

Наставно-научном већу

Универзитета у Београду - Хемијског факултета

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета одржаној 13. децембра 2018. године одређени смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Животе Селаковић, мастер хемичара, под називом:

„Развој нових 4,10-диазахризенских и 1,5-нафтиридинских инхибитора вируса еболе“

Пошто смо поднету дисертацију прегледали, подносимо Наставно-научном већу Хемијског факултета следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Животе Селаковића написана је на 181 страни А4 формата, и садржи 40 слика (укључујући 20 у Прилозима), 20 схема и 20 табела (укључујући 13 у Прилозима). Рад обухвата следећа поглавља: Увод (1 страна), Општи део (31 страна), Наши радови (44 стране), Експериментални део (62 стране), Закључак (4 стране, укључујући и закључак на енглеском језику), Прилог (24 стране) и Литература (15 страна). Поред наведеног, дисертација садржи Извод на српском и енглеском језику (по 1 страна), Листу скраћеница (2 стране), Садржај (2 стране), као и биографију и библиографију кандидата.

У **Уводу** је описан предмет истраживања и истакнути су циљеви докторске дисертације. Укратко је описан вирус еболе и објашњен значај борбе против овог вируса.

У **Општем делу** дат је историјат открића и распрострањеност вируса еболе и других филовируса. Описана је структура вируса и његов репликативни циклус. Приказани су начини трансмисије, патогенеза, симптоми и клиничка слика инфекције. На крају, представљена су сва досадашња значајна достигнућа човечанства у борби против вируса еболе, у оној мери у којој је то описано у доступној литератури, укључујући вакцине, макромолекулске терапеутике и мале молекуле.

У **Нашим радовима** представљено је све оно што је кандидат урадио у току израде тезе. Описана је синтеза нових диазахризенских и нафтиридинских деривата као потенцијалних антивирусних агенаса. Представљени су резултати тестова чији је циљ био одређивање *in vivo* и *in vitro* биолошке активности, *in vivo* и *in vitro* токсичности, ADME својстава, везивања за протеине серума и концентрације у серуму, киселинско-базних особина, као и тестова којима је одређен механизам дејства једињења. Добијени резултати на крају овог поглавља су продискутовани.

У **Експерименталном делу** су детаљно описане синтезе свих тестираних деривата и њихових прекурсора, а дата је и спектроскопска карактеризација свих једињења. У

наставку експерименталног дела описане су све методе примењене током израде дисертације и наведени су коришћени материјали.

У **Закључку** кандидат је сумирао добијене резултате до којих се дошло у току израде докторске дисертације

У поглављу **Литература** (202 цитата) су обухваћене књиге, радови и други релевантни извори из области које дисертација садржи. У **Прилозима** су дате слике и табеле са помоћним резултатима, подацима и параметрима.

Б. Кратак преглед резултата

У оквиру ове докторске дисертације синтетисано је 17 нових 4,10-диазахризенских и 12 1,5-нафтиридинских деривата. Полазне диазахризенске структуре у овој тези представљају десметил-аналоге једињења развијаних у сарадњи USAMRIID и истраживачке групе професора Богдана Шолаје.

За синтезу једињења у овој дисертацији употребљене су различите процедуре, укључујући процедуре описане у литератури, измењене литературне процедуре, а развијени су и потпуно нови поступци.

Испитана је способност 29 крајњих производа вишестепених синтеза да инхибирају вирус еболе у *in vitro* условима, као и њихова цитотоксичност. Најактивнији деривати подвргнути су различитим тестовима за утврђивање токсичности у НерG2 ћелијама, мишевима и зебрицама, као и испитивањима ADME својстава, одређивању јачине везивања за протеине плазме и кисело-базних својстава. Пет најактивнијих диазахризенских деривата, као и два нафтиридинска, подвргнуто је *in vivo* есеју за одређивање антивирусне активности на мишевима. На послетку, урађен је већи број експеримената са два најпотентнија једињења, **ZSML08** и **ZS48**, као и контролним једињењима хлорокином и амодијакином, са циљем расветљавања механизма дејства ових молекула.

