

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Jovana P. Vilipić

**Dobijanje aminokiselinskih derivata  
avarona i *tert*-butilhinona i ispitivanje  
njihove biološke aktivnosti**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY

Jovana P. Vilipić

**Preparation of amino acid derivatives of  
avarone and *tert*-butyl quinone and  
examination of their biological activity**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentori: **prof. dr Dušan Sladić**, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Irena Novaković**, naučni saradnik  
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centar za hemiju,  
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

**prof. dr Dušan Sladić**, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**prof. dr Zoran Vujčić**, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Irena Novaković**, naučni saradnik  
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,  
Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu

**dr Tatjana Stanojković**, viši naučni saradnik  
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane:

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Dušana Sladića, redovnog profesora Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, i dr Irene Novaković, naučnog saradnika Instituta za Hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centra za hemiju, Univerziteta u Beogradu.*

*Prof. dr Dušanu Sladiću se zahvaljujem na predloženoj temi, ukazanom poverenju i svim konstruktivnim diskusijama i savetima tokom izrade i pisanja rada.*

*Dr Ireni Novaković se takođe zahvaljujem na saradnji i svesrdnoj pomoći tokom izrade i pisanja ove disertacije.*

*Prof. dr Zoranu Vujčiću dugujem zahvalnost za stalno interesovanje za rad i pomoć prilikom pisanja rada.*

*Dr Tatjani Stanojković se zahvaljujem na pomoći tokom izvođenja eksperimenata na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, te tokom pisanja rada.*

*Nesebičnu zahvalnost dugujem svim profesorima i kolegama koji su na bilo koji način pomogli tokom izrade teze, te doprineli da ova disertacija ugleda svetlost dana.*

*Bezgraničnu zahvalnost dugujem onima koji su mi uvek bili vetar u leđa, bez čije podrške, razumevanja i ljubavi ne bih uspela. Svojoj porodici i prijateljima.*

*Jovana P. Vilipić*

**Naslov:****Dobijanje aminokiselinskih derivata avarona i *tert*-butilhinona i ispitivanje njihove biološke aktivnosti**

**Sažetak:** U okviru ove doktorske disertacije je sintetisana serija aminokiselinskih derivata seskviterpenskog hinona avarona, izolovanog iz morskog sunčera *Dysidea avara*, kao i model jedinjenja *tert*-butilhinona.

Određena je *in vitro* antitumorska aktivnost svih jedinjenja prema humanim tumorskim ćelijskim linijama (HeLa, A549, Fem-X, K562, MDA-MB-453) i zdravoj MRC-5 ćelijskoj liniji. Utvrđeno je da aminokiselinski derivati avarona pokazuju jače dejstvo nego odgovarajući aminokiselinski derivati *tert*-butilhinona, sa  $IC_{50}$  vrednostima pojedinih derivata nižim od 10  $\mu$ M. Rezultati analize ćelijskog ciklusa na HeLa ćelijama ukazuju da je apoptoza jedan od mogućih mehanizama dejstva derivata. Ispitan je uticaj kaspaza 3, 8 i 9 na ćelijsku smrt korišćenjem specifičnih kaspaznih inhibitora.

Ispitano je i antimikrobno dejstvo derivata prema nizu Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, kao i na tri soja gljivica, pri čemu je zabeležena vrlo dobra aktivnost derivata avarona.

Ispitane su interakcije derivata sa biomakromolekulima. SDS gel-ektroforezom i masenom spektrometrijom je potvrđeno da sintetisana jedinjenja ne modifikuju lizozim. Spektrofotometrijskim ispitivanjima je zabeležena pojava hiperhromizma kao posledica interakcija između hinona i CT-DNA. Utvrđeno je da dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije interkalatora etidijum-bromida i boje Hoechst 33258 koja se vezuje u malu brazdu u kompleksu derivata sa CT-DNA. Spektri cirkularnog dihroizma su ukazali na izostanak interkalacije hinona u CT-DNA. Rezultati molekuskog modelovanja su sugerisali da se derivati smeštaju u malu brazdu DNA. Elektroforetska ispitivanja su potvrdila da ne dolazi do cepanja plazmida pUC19 u prisustvu derivata.

Na kraju je utvrđen stepen antioksidativne aktivnosti dobijenih aminokiselinskih derivata hinona.

*Ključne reči:* avaron, aminokiseline, citotoksičnost, kaspaze, apoptoza, antimikrobna aktivnost, lizozim, CT-DNA

Naučna oblast: Hemija  
Uža naučna oblast: Organska hemija, Biohemija  
UDK brojevi: 547.466, 577.1

**Title:**

**Preparation of amino acid derivatives of avarone and *tert*-butylquinone and examination of their biological activity**

**Abstract:** In this doctoral dissertation, a series of amino acid derivatives of the sesquiterpene quinone avarone, isolated from the marine sponge *Dysidea avara*, as well as the model compound *tert*-butylquinone has been synthesized.

*In vitro* cytotoxic activity of all compounds toward human cancer cell lines (HeLa, A549, Fem-X, K562, MDA-MB-453) and normal MRC-5 cell line was determined. It was found that the amino acid derivatives of avarone exhibit a stronger activity than the corresponding amino acid derivatives of *tert*-butylquinone, with IC<sub>50</sub> values of some derivatives less than 10 μM. The results of the cell cycle analysis of HeLa cells indicate that apoptosis is one of the possible mechanisms of action of derivatives. The effect of caspases 3, 8, and 9 on cell death by using specific caspase inhibitors was examined.

The antimicrobial effect of the derivatives on the panel of Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as on three fungal species, were investigated, whereby very good activity of avarone derivatives was observed.

Interactions of the derivatives with biomacromolecules were studied. SDS gel-electrophoresis and mass spectrometry confirmed the absence of modifications of lysozyme by any of the synthesized compounds. Spectrophotometric studies have recorded the occurrence of hyperchromism as a result of interactions between the quinone and CT-DNA. The quenching of the fluorescence of the intercalator ethidium bromide and of the minor groove binder Hoechst 33258 in the complex with CT-DNA by the derivatives was determined. Circular dichroism spectra demonstrated a non-intercalative binding mode of the quinone derivatives to CT-DNA. The results of molecular modeling suggested that the derivatives bind to the minor groove. The electrophoretic pattern showed no cleavage of the pUC19 plasmid in the presence of any derivatives.

Finally, the degree of antioxidant activity of the obtained amino acid derivatives of the quinones was determined.

*ABSTRACT*

*Key words:* avarone, amino acids, cytotoxicity, caspases, apoptosis, antimicrobial activity, lysozyme, CT-DNA

Scientific subfield: Chemistry

Scientific subfield: Organic chemistry, Biochemistry

UCD numbers: 547.466, 577.1



## *Lista skraćenica i termina*

a.u.	arbitrarna jedinica
A549	ćelijska linija humanog adenokarcinoma pluća
AA	akrilamid
ADHD	(eng. <b>a</b> ttention <b>d</b> eficit <b>h</b> yperactivity <b>d</b> isorder) hiperkinetički poremećaj
AhR	(eng. aryl hydrocarbon receptor) receptor za aromatične ugljovodnike
AKT	protein-kinaza B
APAF1	(eng. <b>a</b> poprotic <b>p</b> rotease <b>a</b> ctivating <b>f</b> actor 1) apoptotični proteazno aktivirajući faktor 1
APS	amonijum-persulfat
ARE	(eng. <b>a</b> ntioxidant <b>r</b> esponse <b>e</b> lement) element antioksidativnog odgovora
ASG	ćelijska linija humanog raka želuca
ATP	(eng. <b>a</b> denosine <b>t</b> riphosphate) adenzin-trifosfat
B16F10	ćelijska linija mišjeg melanoma
BID	(eng. BH3 interacting-domain death agonist) sa BH3 domenom interagujući agonist ćelijske smrti
CBB	(eng. <b>c</b> oomassie <b>b</b> rilliant <b>b</b> lue) kumasi plavo
CD	cirkularni dihidroizom
CD <sub>3</sub> OD	deuterisani metanol
c-erbB-2	receptorska tirozinska protein-kinaza
COMT	(eng. <b>c</b> atechol- <b>O</b> - <b>m</b> ethyltransferase) katehol- <i>O</i> -metiltransferaza
COX-2	(eng. <b>c</b> yclooxygenase-2) ciklooksigenaza-2
CT-DNA	(eng. calf thymus DNA) dezoksiribonukleinska kiselina izolovana iz timusa govečeta
dCK	(eng. deoxycytidine kinase) dezoksicitidin-deaminaza
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNA	(eng. <b>d</b> eoxyribonucleic <b>a</b> cid) dezoksiribonukleinska kiselina
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazin

EB	etidijum-bromid
ECM	( <i>eng.</i> <b>extracellular matrix</b> ) ekstracelularni matriks
EDTA	( <i>eng.</i> <b>ethylenediaminetetraacetic acid</b> ) etilendiamintetrasirćetna kiselina
EGF	( <i>eng.</i> <b>epidermal growth factor</b> ) epidermalni faktor rasta
EGFR	( <i>eng.</i> <b>epidermal growth factor receptor</b> ) epidermalni receptor faktora rasta
ER	( <i>eng.</i> <b>estrogen receptor</b> ) estrogenski receptor
ERK	( <i>eng.</i> <b>extracellular signal-regulated kinases</b> ) kinaze regulisane ekstracelularnim signalima
FAD	( <i>eng.</i> <b>flavin adenine dinucleotide</b> ) flavin-adenin-dinukleotid
FADD	( <i>eng.</i> <b>Fas-associated protein with death domain</b> ) sa Fas-om asocirani protein koji sadrži domen odgovoran za indukciju ćelijske smrti
FBS	( <i>eng.</i> <b>fetal bovine serum</b> ) serum fetalnog govečeta
FDA	( <i>eng.</i> <b>Food and Drug Administration</b> ) Uprava za hranu i lekove
Fem-X	ćelijska linija humanog melanoma
FGFR-1	( <i>eng.</i> <b>fibroblast growth factor receptor 1</b> ) receptor 1 faktora rasta fibroblasta
G	guanin
GRP58	( <i>eng.</i> <b>glucose-regulated protein, 58-kD</b> ) glukozom regulisani protein
GST	( <i>eng.</i> <b>glutathione S-transferase</b> ) glutation-S-tranferaza
H	Hoechst 33258
HeLa	ćelijska linija raka grlića materice
hENT1	( <i>eng.</i> <b>human equilibrative nucleoside transporter 1</b> ) humani ekvilibrativni nukleozidni transporter tipa 1
Hep3B	ćelijska linija humanog hepatocelularnog raka
Hepes	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina
HepG2	ćelijska linija humanog hepatocelularnog raka
HER2	( <i>eng.</i> <b>human epidermal growth factor receptor 2</b> ) receptor 2 humanog epidermalnog faktora rasta

