијално значајан синтетички циљ, јер постоје три атома азота који се могу независно функционализовати. У том смислу, посебно је значајан пиперидински азот, који се после уклањања *N*-бензил групе стандардним методама, може даље алкиловати укључујући и редуктивно аминовање, ариловати, ациловати и др. У целини, структурне модификације три региона, које представљају три атома азота у молекулу, омогућују синтезу различитих деривата са потенцијалном фармаколошком активношћу. Међутим, у оваквим молекулима, битно је и само присуство *N*-бензилпиперидинске групе, јер она представља фармакофору донепезила, инхибитора ацетилхолинестеразе.

Од раније је познато да прогресију Алцхајмерове болести прати снижена концентрација ацетилхолина, значајног неуротрансмитера у мозгу. Такође се зна да се везивно место ацетилхолинестеразе састоји од каталитичког активног места (Catalytic Active Site, CAS) и периферног анјонског места (Peripheral Anionic Site, PAS). Како PAS учествује у агрегацији β -амилоидних плакова који се нагомилавају у мозгу оболелих, та улога га чини једном од мета

фармакотерапије.^{1,7} У литератури је већ раније показано да истовремено везивање лиганда и за CAS и за PAS, повећава терапијску ефикасност, јер се осим инхибиције ензима, такође инхибира и агрегација β -амилоидних плакова. Донепезил управо делује на такав начин.⁸

Претпоставка у овом истраживању је да се аналози донепезила, код којих је *N*-бензилпиперидинско језгро повезано са продуженим алифатично-ароматичним системом, потенцијално могу везати истовремено за CAS и за PAS.

Битно је нагласити да су у литератури већ познати инхибитори ацетилхолинестеразе који садрже пиперазински прстен.⁹ Стога се може предпоставити да би повезивањем *N*-бензилпиперидинског и *N*-арилпиперазинског језгра, преко одговарајућег моста настали нови лиганди, који су способни да додатно или на други начин, интерагују са везивним местом ензима. Тај мост који спаја две фармакофоре, може бити 1,4-диаминофенил група, која има извесну, мада врло ограничену флексибилност. Међутим, *N*-ациловањем једне фениламино групе, добија се другачији мост, који цео систем чини још ригиднијим. На тај начин, настају две серије лиганата, свака са специфичном оријентацијом пиперидинске и пиперазинске фармакофоре у везивном месту ензима. Такође, постоји могућност остваривања додатних интеракција лиганата са везивним местом ензима.

Поред ацетилхолинестеразе, на ниво ацетилхолина утиче у другом реду и ензим бутирилхолинестераза.¹⁰ Иако хомолошки слични, услед разлика у тродимензионалној структури везивног места ова два ензима, не може се предвидети да ли ће новосинтетисана једињења инхибирати бутирилхолинестеразу.

4. Циљ истраживања и очекивани резултати

Научни циљеви ове дисертације могу се поделити у четири групе:

а) Развој и оптимизација синтезе нових трицикличних аналога донепезила, који садрже 1,2,3,4-тетрахидрохиноксалинско језгро.

б) Развој и оптимизација синтезе нових лиганата, који су деривати једињења *N*-(4-(4-арилпиперазин-1-ил)фенил)пиперидин-4-амин. Као што је већ приказано, ови лиганди садрже пиперидински и пиперазински прстен а међусобно су спојени мостом који чини ароматични прстен. У фармаколошком смислу, циљ је да се повезивањем *N*-бензилпиперидина са различитим *N*-арилпиперазинима добију једињења која ће се потенцијално везати за CAS и PAS регионе ацетилхолинестеразе.

ц) Фармаколошко *in vitro* испитивање инхибиторне активности новосинтетисаних једињења према ацетилхолинестерази и бутирилхолинестерази.

д) Интеракције новосинтетисаних једињења са везивним местом ацетилхолинестеразе биће проучавани молекулским докингом и молекулском динамиком. Структуре новосинтетисаних једињења биће доковане у познату кристалну структуру ацетилхолинестеразе. Циљ *in silico* испитивања је утврђивање интеракција и структурних промена које се успостављају током формирања комплекса ензим-лиганд. Даљим поређењем са експерименталним резултатима, очекује се да ће бити утврђене кључне интеракције, одговорне за постизање инхибиције, а такође и утицај супституената и укупне величине молекула лиганда на инхибиторну активност.