Развијен је и поступак за синтезу диазахризена супституисаних двома различитим алкиламино-групама. У *in vitro* есеју показало се да десметил-једињења имају унапређену активност у односу на метил-аналоге. Најактивнија једињења исказала су $EC_{50} < 1 \mu M$, при чему су највећу ефикасност показали деривати **ZS64** ($EC_{50} = 0,34 \mu M$, HeLa ћелије домаћини) и **ZSML08** ($EC_{50} = 0,26 \mu M$, HeLa ћелије). Нафтиридински деривати, замишљени као мањи, поларнији аналози диазахризена, исказали су, у просеку, лошију активност од диазахризена. Једини нафтиридин са субмикромоларном EC_{50} био је **ZS103** ($EC_{50} = 0,78 \mu M$, HeLa ћелије домаћини). У *in vivo* студији најбољу активност показала су једињења **ZSML08** и **ZS48**, која су штитила 10/10, односно 9/10, мишева при дози 10 mg/kg примењиваној једном дневно у току седам дана (стандардни тест). Оваквим резултатом диазахризенски деривати **ZSML08** и **ZS48** сврстали су се у ред најпотентнијих познатих антифиловирусних агенаса.

Утврђено је да су **ZSML08** и **ZS48** присутни у ниској, али константној концентрацији у крви мишева који су излагани дозама једињења двоструко вишим од највиших које се примењују у *in vivo* тесту. Зебрице и здрави мишеви добро су толерисали ова два

једињења, што указује да је реч о безбедним молекулима. Наелектрисање диазахризенских деривата **ZSML08** и **ZS48** на рН крви износи мање од +1, што би могло да омогући бржи улазак у заражене ћелије диазахризена у односу на нафтиридине (код нафтиридинских деривата **ZS102** и **ZS103** при истим условима наелектрисање је готово +2).

Приликом испитивања механизма дејства диазахризена утврђено је да је реч о лизозомотропним једињењима, што је једна од карактеристика молекула са структурним карактеристикама катјонских амфифила (CAD једињења). Деривати **ZSML08** и **ZS48** доспевају у касне ендозоме/лизозоме, где спречавају њихово нормално функционисање, чиме истовремено онемогућавају трансфер вируса у цитосол. Вирус еболе остаје заробљен у киселим одељцима ћелије и не долази до инфекције. Ипак, за разлику од контролних једињења и типичних представника једињења типа CAD – хлорокина и амодиакина – о којима постоји већи број публикација, диазахризени брже доспевају у лизозоме, акумулирају се у њима, увећавају их, спречавају њихову фузију са другим везикулама и инхибирају активност катепсина В и L, не доводећи притом до алкализације лумена касних ендозома/лизозома.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Филовируси (лат. *Filoviridae*) јесу таксономска фамилија која припада реду *Mononegavirales*. Фамилија се састоји од пет родова – *Marburgvirus* (откривен 1967. године), *Ebolavirus* (1976.), *Cuevavirus* (2010.), *Striavirus* (2018.) и *Thamnovirus* (2018.). Вируси који припадају првом и другом роду узрочници су смртоносне хеморагијске грознице код људи и примата. Почетком 2014. године избила је прва (и једина) права епидемија вируса еболе у Гвинеји, одакле се убрзо проширила на Сијера Леоне и Либерију. Крхке институције пружања здравствене заштите и закасна спознаја да је реч о филовирусу, узроковали су брзину ширења заразе без преседана, при чему је живот изгубило преко 11000 људи. Епидемија је угашена тек 2016. године. Још увек не постоји одобрена вакцина нити одобрен терапеутик против филовируса. У овом тренутку неколико имунотерапеутика, као и сложених макромолекулских формулација, представља обећавајуће кандидате за лек. Од деведесетих година прошлог века одређен број познатих лекова (малих молекула) одобрених од стране FDA, као и новосинтетисаних малих молекула, исказао је активност према вирусу еболе. Мали молекули поседују неколико предности у односу на вакцине и неке макромолекуле – јефтинији су за производњу, лакше се транспортују и складиште и имају дужи рок трајања. Такође, уколико мали молекули имају механизам дејства који се заснива на интеракцији са домаћином, тада они могу имати очувану активност чак и ако вирус мутира, што са вакцинама некада није случај. Допринос ове дисертације огледа се у томе што је синтетисано неколико нових једињења – малих молекула – која имају веома високу биолошку активност. Укратко, укупно је тестирано 29 једињења, а по активности нарочито су се истакла два диазахризенска деривата (**ZSML08** и **ZS48**) који су имали веома добру *in vitro* активност и штитили су 9/10, односно 10/10 инфицираних мишева при дози 10 mg/kg. У целокупној доступној литератури постоји тек неколико малих молекула који штите 100% мишева при овако ниској дози, а једињење **ZSML08** из ове дисертације је једно од њих. Урађен је и већи број огледа са циљем утврђивања механизма дејства ова два једињења, при чему је откривено да она инхибирају