HL-60	ćelijska linija humane mijeloidne leukemije
HSP	(eng. <b>heat shock protein</b> ) protein toplotnog šoka
IC <sub>50</sub>	koncentracija jedinjenja koja inhibira preživljavanje 50% ispitivanih ćelija ili organizama
IG <sub>50</sub>	koncentracija agensa koja inhibira ćelijski rast za 50%
IKK	(eng. IκB kinase) IκB kinaza
IR	infracrvena spektroskopija
J82	ćelijska linija humanog raka bešike
K562	ćelijska linija humane hronične mijeloidne leukemije
KB	ćelijska linija humanog epidermoidnog raka
KEAP1	(eng. Kelch-like ECH-associated protein 1) sa ECH asocirani protein 1 koji liči na Kelch
L1210	ćelijska linija mišjeg limfoma
L5178y	ćelijska linija mišjeg limfoma
LB	Luria-Bertani bujon
LNCaP	androgen-osetljiva ćelijska linija humanog adenokarcinoma prostate
Lys	lizozim
MAO	(eng. <b>monoamine oxidase</b> ) monoamin-oksidaza
MAPK	(eng. <b>mitogen-activated protein kinases</b> ) mitogenima aktivirane protein-kinaze
MCT-1	(eng. <b>monocarboxylate transporter 1</b> ) transporter monokarboksilne kiseline tipa 1
MDA-231	ćelijska linija raka dojke
MDA-MB-453	ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke
MDR	(eng. <b>multiple drug resistance</b> ) otpornost na višestruke lekove
MHB	Mueller–Hinton bujon
MIK	(eng. MIC, minimum inhibitory concentration) minimalna inhibitorna koncentracija
MRC-5	ćelijska linija zdravih fetalnih fibroblasta pluća
MS	masena spektroskopija
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid

NADP <sup>+</sup>	( <i>eng.</i> <b>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</b> ) nikotinamid- -adenin-dinukleotid-fosfat
NCI-H460	ćelijska linija humanog raka pluća
NCI-H929	ćelijska linija humanog mijeloma
NF-κB	( <i>eng.</i> <b>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</b> ) nuklearni faktor kapa lakog lanca koji stimulira aktivirane B ćelije, transkripcijski faktor
NIH-3T3	ćelijska linija mišjeg fibroblasta
NMR	nuklearna magnetna rezonancija
NQO1	( <i>eng.</i> <b>NAD(P)H dehydrogenase (quinone)</b> ) NAD(P)H dehidrogenaza (hinon)
Nrf2	( <i>eng.</i> <b>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</b> ) protein koji kada je aktiviran u jedru reaguje sa elementima odgovornim za antioksidacionu zaštitu ćelija
P450	citohrom P450
PAH	( <i>eng.</i> <b>polycyclic aromatic hydrocarbon</b> ) policiklični aromatični ugljovodonik
PBS	( <i>eng.</i> <b>phosphate-buffered saline</b> ) fosfatom puferisani fiziološki rastvor
PC3	ćelijska linija humanog raka prostate
PCB	( <i>eng.</i> <b>polychlorinated biphenyl</b> ) polihlorovani bifenil
PDI	( <i>eng.</i> <b>protein disulfide isomerase</b> ) protein-disulfid-izometaza
PEPT1	( <i>eng.</i> <b>peptide transporter 1</b> ) peptidni transporter 1
PI	propidijum jodid
PI3K	fosfatidil-inozitol-3-kinaza
PTM	( <i>eng.</i> <b>post-translational modification</b> ) posttranslaciona modifikacija
PUFA	( <i>eng.</i> <b>polyunsaturated fatty acid</b> ) polinezasićena masna kiselina
PUZ	pufer za obradu uzoraka
Q	( <i>eng.</i> <b>quinone</b> ) hinon
Q <sup>-</sup>	semihinonski anjon radikal
QGY7703	ćelijska linija humanog hepatocelularnog raka

ROS	( <i>eng.</i> reactive oxygen species) reaktivne kiseonične vrste
RPMI-1640	( <i>eng.</i> Roswell Park Memorial Institute 1640) medijum za gajenje ćelijskih kultura
SAR	( <i>eng.</i> structure–activity relationship) odnos struktura–aktivnost
SDS	natrijum-dodecil-sulfat
SDS-PAGE	Na-dodecil-sulfat-poliakrilamid-gel-elektroforeza
SK-MES-1	ćelijska linija humanog raka pluća
SK-OV-3	ćelijska linija humanog raka ovarijuma
SMB	Sabouraud maltozni bujon
SMVT	( <i>eng.</i> sodium-dependent multivitamin transporter) Na-zavisni multivitaminski transporter
T	timin
TAE	( <i>eng.</i> Tris-acetate-EDTA) pufer koji sadrži tris, sirćetnu kiselinu i EDTA
TBH	<i>tert</i> -butilhinon
TEMED	tetrametiletilendiamin
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol
TrxR	tioredoksin-reduktaza
UV Vis	ultraljubičasti i vidljivi opseg talasnih dužina
VEGF	( <i>eng.</i> vascular endothelial growth factor) faktor rasta endotela krvnih sudova
VEGFR-2	( <i>eng.</i> vascular endothelial growth factor receptor 2) receptor tipa 2 faktora rasta endotela krvnih sudova
Z-DEVD-FMK	inhibitor kaspaze 3
Z-IETD-FMK	inhibitor kaspaze 8
Z-LEHD-FMK	inhibitor kaspaze 9

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPŠTI DEO</b> .....	<b>3</b>
2.1. Rak.....	<b>3</b>
2.2. Hinoni.....	<b>6</b>
2.2.1. Putevi nastajanja hinona.....	<b>7</b>
2.2.2. Hemija hinona.....	<b>9</b>
2.2.3. Ćelijski molekuli u reakciji sa hinonima.....	<b>11</b>
2.3. Najznačajniji antitumorski agensi sa hinonskom strukturom i mehanizmi njihovog dejstva.....	<b>15</b>
2.3.1. Antraciklini.....	<b>15</b>
2.3.2. Mitomicini.....	<b>17</b>
2.3.3. Streptonigrinoidi.....	<b>19</b>
2.4. Meroterpeni iz morskih sunđera.....	<b>21</b>
2.4.1. Seskviterpenski (hidro)hinoni iz morskih sunđera reda Dictyoceratida.....	<b>21</b>
2.4.2. Hinonska jedinjenja izolovana u novije vreme iz morskih sunđera roda <i>Dysidea</i> .....	<b>22</b>
2.5. Biološki aktivna jedinjenja sa aminokiselinskim ostacima.....	<b>29</b>
2.5.1. Hinonska jedinjenja sa aminokiselinama u strukturi.....	<b>29</b>
2.5.2. Aminokiseline u sastavu prolekova.....	<b>36</b>
<b>3. NAŠI RADOVI</b> .....	<b>42</b>
3.1. Uvod.....	<b>43</b>
3.1.1. Dobijanje aminokiselinskih derivata hinona.....	<b>44</b>
3.1.2. Dobijanje i karakterizacija aminokiselinskih derivata avarona.....	<b>45</b>
3.1.3. Dobijanje i karakterizacija aminokiselinskih derivata <i>tert</i> -butilhinona.....	<b>49</b>
3.1.4. Osobine dobijenih aminokiselinskih derivata hinona.....	<b>52</b>
3.2. Ispitivanje biološke aktivnosti aminokiselinskih derivata hinona.....	<b>56</b>
3.2.1. Ispitivanje citotoksičnog dejstva.....	<b>56</b>
3.2.2. Ispitivanje mehanizma antitumorskog dejstva.....	<b>60</b>
3.2.3. Određivanje ciljnih kaspaza.....	<b>62</b>
3.2.4. Određivanje antibakterijske aktivnosti.....	<b>64</b>
3.2.5. Određivanje antifungalne aktivnosti.....	<b>68</b>

3.2.6. Ispitivanje toksične aktivnosti Brine shrimp testom .....	69
3.2.7. Hemijske modifikacije lizozima .....	70
3.2.7.1. Reakcioni uslovi.....	71
3.2.7.2. Obrada reakcionih smesa.....	73
3.2.7.3. Praćenje interakcija lizozim– hinon.....	73
3.2.8. Interakcije derivata sa CT-DNA .....	77
3.2.8.1. Apsorpcioni spektri.....	78
3.2.8.2. Fluorescentni spektri.....	81
3.2.8.3. Cirkularni dihroizam.....	89
3.2.9. Molekulsko modelovanje.....	90
3.2.10. Interakcije derivata sa plazmidom pUC19.....	91
3.2.11. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti.....	93
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>	<b>95</b>
4.1. Izolovanje avarola .....	96
4.2. Dobijanje avarona .....	96
4.3. Sinteze aminokiselinskih derivata avarona.....	97
4.3.1. <i>N</i> -[3-[[[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -Oktahidro-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1-naftalenil)metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]glicin ( <b>126</b> ).....	97
4.3.2. <i>N</i> -[3-[[[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidro-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1-naftalenil)metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-( <i>S</i> )alanine ( <b>127</b> ).....	98
4.3.3. <i>N</i> -[3-[[[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidro-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1-naftalenil)metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]β-alanin ( <b>128</b> ).....	99
4.3.4. <i>N</i> -[3-[[[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidro-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1-naftalenil)metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-( <i>R</i> )valin ( <b>129</b> ).....	100
4.3.5. <i>N</i> -[3-[[[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidro-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1-naftalenil)metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-( <i>S</i> )leucin ( <b>130</b> ).....	101
4.3.6. <i>N</i> -[4-[[[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidro-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1-naftalenil)metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-( <i>S</i> )proline ( <b>131</b> ).....	102
4.3.7. <i>N</i> -[3-[[[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidro-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1-naftalenil)metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-( <i>S</i> )metionin ( <b>132</b> ).....	103