5. Методе истраживања

У раду ће се користити стандардне лабораторијске технике и методе органске синтезе. Биће примењиване реакције као што су *N*-ациловање, *N*-аликловање, редуктивно аминавање пиперидона, Hoffmann-ово премештање, интрамолекулско Buchwald-Hartwig-ово купловање (aminaвање), редукција нитро групе, и друге. Добијена једињења биће пречишћена уобичајеним методама. Структурна карактеризација новосинтетисаних једињења биће извршена применом 1D и 2D експерименталне нуклеарне магнетне резонанције (NMR) и то: ¹H, ¹³C, APT, DEPT, NOESY, HMBC и HSQC, затим масеном спектроскопијом високе резолуције (HRMS) и инфрацрвеном спектроскопијом (IR).

Инхибиторна активност новосинтетисаних једињења према ацетилхолинестерази као и кинетичка испитивања, радиће се *in vitro* Ellman-овом методом користећи ацетилхолин естеразу (тип VI-S) изоловану из електричне јегуље и бутирилхолинестеразу изоловану из коњског серума.

За компјутерску докинг симулацију, користеће се кристалне структуре ензима јавно доступне на Protein Data Bank (PDB) платформи. У кристалне структуре ензима биће докована структура испитиваних лиганда, при чему ће структура лиганда бити флексибилна, док ће структура протеина бити семи-ригидна или ригидна. Молекулском динамиком испитиваће се структурне промене лиганд-ензим комплекса.

6. Литература

1. J. Weller, A. Budson, Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research* **2018**, 7, 1161. (<https://doi.org/10.12688/f1000research.14506.1>)
2. P. A. Chawla, V. Parikh, Alzheimer's Disease: The Unwanted Companion of Elderly. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2020**, 19, 646. (<https://doi.org/10.2174/187152731909201119090829>)
3. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>

4. N. Kerru, L. Gummidi, S. Maddila, K. K. Gangu, S. B. Jonnalagadda, A Review on Recent Advances in Nitrogen-Containing Molecules and Their Biological Applications. *Molecules* **2020**, 25, 1909. (<https://doi.org/10.3390/molecules25081909>).
5. S. Tariq, K. Somakala, M. Amir, Quinoxaline: An insight into the recent pharmacological advances *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 143, 542 (<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.064>).
6. Y. Fu, J. Y. Wang, W. G. Chen, Y. Li, L. X. Zhao, S. Gao, F. Ye, Facile Synthesis and Bioactivity of Novel N,N'-disubstituted-1,2,3,4-Tetrahydroquinoxalines *Heterocycl. Chem.* **2017**, 54, 3023 (<https://doi.org/10.1002/jhet.2911>).
7. L. Ismaili, B. Refouvelet, M. Benchekroun, S. Brogi, M. Brindisi, S. Gemma, G. Campiani, S. Filipic, D. Agbaba, G. Esteban, M. Unzeta, K. Nikolic, S. Butini, J. Marco-Contelles, Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **2017**, 151, 4. (<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.12.003>).
8. X. Rong, L. Jiang, M. Qu, S. Shams ul Hassan, Z. Liu, Enhancing Therapeutic Efficacy of Donepezil by Combined Therapy: A Comprehensive Review, *Curr. Pharm. Des.* **2021**, 27, 332. (<https://doi.org/10.2174/1381612826666201023144836>).
9. A. Więckowska, T. Wichur, J. Godyń, A. Bucki, M. Marcinkowska, A. Siwek, K. Więckowski, P. Zaręba, D. Knez, M. Głuch-Lutwin, G. Kazek, G. Latacz, K. Mika, M. Kołaczkowski, J. Korabecny, O. Soukup, M. Benkova, K. Kieć-Kononowicz, S. Gobec, B. Malawska, Novel Multitarget-Directed Ligands Aiming at Symptoms and Causes of Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, 9, 1195. (<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00024>).
10. G. Mushtaq, N. H. Greig, J. A. Khan, M. A. Kamal, Status of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **2014**, 13(8), 1432. (<https://doi.org/10.2174/1871527313666141023141545>).