улазак вируса у ћелију домаћина, на начин који се разликује од до сада познатих инхибитора уласка вируса. Добијени резултати указују да су молекули развијени у овој тези значајни и јединствени и да завређују даља испитивања.

Г. Објављени радови и саопштења који чине део дисертације

• Радови објављени у међународним часописима изузетних вредности (M21a):

1. Selaković, Ž.; Tran, J. P.; Kota, K. P.; Lazić, M.; Retterer, C.; Besh, R.; Panchal, R. G.; Soloveva, V.; Sean, V. A.; Wells, J. B.; Pavić, A.; Verbić, T.; Vasiljević, B.; Kuehl, K.; Duplantier, A. J.; Bavari, S.; Mudhasani, R.; Šolaja, B. A. Second generation of diazachrysenes: protection of Ebola virus infected mice and mechanism of action. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *162*, 32-50.
Chemistry, Medicinal (4/59) **IF = 4,816 (2017)**
doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.061

• Радови објављени у истакнутим међународним часописима (M22):

1. Selaković, Ž.; Osenica, D.; Eaton, B.; Retterer, C.; Bavari, S.; Burnett, J. C.; Šolaja, B. A.; Panchal, R. G. A Limited Structural Modification Results in a Significantly More Efficacious Diazachrysene-Based Filovirus Inhibitor. *Viruses* **2012**, *4*, 1279-1288.
Virology (18/34) **IF = 2,435 (2012)**
doi: 10.3390/v4081279

• Радови објављени у међународним часописима (M23):

1. Selaković, Ž.; Soloveva, V.; Gharaibeh, D.; Wells, J.; Šegan, S.; Panchal, R. G.; Šolaja, B. A. Anti-Ebola Activity of Diazachrysene Small Molecules. *ACS Inf. Dis.* **2015**, *1*, 264-271.
Chemistry, Medicinal (59/59) **IF = 0,000 (2015) (IF₂₀₁₇ = 4,325)**
doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00028

• Радови објављени у часописима националног значаја (M53):

1. Selaković, Ž. Ebola virus. *Hemijski pregled* **2014**, *55(4)*, 19-26.
2. Selaković, Ž.; Šolaja, B. A. Advances in tackling filoviruses. *CONTRIBUTIONS, Section of Natural, Mathematical and Biotechnical Sciences, MASA*, **2018**, *39*, 83-90.
doi: <http://dx.doi.org/10.20903/csnmbs.masa.2018.39.2.127>

• Радови саопштени на скуповима међународног значаја штампани у изводу (M34):

1. Selaković, Ž.; Soloveva, V.; Panchal, R. G.; Šolaja, B. A. Novel Diazachrysene-Based Filovirus Inhibitors. 22^{èmes} Journées Jeunes Chercheurs / 22nd Young Research Fellows Meeting: Chemistry and Biology: A permanent Dialogue, Paris, France, February 4-6th, **2015**, Book of Abstracts OC-20

• Радови саопштени на скуповима националног значаја штампани у изводу (M64):