4.3.8. <i>N</i> -[3-[[[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidro-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1-naftalenil)metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-( <i>S</i> )fenilalanin ( <b>133</b> ).....	104
4.3.9. <i>N</i> -[3-[[[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aS</i> )-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,7,8,8 <i>a</i> -oktahidro-1,2,4 <i>a</i> ,5-tetrametil-1-naftalenil)metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-( <i>S</i> )triptofan ( <b>134</b> ).....	105
4.4. Dobijanje <i>tert</i> -butilhinona.....	106
4.5. Sinteze aminokiselinskih derivata <i>tert</i> -butilhinona.....	106
4.5.1. <i>N</i> -(5- <i>tert</i> -Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-glicin ( <b>136</b> ).....	107
4.5.2. <i>N</i> -(5- <i>tert</i> -Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-alanin ( <b>137</b> ).....	108
4.5.3. <i>N</i> -(5- <i>tert</i> -Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-β-alanin ( <b>138</b> ).....	109
4.5.4. <i>N</i> -(5- <i>tert</i> -Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-D-valin ( <b>139</b> ).....	109
4.5.5. <i>N</i> -(5- <i>tert</i> -Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-leucin ( <b>140</b> ).....	110
4.5.6. <i>N</i> -(4- <i>tert</i> -Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-prolin ( <b>141</b> ).....	111
4.5.7. <i>N</i> -(5- <i>tert</i> -Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-metionin ( <b>142</b> ).....	112
4.5.8. <i>N</i> -(5- <i>tert</i> -Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-fenilalanin ( <b>143</b> )...	113
4.5.9. <i>N</i> -(5- <i>tert</i> -Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-triptofan ( <b>144</b> ).....	114
4.6. Ciklična voltametrij.....	115
4.7. Ispitivanje citotoksičnosti sintetisanih aminokiselinskih derivata hinona.....	115
4.7.1. Čelijske linije.....	115
4.7.2. Tretman čelijskih linija.....	116
4.7.3. Određivanje preživljavanja ćelija.....	116
4.7.4. Analiza faza ćelijskog ciklusa.....	117
4.7.5. Određivanje ciljnih kaspaza.....	118
4.8. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti dobijenih derivata hinona.....	119
4.8.1. Određivanje minimalne inhibitorne aktivnosti.....	120
4.9. <i>Brine shrimp</i> test toksičnosti.....	120
4.10. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti DPPH testom.....	121
4.11. Hemijske modifikacija lizozima aminokiselinskim derivatima hinona.....	122
4.11.1. Uslovi modifikacija.....	122
4.11.2. SDS elektroforeza.....	123
4.11.3. Masena spektrometrija.....	126
4.12. Dejstvo dobijenih derivata na DNA.....	126



4.12.1. Hemikalije i reagensi.....	126
4.12.2. Snimanje UV/Vis apsorpcionih spektara.....	128
4.12.3. Snimanje fluorescentnih spektara.....	128
4.12.4. Snimanje CD spektara.....	129
4.12.5. Elektroforeza na agaroznom gelu.....	129
4.13. Molekulsko modelovanje.....	130
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>131</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>134</b>

# 1. UVOD

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, rak je najčešće dijagnostikovano patološko stanje kod ljudi, posle kardiovaskularnih bolesti.<sup>1</sup> Sa 14 miliona novih slučajeva u svetu u 2012. godini, predviđa se da će u toku naredne dve decenije taj broj porasti za 70%. Time bi se broj obolelih popeo na skoro 25 miliona. Rak je takođe drugi po redu uzročnik smrti u svetu, sa 8,8 miliona žrtava u 2015. godini. Svaki šesti preminuli je bolovao od nekog oblika ove bolesti.<sup>2</sup>

S obzirom na date podatke i činjenicu da postojeći antitumorski lekovi ne mogu da odgovore na novootkrivene mehanizme delovanja bolesti, kao i da je vrlo česta pojava rezistentnosti tumorskih ćelija, iznalaženje novih antitumorskih agenasa je jedan od prioriteta Svetske zdravstvene organizacije. Jedan od uspešnih načina na koji se razvijaju novi medikamenti jeste modifikovanje već postojećih antitumorskih lekova čime se značajno skraćuje vreme od pronalaska do upotrebe leka.

Kao cilj ove doktorske disertacije je postavljeno dobijanje aminokiselinskih derivata seskviterpenskog hinona avarona, izolovanog iz morskog sunđera *Dysidea avara*, i njegovog strukturno značajno uprošćenog model sistema, *tert*-butilhinona. Kako bi se utvrdilo na koji način aminokiselinski ostaci utiču na aktivnost avarona, te da li je postojanje seskviterpenskog dela neophodno za održavanje te aktivnosti, svim derivatima je ispitana biološka aktivnost, sa akcentom na antitumorsko dejstvo i rasvetljavanje potencijalnog mehanizma dejstva.

U *Opštem delu* ove teze su prikazani osnovni podaci o hinonskim jedinjenjima, te pregled najznačajnijih antitumorskih agenasa iz ove grupe jedinjenja, kao i mehanizmi njihovog dejstva. Navedeni su i literaturni podaci koji se odnose na hinonska jedinjenja izolovana iz morskih sunđera roda *Dysidea*. Dat je pregled hinonskih jedinjenja sa aminokiselinskim bočnim nizom, kao i aktivnih agenasa koji u okviru svojih prolekova poseduju aminokiselinske ostatke.

U okviru *Naših radova* su detaljno prikazani rezultati proizašli tokom izrade teze, kao i njihovo tumačenje. Obradeno je dobijanje aminokiselinskih derivata pomenutih hinona, njihova karakterizacija, te ispitivanje biološke aktivnosti i potencijalno rasvetljavanje mehanizma dejstva.

U *Eksperimentalnom delu* su izloženi postupci za dobijanje derivata, njihova potpuna karakterizacija, kao i detalji za izvođenje bioloških ispitivanja.

Na kraju rada se nalazi pregled korišćene literature. Kao prilog je dat CD sa spektrima sintetisanih jedinjenja.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Rak

Rak (*eng. cancer*) spada u oboljenja koja se javljaju kod ljudi u različitim oblicima, bez obzira na pol i starosnu granicu, sa vrlo visokim procentom smrtnih ishoda.

Nakon što u genomu zdrave ćelije dođe do niza somatskih mutacija izazvanih egzogenim i/ili endogenim faktorima, ćelija prolazi kroz transformaciju što za posledicu ima nastanak tumorske ćelije. Za pojavu malignih transformisanih ćelija su odgovorne promene na grupama gena. Mutacijska aktivacija proto-onkogeni, kao i inaktivacija tumor-supresorskih gena, dovode do poremećaja na nivou ćelijske proliferacije i diferencijacije, nekontrolisanog deljenja ćelija, te nastanka tumora. Geni odgovorni za regulisanje nivoa mutacija u ćeliji takođe mogu biti izloženi promenama i na taj način doprineti povećanom broju ćelijskih mutacija i razvoju bolesti.<sup>3</sup>

***Osobine tumorskih ćelija.*** Iako se tumorske ćelije međusobno razlikuju, što je posledica pojave novih mutacija prilikom deobe primarne tumorske ćelije, postoje zajedničke karakteristike koje ih opisuju.

Glavna osobina tumorskih ćelija jeste sposobnost ubrzane ćelijske deobe. Naime, neoplastične ćelije tumora mogu samostalno da proizvode faktore rasta, ali i da stimulišu zaostale normalne ćelije u tumorskom tkivu na dodatno oslobađanje istih faktora. Izraženija ekspresija površinskih receptora tumorskih ćelija čini ih osetljivim na male količine faktora rasta. Ipak, postojanje faktora rasta nije neophodno. Promene u strukturi samih receptora, kao i uticaj na konstituente unutarćelijskih signalnih puteva (PI3K/AKT, MAPK/ERK), dovode do nekontrolisane proliferacije.<sup>4</sup>

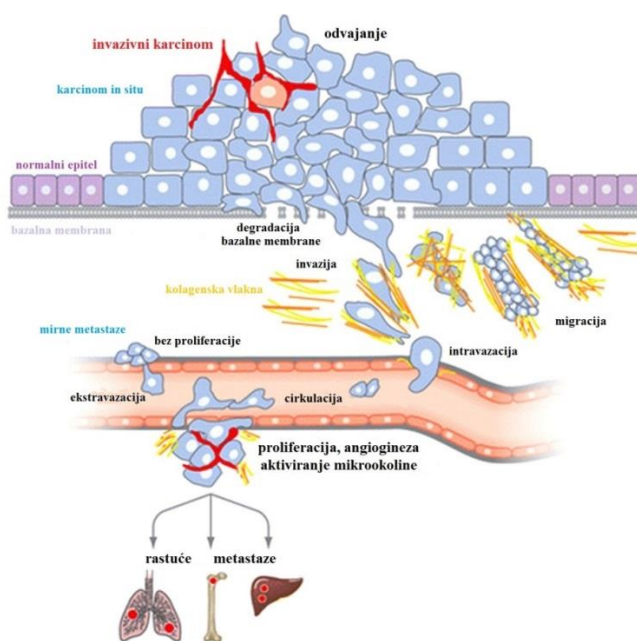
Inaktivacija tumor-supresorskih gena koji, za razliku od onkogeni, inhibiraju ćelijsku proliferaciju je jedan od uslova nastanka malignih transformacija. Ovi geni regulišu različite celularne aktivnosti.<sup>5</sup> Glavni tumor-supresori p53 i Rb su uključeni u regulaciju rasta ćelija, deobu, preživljavanje i/ili apoptozu.<sup>6</sup>

Mutacije u genu p53 eliminišu mogućnost uvođenja neoplastičnih ćelija u programiranu ćelijsku smrt. Tumorske ćelije su razvile i druge mehanizme kako bi sprečile proces apoptoze.<sup>7</sup>

Tumorske ćelije se odlikuju sposobnošću da prođu kroz neograničen broj ćelijskih deoba, odnosno da spreče skraćivanje telomera na krajevima hromozoma.<sup>8</sup>

Kako bi se neoplastične ćelije snabdele kiseonikom i hranljivim materijama, neophodna je dobra prokrvljenost tumora. U procesu angiogeneze,<sup>9</sup> odnosno nastajanja novih krvnih sudova, tumorske ćelije oslobađaju angiogene stimulatore, kao što je vaskularni endotelni faktor rasta, VEGF. Time se aktiviraju epitelne ćelije okolnih kapilara, te dolazi do formiranja novih krvnih sudova u tumoru.<sup>10</sup>

Jedna od najznačajnijih osobina tumorskih ćelija je mogućnost prelaska u okolna tkiva i formiranje metastaza.<sup>11</sup> Sam proces metastaze (*slika 1*) počinje inicijalnom fazom, odnosno invazijom. U toku te faze, tumorske ćelije se odvajaju od primarnog tumora usled promena u međućelijskom vezivanju, dolazi do degradacije bazalne membrane tumora, te ćelije tumora dospevaju do ekstracelularnog matriksa (ECM). Nakon proteolitičke degradacije ECM i bazalne membrane krvnog ili limfnog suda, tumorske ćelije prolaze kroz usku pukotinu između epitelnih ćelija suda i dospevaju u cirkulaciju.<sup>12</sup>



*Slika 1.* Proces karcinogeneze koji vodi do metastaze (izvor: ref <sup>13</sup>)

***Način lečenja tumora.*** Na koji način će se vršiti lečenje pacijenta obolelog od raka, zavisi od osobina i stadijuma bolesti.