1. Selaković, Ž.; Šolaja B. A. The Impact of a Limited Structural Modification on the Activity of Diazachrysene-Based Filovirus Inhibitors, Prva konferencija mladih hemičara Srbije, Belgrade, October 19-20th **2012**, Book of Abstracts HS P16, pg. 63; ISBN 978-86-7132-050-4

2. Selaković, Ž.; Šegan, S. B.; Panchal, R. G.; Šolaja, B. A. "Nova farmakofora aktivna na Ebola virus", 53. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Kragujevac, June 10-11th **2016**, Book of Abstracts OH O3, pg. 97; ISBN 978-86-7132-061-0
3. Lazić, M.; Selaković, Ž.; Panchal, R. G.; Šolaja, B. A. "Novi derivati bis(alkilamino)diazahrizena aktivni na Ebola virus", Četvrta konferencija mladih hemičara Srbije, Belgrade, November 5th **2016**, Book of Abstracts HS P04, pg. 40; ISBN 978-86-7132-063-4
4. Selaković, Ž.; Jiang, X.; Milić, D.; Panchal, R. G.; Šolaja, B. A. "Pokušaj sinteze lipozomskog in vivo inhibitora virusa ebola", Peta konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 29. i 30. septembar **2017**, izvodi radova KMH 05, str. 97; ISBN 978-86-7132-067-2

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност ове докторске дисертације је проверена 6. маја 2019. године на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018.). Помоћу програма iThenticate, утврђено је да количина подударана текста износи 17 %. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података у вези са темом дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је у складу са чланом 9. овог правилника.

Стога сматрамо да је докторска дисертација Животе Селаковић у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Ђ. Закључак

У приложеној докторској дисертацији под насловом „Развој нових 4,10-диазахризенских и 1,5-нафтиридинских инхибитора вируса еболе” кандидат Живота Селаковић је успешно одговорио на постављене задатке који се односе на осмишљавање синтезе, синтезу и карактеризацију нових једињења, као и на одређивање њихове биолошке активности, токсичности и механизма дејства. Развијено је неколико веома потентних инхибитора вируса еболе, од којих се два нарочито истичу својом способношћу да при ниској дози штите све или готово све мишеве заражене леталном дозом овог вируса, чиме се сврставају у ред најактивнијих познатих инхибитора. Такође, установљен је механизам дејства ових једињења и утврђено је да она поседују јединствена својства у односу на до сада познате инхибиторе уласка вируса у ћелију-домаћина.

Резултати истраживачког рада кандидата публиковани су у оквиру три научна рада, која су проистекла директно из докторске дисертације (један рад у часопису категорије M21a, један рад у часопису категорије M22 и један рад у часопису категорије M23). Додатно, резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације су саопштени и на пет

научних скупова (један међународног значаја и четири националног значаја). Кандидат је у току израде дисертације учествовао и у писању два рада ревијалног типа о вирусу еболе за часописе националног значаја.

Комисија сматра да резултати поднети у приложеној докторској дисертацији пружају значајан допринос у области органске и медицинске хемије и представљају целовито и темељно истраживање које обухвата развој веома активних инхибитора смртоносног вируса еболе од самог дизајна, преко синтезе и испитивања биолошке активности, до открића механизма дејства. На основу свега изложеног Комисија предлаже Научно-наставном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Животе Селаковић под насловом „Развој нових 4,10-диазахризенских и 1,5-нафтиридинских инхибитора вируса еболе” прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора хемијских наука.

У Београду, 13. маја 2019. године

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

Др Драгана Милић, редовни професор
Универзитета у Београду – Хемијског факултета

Др Игор Опсеница, ванредни професор
Универзитета у Београду – Хемијског факултета

Др Јасмина Никодиновић-Рунић
научни саветник Универзитета у Београду – Института за молекуларну генетику и
генетичко инжењерство и Иновационог центра Хемијског факултета

Др Велимир Попсавин, дописни члан САНУ,
Редовни професор Универзитета у Новом Саду – Природно-математичког факултета