Hirurškim putem se uspešno odstranjuju lokalizovani primarni tumori kod kojih nije uočena metastaza. Kako postoji mogućnost da se na ovaj način ne odstrane sve ćelije tumora, moguća je naknadna primena radioterapije ili hemioterapije, radi suzbijanja njihovog daljeg rasta i ponovne pojave tumora.

Radioterapija je jedna od najčešćih metoda lečenja koja se primenjuje na gotovo 70% onkoloških bolesnika. Za neke od bolesnika, to je i jedina indicirana terapija. Sa druge strane, radioterapija nije uvek primenjiv vid lečenja. Razlog za to leži u neujednačenoj osetljivosti različitih tumora na zračenje, kao i mestu gde su locirani (potrebno je izbeći veća oštećenja okolnih zdravih tkiva). Moderna radioterapija koristi različite strategije i modalitete kako bi se postigao što efikasniji klinički efekat, dok uvođenje individualne radioterapije u kliničku praksu predstavlja imperativ savremenih istraživanja.

Hemioterapija predstavlja još uvek najčešći način lečenja pacijenata sa ovom bolešću. Cilj je sistematsko uništavanje malignih ćelija pomoću antitumorskih agenasa koji cirkulišu kroz krvne sudove i dospevaju do malignih ćelija gde god da postoje u organizmu. U zavisnosti od vrste raka, dejstvo hemioterapije može dovesti do potpunog izlečenja, ili pak, nakon prethodno izvršene hirurške intervencije, znatno povećati mogućnost izlečenja.

Potrebno je naglasiti da svaki vid terapije, u manjoj ili većoj meri, dovodi do oštećenja okolnih zdravih tkiva.

***Antitumorski agensi.*** Koliko god se antitumorski agens smatrao efikasnim, gotovo je nemoguće uništenje svih neoplastičnih ćelija. Iz preostalih ćelija je moguće nastajanje novih tumora. Takođe, ćelije tumora izložene dejstvu antitumorskih agenasa mogu razviti rezistentnost prema jednom ili više agenasa. Iz toga proizilazi smanjenje efikasnosti hemioterapije, a nekada i potpuni izostanak odgovara na njeno dejstvo. Zato se najčešće primenjuje kombinacija nekoliko agenasa koji imaju različite mehanizme delovanja. Prirodni proizvodi i njihovi derivati su idealni za ovakav pristup jer su aktivni u razumnim koncentracijama, a opet dovoljno blagi da se mogu bezbedno koristiti jedni sa drugima. U literaturi je zabeležen značajan broj prirodnih proizvoda

koji su se pokazali kao efiksni antitumorski agensi prema rezistentnim ćelijskim linijama raka,<sup>14</sup> što ukazuje na neophodnost daljeg istraživanja prirodnih resursa.

## 2.2. Hinoni

Hinoni predstavljaju klasu jedinjenja vrlo zastupljenu u živim organizmima. Način nastajanja hinona u organizmu, kao i njihova funkcija se značajno razlikuju.

Hinoni mogu biti toksični intermedijeri koji izazivaju različite štetne efekte *in vivo*, uključujući citotoksičnost, imunotoksičnost i karcinogenezu. Nasuprot tome, hinoni mogu indukovati zaštitu ćelije putem aktivacije enzima detoksikacije, antiinflamatornih aktivnosti i modifikacije redoks statusa.

Naime, hinonska jedinjenja koja učestvuju u metaboličkim procesima, čime se obezbeđuje normalno funkcionisanje ćelija i čije postojanje je neophodno, čine grupu prirodnih, endogenih hinona. Tako npr. ubihinon (koenzim Q<sub>10</sub>) učestvuje kao kofaktor u elektron-transportnom lancu, u nizu redoks reakcija koje su uključene u sintezu ATP-a.<sup>15</sup> Takođe, imaju ulogu antioksidansa u mitohondrijama, te sprečavaju stvaranje slobodnih radikala i modifikacije ćelijskih molekula.<sup>16</sup> Vitamin K je bitan kofaktor u procesu koagulacije krvi.<sup>17</sup>

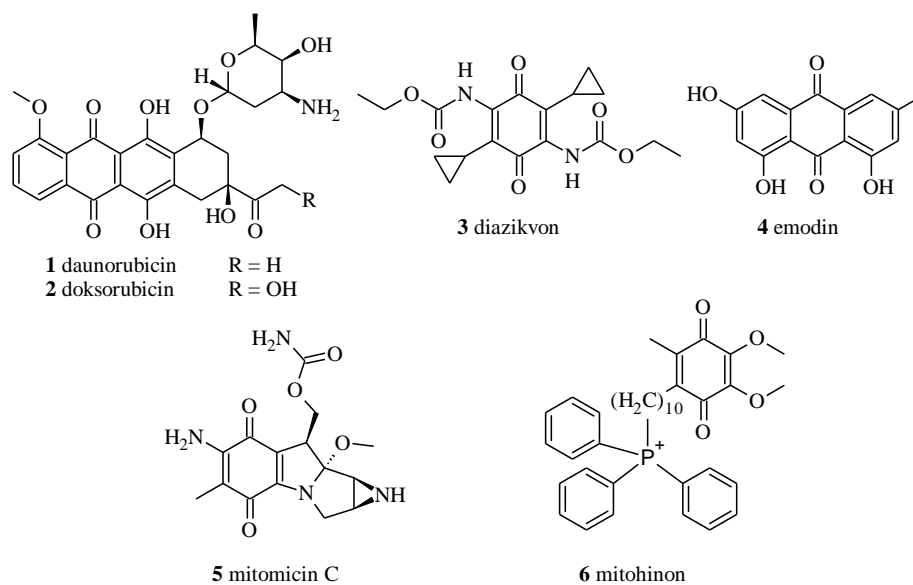
Bioaktivacijom jedinjenja, najčešće ksenobiotika sa aromatičnim prstenovima u strukturi, nastaju hinonski metaboliti koji su odgovorni za njihovu toksičnost. Hepatotoksični efekat antiepileptika karbamazepina se pripisuje nastanku karbamazepinskog *o*-hinona.<sup>18</sup> Antikonvulzant fenitoin izaziva probleme na koži kod 5-10% pacijenata za šta je opet odgovoran njegov hinonski metabolit.<sup>19</sup> Sedativ talidomid je povučen sa tržišta nakon što je ustanovljeno da je uzrok velikog broja urođenih deformiteta. Teratogenom efektu leka značajno doprinosi konverzija do hinonske forme.<sup>20</sup>

Ipak, mnogo su brojnija hinonska jedinjenja sa terapijskim dejstvom. Među ovim jedinjenjima se izdvajaju hinoni sa antibiotskim i antitumorskim delovanjem koji su odavno u kliničkoj primeni.

### 2.2.1. Putevi nastajanja hinona

Hinoni u organizmu nastaju na različite načine, od jednostavne oksidacije katehola/hidrohinona katalizovane raznim oksidativnim enzimima i metalnim jonima, do složenih mehanizama koji uključuju inicijalne reakcije hidroksilacije katalizovane citohromom P450 praćene dvoelektronskom oksidacijom.

*p*-Hinoni su znatno stabilniji od *o*-hinona. Razlog tome je međusobni položaj 1,2-diketonskih grupa *o*-hinona. Pored već pomenutih endogenih hinona, u ovu grupu spadaju i razni hemioterapeutske agensi kao što su daunorubicin (**1**), doksorubicin (**2**), diazikvon (**3**), emodin (**4**), mitomicin C (**5**), zatim ubihinonski analozi, npr. mitohinon (**6**), efikasni u lečenju Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (slika 2).<sup>21</sup>



Slika 2. Hemioterapeutske i ubihinonske analozi

Hinoni nastaju oksidacijom hidrohinona/katehola katalizovanom nekim od oksidativnih enzima (P450, COX-2, MAO itd.), zatim metalnim jonima ili samo molekulskim kiseonikom bez prisustva enzima (shema 1).

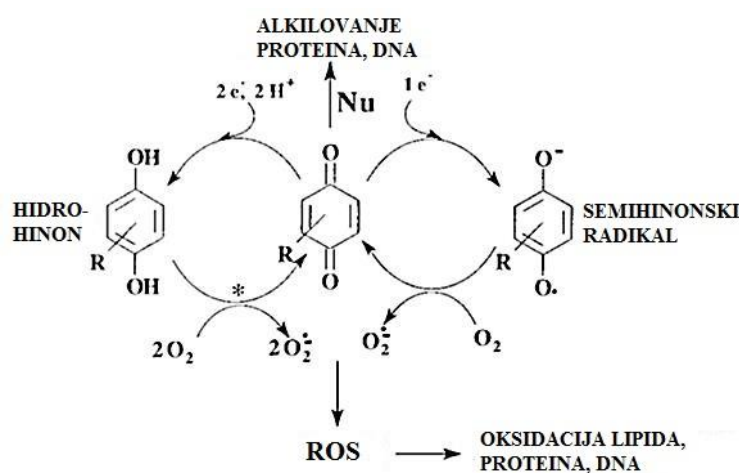




### 2.2.2. Hemija hinona

Hinoni imaju sposobnost da učestvuju u oksido-redukcionim reakcijama što može dovesti do stvaranja biološki aktivnih intermedijera.

**Redukcija hinona.** Bioreduktivna aktivacija hinona u ćeliji započinje reakcijom redukcije. U zavisnosti od mehanizma reakcije, razlikuju se dva načina delovanja hinona (*shema 4*).

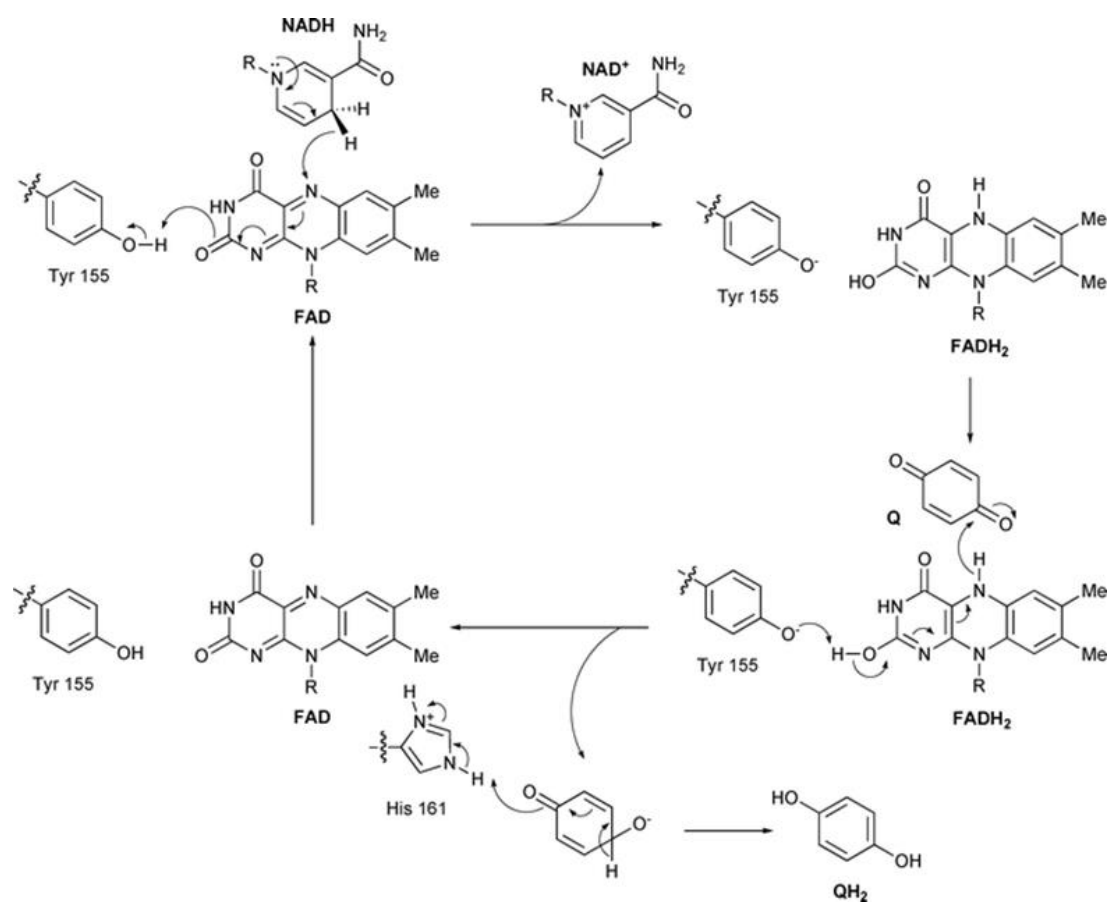


*Shema 4.* Redukcija hinona i njihovo dalje delovanje (izvor: ref <sup>22</sup>)

Reakcija redukcije hinona jednoelektronskim mehanizmom, najčešće katalizovana NADPH zavisnom citohrom P450-reduktazom, dovodi do generisanja semihinonskog radikala ( $Q^{\cdot-}$ ). U aerobnim uslovima, nastali intermedijer je veoma nestabilan i oksiduje se nazad do polaznog hinona molekulskim kiseonikom.

U navedenom procesu se stvara superoksidni anjon-radikal, prvi u nizu reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Nastali  $O_2^{\cdot-}$  je nestabilan u vodenoj sredini i spontano prelazi u vodonik-peroksid, uz oslobađanje molekulskog kiseonika.  $H_2O_2$  je posebno štetan jer se može redukovati u reakciji sa gvožđem (Fentonova reakcija) ili bakrom, generišući izuzetno toksični hidroksilni radikal. Nastajenje ROS-a dovodi do oksidativnog stresa u ćeliji što je glavni razlog toksičnosti hinona.

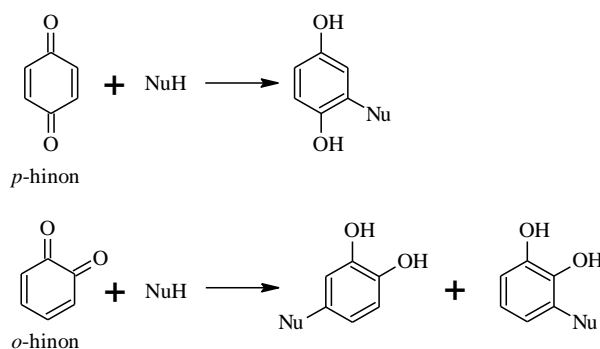
Ukoliko hinon primi dva elektrona, pod dejstvom NAD(P)H-hinon-oksido-reduktaze 1, redukuje se do hidrohinona ( $H_2Q$ ) (*shema 5*).



Shema 5. Redukcija hinona dejstvom NAD(P)H-hinon-oksidoireduktaze 1 (izvor: ref <sup>23</sup>)

Nastali hidrohionon može delovati citotoksično ili biti neutralisan glukuronidacijom ili sulfatacijom, što zavisi od njegove reaktivnosti.

**Kovalentne modifikacije.** Osim što se lako redukuju, hinoni predstavljaju Michael-ove akceptore i lako reaguju sa mekim nukleofilima, kao što je sulfhidrilna grupa cisteinskih ostataka glutationa i proteina. Nesupstituisani *p*-hinoni učestvuju u reakciji koja je označena kao 1,4-reduktivna adicija Michael-ovog tipa, gde dolazi do stvaranja hidrohionona na koji se adira ćelijski nukleofil. *o*-Hinoni podležu 1,6-reduktivnoj Michael-ovoj adiciji usled produžene konjugacije (shema 6).

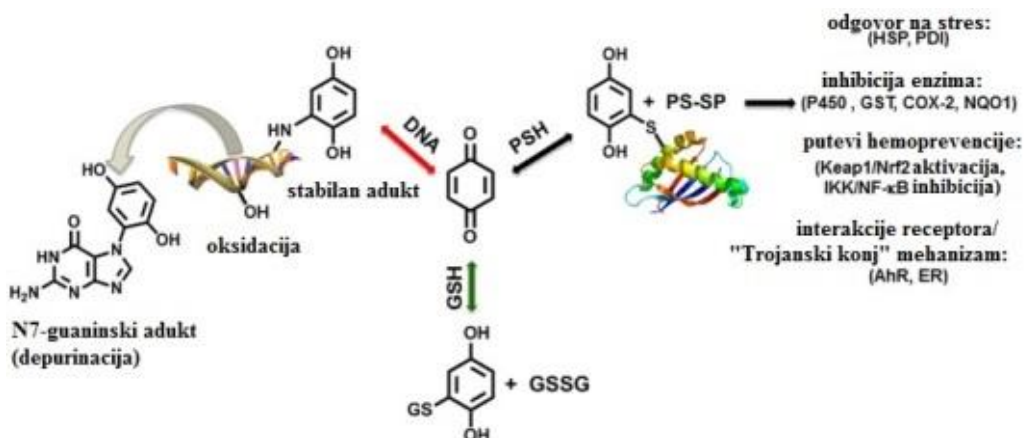


Shema 6. 1,4- i 1,6-reduktivna adicija Michael-ovog tipa

Supstituenti na hinonu značajno utiču na ponašanje hinona, odnosno na činjenicu da li će proći kroz redukciju ili eliminaciju fazu. Prisustvo elektron-akceptorske grupe na hinonskom jezgru čini jedinjenje podložnijim redukciji, dok postojanje elektron-donorske grupe favorizuje eliminaciju.<sup>24</sup>

Ukoliko dođe do eliminacione reakcije, nastaje alkilujući hinonski intermedijer koji ili ulazi u proces detoksifikacije ili reaguje sa ćelijskim nukleofilima izazivajući oštećenje na esencijalnim biomolekulima, proteinima i/ili DNA.

### 2.2.3. Ćelijski molekuli u reakciji sa hinonima



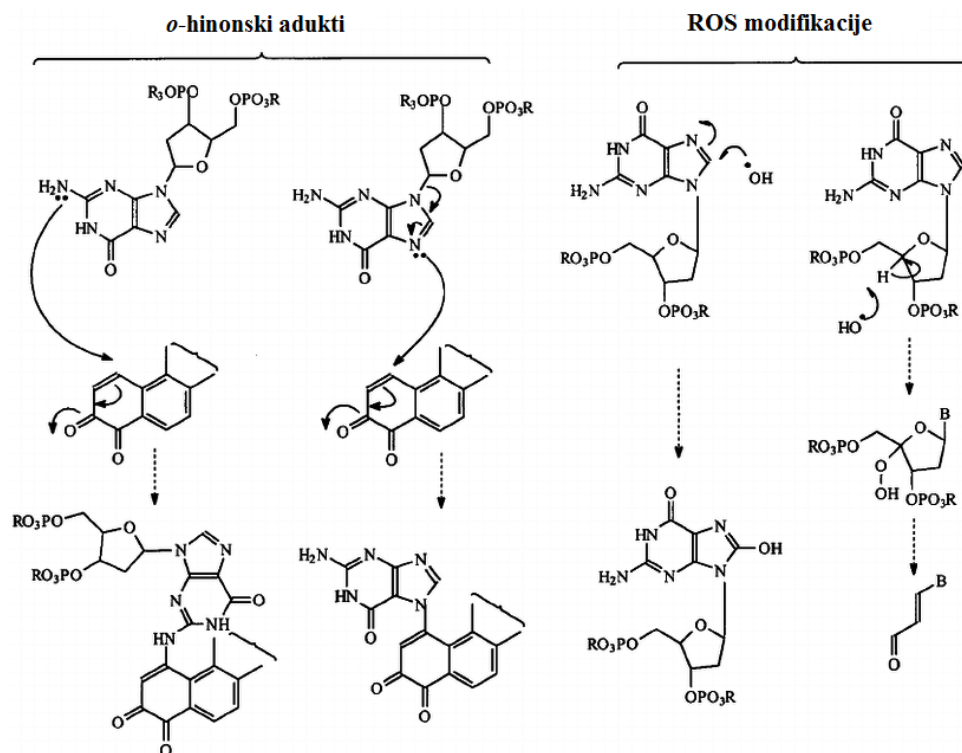
Slika 3. Mete dejstva hinona (izvor: ref <sup>25</sup>)

**Glutation.** Glutation je najznačajniji neproteinski sumporni nukleofil u ćeliji, čija je glavna uloga da zaštiti ćeliju od reaktivnih elektrofila i slobodnih radikala.<sup>26</sup> U reakciji sa hinonima veoma lako dolazi do generisanja glutationskih konjugata (slika 3),

tako da katalitičko dejstvo glutathion-*S*-transferaze nije neophodno.<sup>27</sup> Nastali konjugati su polarniji i izlučuju se preko urina. S obzirom na to, reakcija nastajanja glutationskih konjugata se smatra početnom u procesu detoksifikacije, odnosno biotransformacije elektrofilnih vrsta.

**Proteini.** Nakon što se iskoriste rezerve glutathiona, mete veoma reaktivnih hinona postaju proteini koji se nalaze u visokim koncentracijama i poseduju velik broj cisteinskih ostataka, kao što su proteini toplotnog šoka (*eng.* heat shock proteins).<sup>28</sup> Hinoni takođe inhibiraju enzime koji učestvuju u njihovom nastanku (P450, COX-2),<sup>29</sup> kao i one koji katalizuju njihovu detoksifikaciju (COMT, NQO1, GST).<sup>30</sup> Dejstvu nekih hinonskih jedinjenja su izložene i komponente signalnih puteva (Keap1/Nrf2/ARE, NF- $\kappa$ B).<sup>31</sup>

**DNA.** Hinonska jedinjenja deluju na molekule DNA različitim mehanizmima (*shema 7*). Kada se hinon kovalento vezuje za neku od baza DNA, dolazi do stvaranja DNA–hinonskih adukata. Indirektno dejstvo hinona na DNA se pripisuje dejstvu ROS-a, najčešće HO $\cdot$ , koji nastaju prilikom redukcije hinona.

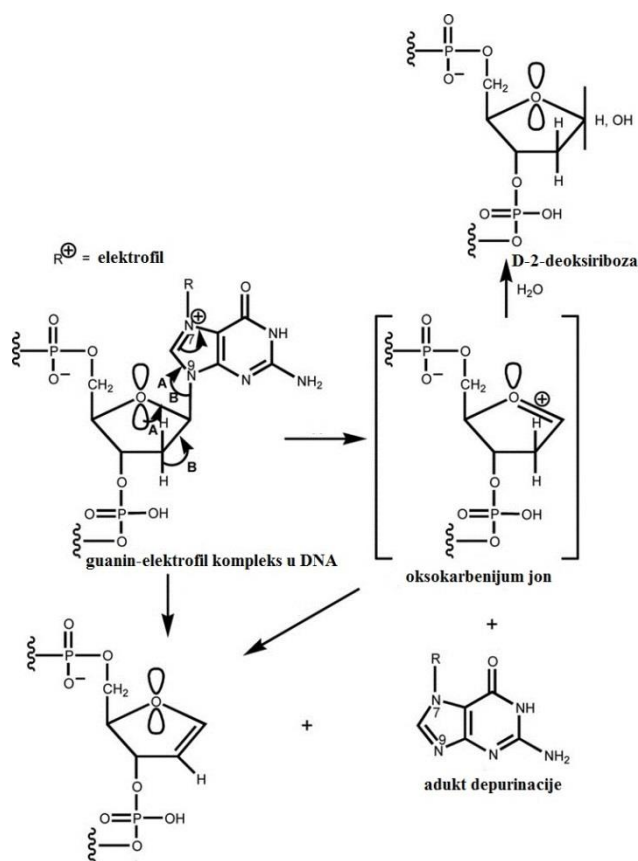


Shema 7. Dejstvo hinona na DNA (izvor: ref<sup>32</sup>)

Oksidativna oštećenja DNA nastaju kao posledica dejstva PAH *o*-hinona i PCB hinona, pri čemu nastaje 8-okso-dezoksiguanozin koji se smatra biomarkerom za ovaj vid oštećenja pomenutog biomolekula.<sup>33</sup> *o*-Hinoni policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH-ova) dovode i do oksidacije pirimidinskih baza preko redoks ciklusa. Na taj način dolazi do transverzije G u T, što doprinosi pojavi raka pluća.<sup>33(a), 34</sup> 8-Okso-dezoksiguanozin je doveden u korelaciju sa mutacijama p53 kod pacijenata sa ovim oboljenjem, što nedvosmisleno svrstava navedene hinone u tumorske činioce.<sup>35</sup>

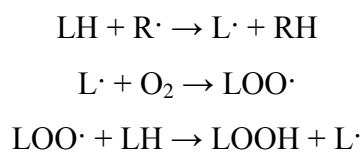
Prekomerno generisanje ROS-a prilikom redoks ciklusa estrogenskih hinona i njihovih semihinonskih radikala dovodi do cepanja fosfodiesterne veze, kao i oksidacije purinskih i pirimidinskih baza,<sup>36</sup> što je u direktnoj vezi sa nastajanjem metastaza kod obolelih od raka dojke.<sup>37</sup>

Hinoni takođe mogu da izazovu i depurinizaciju molekula DNA. Najčešće nastaju N7-guaninski (*shema 8*) i N3-adeninski adukti. Njihova pojava se vezuje za dejstvo dopaminskih ili 4-hidroksiestron/estradiol *o*-hinona,<sup>38</sup> ali literaturni podaci ukazuju da isti adukti nastaju dejstvom i bisfenola A, PAH-ova i benzena.<sup>39</sup> Za razliku od navedenih nestabilnih depurinskih adukata koji bivaju “popravljeni” dejstvom enzima, evidentirano je i postojanje izrazito mutagenih cikličnih DNA adukata *p*-benzohinona.<sup>40</sup>



Shema 8. Depurinizacija DNA (izvor: ref <sup>41</sup>)

**Lipidi.** Slobodni radikali nastali tokom redoks ciklusa hinona takođe utiču i na lipide što dovodi po oksidativne degradacije ovih biomolekula, odnosno lipidne peroksidacije (shema 9).



Shema 9. Mehanizam lipidne peroksidacije

Lipidni peroksidi se uvek razlažu do različitih aldehida (malondialdehid, akrolein, 4-hidroksinon-2-enal itd.) koji su najčešće biološki aktivna jedinjenja.<sup>42</sup> Lipidna peroksidacija se često povezuje sa nastajanjem različitih bolesti, kao što su

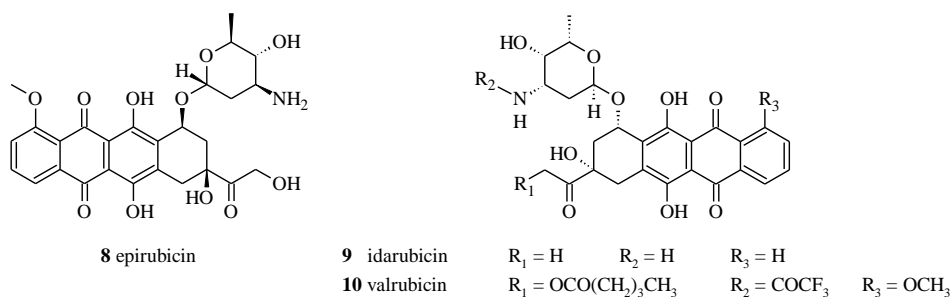
neurodegenerativne bolesti (Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, moždani udar), rak, ateroskleroza i proces starenja.<sup>43</sup>

### 2.3. Najznačajniji antitumorski agensi sa hinonskom strukturom i mehanizmi njihovog dejstva

Antitumorski agensi sa hinonskim jezgrom u svojoj strukturi su našli široku primenu u kliničkim uslovima. Većina tih jedinjenja potiče iz prirodnih izvora. Iako su njihova dejstva vrlo izražena, neprestano se teži otkrivanju novih efikasnijih jedinjenja.

#### 2.3.1. Antraciklini

Antraciklinski antibiotici spadaju u najefikasnije antitumorske agense. Daunorubicin (1) i doksorubicin (2), izolovani iz različitih vrsta *Streptomyces*, su prvi predstavnici grupe jedinjenja sa antrahinonskom hromoforom koji su odobreni od strane Uprave za hranu i lekove (*eng.* Food and Drug Administration, FDA) za kliničku primenu. Pored njih, u upotrebi se nalaze i epirubicin (8), idarubicin (9) i valrubicin (10) (slika 4).<sup>44</sup>



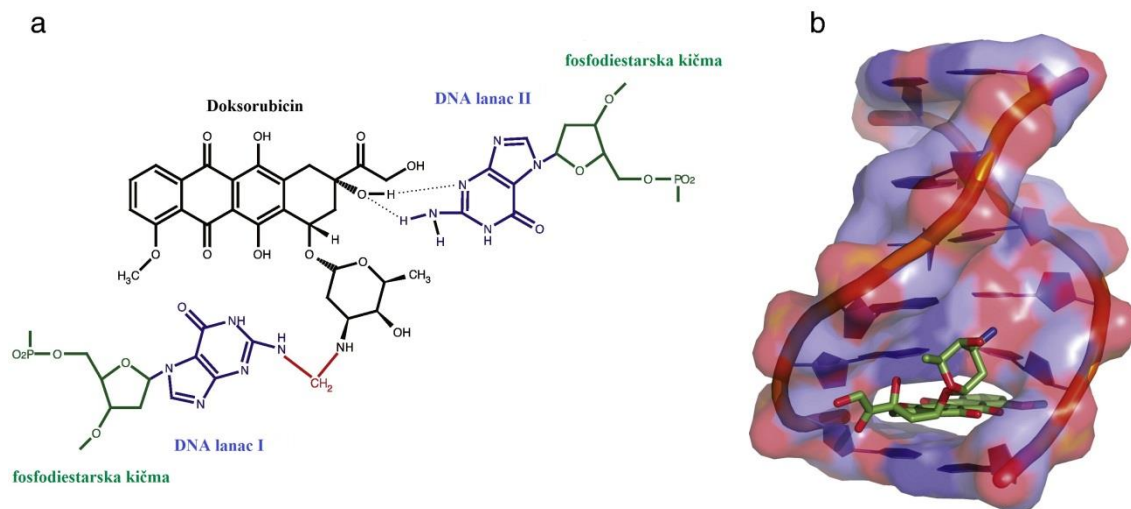
Slika 4. Antraciklinski antibiotici

Iako se daunorubicin i doksorubicin razlikuju samo po jednoj hidroksilnoj grupi, postoji velika razlika u njihovoj antitumorskoj aktivnosti. Dok je daunorubicin aktivan samo prema leukemiji, doksorubicin je aktivan i prema širokom spektru karcinoma



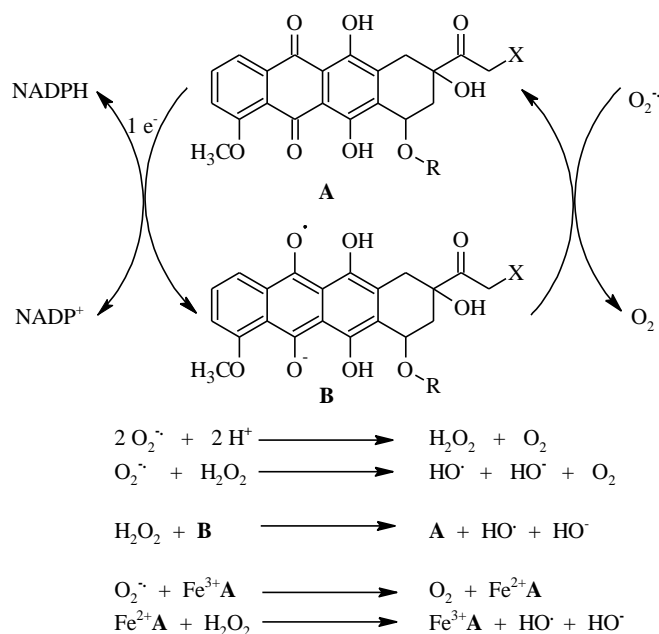
(limfomi, rak dojke, pluća, tumori kod dece itd.).<sup>45</sup> Mehanizam dejstva antraciklina je složen i još uvek nije u potpunosti razjašnjen.

Agensi iz ove grupe se interkaliraju u dvostruki lanac DNA (*slika 5*), grade ternarni kompleks sa DNA-topoizomerazom II, čime se sprečava zatvaranje dvostrukog lanca DNA, te dolazi do inhibicije procesa replikacije.<sup>46</sup>



*Slika 5.* Vezivanje doksorubicina za lance DNA (a) i njegova interkalacija u DNA (b)  
(izvor: ref <sup>47</sup>)

Antraciklini su odgovorni i za stvaranje ROS-a. Nakon jednoelektronske redukcije i nastajanja antraciklinskog semihinonskog radikala, dolazi do transfera elektrona na molekularni kiseonik i generisanja superoksidnog anjon-radikala. U reakciji sa vodonik-peroksidom dolazi do stvaranja ROS-a (*shema 10*), koji su odgovorni za oštećenja DNA, lipidnu peroksidaciju, oksidativni stres, te aktiviranje apoptotičkih puteva.<sup>46</sup>



Shema 10. Nastajanje hidroksi radikala

Prekidi lanaca DNA mogu biti izazvani i stvaranjem feri kompleksa sa antraciklinima pri čemu nastaju slobodni radikali koji oštećuju DNA i membrane.<sup>48</sup>

### 2.3.2. Mitomicini

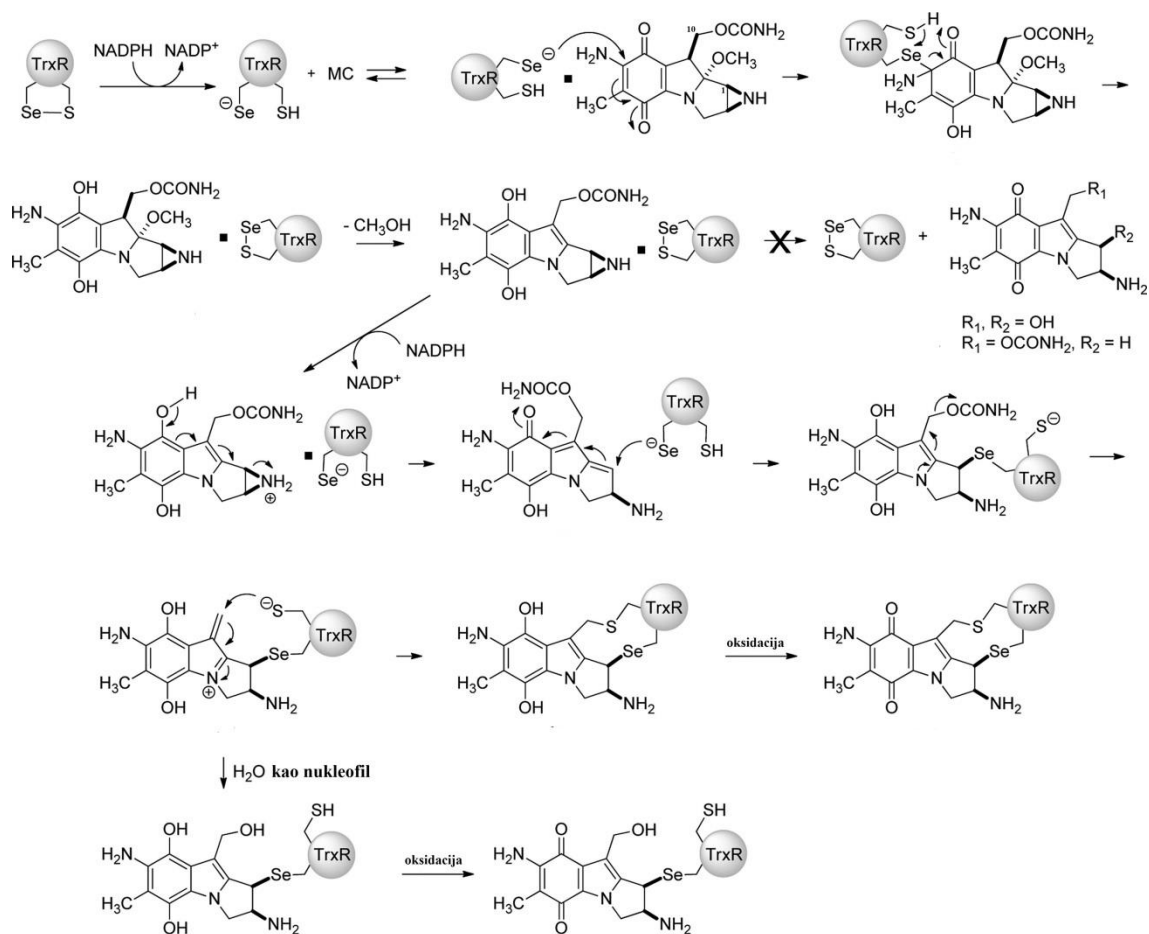
Mitomicini su hinonski alkilujući agensi izolovani iz *Streptomyces* sp. Mitomicin C (**5**) (*Streptomyces caespitosus*)<sup>49</sup> je najznačajniji predstavnik ovih antitumorskih antibiotika i jedan je od najaktivnijih antitumorskih lekova čija primena seže u 1974. godinu.<sup>50</sup>

Mitomicin C predstavlja prototip bioreduktivnih alkilujućih lekova, što podrazumeva da nakon redukcije dolazi do stvaranja elektrofilnih vrsta koje se kovalentno vezuju za celularne makromolekule. Dostora se smatralo da je mitomicin C biološki aktivan zahvaljući kovalentnom vezivanju sa DNA,<sup>51</sup> dok je manje zastupljena hipoteza išla u prilog redukciji i stvaranju ROS-a.<sup>52</sup>

Kao bioreduktivni agens, mitomicin C je u svom izvornom obliku inertan prema nukleofilima, ali nakon konverzije nastale nizom reakcija iniciranih redukcijom hinonskog prstena, postaje ekstremno reaktivan bifunkcionalni elektrofil.<sup>53</sup> S obrizom na to, svrstava se u grupu prolekova. Reduktivno alkilovanje mitomicina C dovodi do

generisanja reaktivnog intermedijera sa dva elektrofilna mesta na ugljenikovim atomima C-1 i C-10, koji je sposoban da alkiluje biološke nukleofile, najčešće DNA.<sup>51(b)</sup> Nastajanje inter- ili intra-DNA adukata se dugo smatralo glavnim razlogom njihove citotoksičnosti.<sup>54</sup> Mitomicin C alkiluje i druge ćelijske nukleofile, npr. glutation, dok je nedavno dokazano i da rRNA predstavlja metu redukciono aktiviranog agensa.<sup>55</sup>

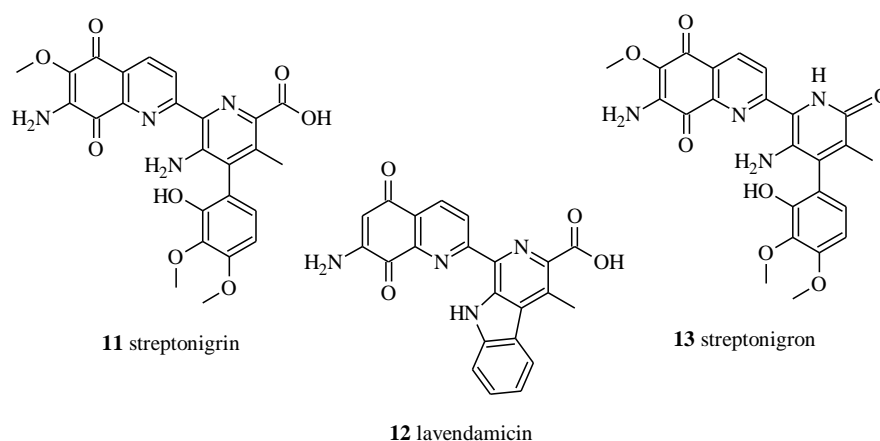
Prevođenje mitomicina C u aktivni oblik unutar ćelije je pripisano dejstvu nekoliko reduktaza, dok poslednji radovi ukazuju na GRP58, protein koji poseduje ditiolno aktivno mesto u tioredoksinskom domenu (eng. *thioredoxin like domains*).<sup>56</sup> S obzirom na to da je prethodno dokazano da običan ditiol redukcijom može aktivirati mitomicin C, te da novonastali oblik mitomicina C može dalje reagovati sa dodatnim ditiolom kovalentno se vezujući za dva atoma sumpora,<sup>57</sup> Paz *et al.* su dokazali da je dejstvo mitomicina C primenjivo i na enzim tioredoksin-reduktazu.<sup>58</sup> Ovaj enzim, sa selenol-tiolnim aktivnim mestom,<sup>59</sup> predstavlja direktnu metu za pojedine antitumorske lekove koji su u kliničkoj primeni.<sup>60</sup> Istraživanja su dovela do novog mehanizma prikazanog na *shemi 11*, što svrstava mitomicin C u ireverzibilne inhibitore tioredoksin-reduktaze.<sup>58</sup>



Shema 11. Mehanizam dejstva mitomicina C na tioredoksin-reduktazu (izvor: ref <sup>58</sup>)

### 2.3.3. Streptonigrinoidi

Streptonigrinoidi predstavljaju grupu prirodnih proizvoda čiji su najznačajniji predstavnici streptonigrin (**11**), lavendamicin (**12**) i streptonigrin (**13**) (slika 6).



Slika 6. Streptonigrinoidi

Streptonigrin je aminohinonski antitumorski antibiotik izolovan iz *Streptomyces flocculus*.<sup>61</sup> Strukturu ovog agensa utvrđenu 1963. godine<sup>62</sup> sačinjavaju četiri šestočlana prstena, pri čemu su aminohinolinski i supstituisani piridinski prstenovi skoro koplanarni, dok je četvrti prsten praktično normalan u odnosu na njih.<sup>63</sup> Streptonigrin deluje citotoksično na širok spektar tumora, uključujući tumore dojke, pluća, limfome i melanome.<sup>64</sup> Njegova upotreba je ograničena jer indukuje tešku i dugu depresiju kičmene moždine.<sup>65</sup>

Mehanizam dejstva streptonigrina je raznolik.<sup>66</sup> Postoji nekoliko ćelijskih mehanizama odgovornih za antitumorsku aktivnost, kao što je izazivanje smetnji pri ćelijskom disanju, zatim ometanje sinteze DNA i direktno oštećenje DNA.<sup>67</sup> Streptonigrin se bioaktivira DT-dijaforazom (NAD(P)H:hinon-oksidoreduktaza), enzimom čija je aktivnost povećana u pojedinim tumorima.<sup>68</sup> Dokazano je da se sa blokiranjem aminohinonskog jezgra gubi i antitumorska aktivnost, iz čega proizilazi da je taj deo streptonigrina esencijalan za citotoksičnost.<sup>69</sup> Da bi izazvao oštećenje DNA, potrebno je da se hinonski deo molekula redukuje do semihinona u prisustvu NADH, što dalje dovodi do stvaranja ROS.<sup>70</sup> Streptonigrin je i ireverzibilni inhibitor posttranslacione modifikacije (PTM4), odnosno arginin-deiminaze.<sup>71</sup>

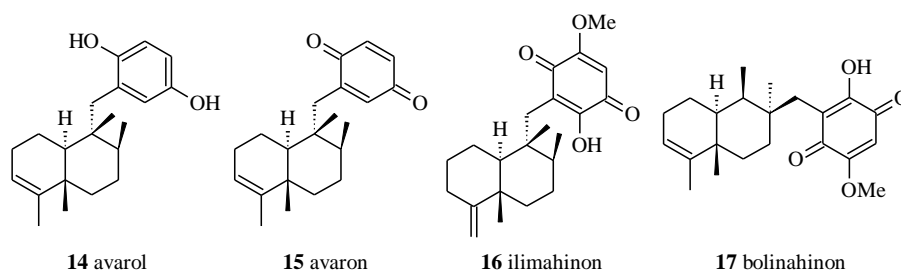
## 2.4. Meroterpeni iz morskih sundera

Meroterpeni predstavljaju klasu kompleksnih metabolita izolovanih iz prirodnih resursa. Grupu sačinjavaju jedinjenja koja su strukturno veoma raznolika; od jednostavnih jedinjenja koja u svojoj građi poseduju prenilnu grupu direktno vezanu za hidrohion, do komponenti sa jedinstvenim strukturama nastalim intra- i intermolekulskim zatvaranjem prstena ili premeštanjem terpenskog skeleta.

Morski sunderi su se pokazali kao neiscrpan izvor meroterpenskih jedinjenja čiji terpeniski skelet varira u broju izoprenskih jedinica i načinu njihovog povezivanja. Veliki udeo ovih prirodnih proizvoda čine seskviterpensi hinoni kod kojih je dekalinska struktura (drimanski ili 4,9-fridodrimanski skelet) povezana sa hinonskim/hidrohionskim jezgrom, obično preko metilenskog mosta. Izuzetna biološka aktivnost jedinjenja (antimikrobna, antimalarijska, anti-HIV, imunomodulatorna itd.), sa posebnim akcentom na citotoksično i antiproliferativno dejstvo, čini ih bitnim i aktuelnim dugi niz godina.

### 2.4.1. Seskviterpensi (hidro)hinoni iz morskih sundera reda Dictyoceratida

Seskviterpensi hinoni i hidrohiononi izolovani iz sundera reda Dictyoceratida spadaju u najbrojnije grupe sekundarnih metabolita sa antitumorskom aktivnosti. Njihovi najznačajniji predstavnici sa tipičnim 4,9-fridodrimanskim skeletom u strukturi su avarol (**14**) i avaron (**15**) iz *Dysidea avara*, ilimahinon (**16**) iz *Petrosaspongia metachromia* (prethodni naziv *Hippospongia metachromia*), bolinahinon (**17**) iz *Dysidea* sp., kao i nakidžihinoni iz *Dysidea* sp. o kojima se može više naći u odeljku 2.5.1. (slika 7).



Slika 7. Hinoni i hidrohini sa 4,9-fridodrimanskim skeletom

Bioaktivnost (antitumorska, antivirusna, antiinflamatorna itd.), mehanizmi dejstva i reaktivnost pomenutih jedinjenja su detaljno ispitani i prikazani u literaturi.

Zahvaljujući T-limfotropnoj citotoksičnoj aktivnosti, niskoj toksičnosti kod miševa, sposobnosti da prolaze krvno–moždanu barijeru, kao i da stimulišu sintezu interferona, avarol i avaron su prepoznati kao dobra polazna jedinjenja za transformacije kako bi se pojačala njihova biološka dejstva, uključujući i citotoksičnost.<sup>72</sup>

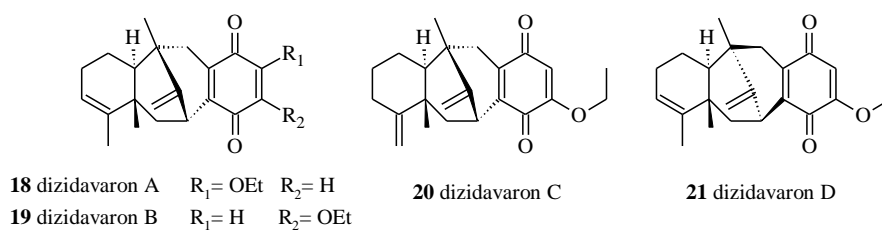
Ilimahinon je pokazao antiproliferativno dejstvo na panel ćelijskih linija raka (PC-3, LNCaP, A549, Hep3B itd.), te je utvrđeno da su mehanizmi njegovog dejstva različiti (fragmentacija Goldžijevog aparata, zaustavljanje ćelijskog ciklusa, uticaj na komponente signalnih puteva).<sup>73</sup>

Citotoksično dejstvo bolinahinona na ćelijsku liniju humanog raka creva HCT-116 je pripisano oštećenju molekula DNA.<sup>74</sup>

#### 2.4.2. Hinonska jedinjenja izolovana u novije vreme iz morskih sundera roda *Dysidea*

Poslednjih godina je izolovan značajan broj seskviterpenskih hinona i hidrohina iz sundera *Dysidea* sp. U nastavku će biti prikazane njihove strukture i opisane biološke aktivnosti.

**Dizidavaroni.** Iz sundera *D. avara* (Južno kinesko more) izolovani su dizidavaroni A–D (**18–21**) (slika 8), seskviterpenski hinoni sa retkim dizidavaronskim skeletom, za koje se smatra da su nastali u procesu biogeneze iz avarona i neoavarona.<sup>75</sup>

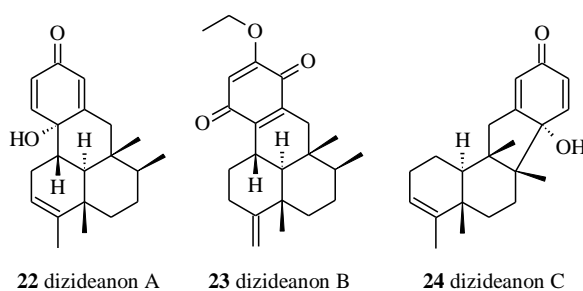


Slika 8. Dizidavaroni A–D

Jedinjenje dizidavaron D je pokazalo antitumorsko delovanje prema tumorskim ćelijskim linijama HeLa ( $\text{IC}_{50}$  28,8  $\mu\text{M}$ ), A549 ( $\text{IC}_{50}$  21,4  $\mu\text{M}$ ), MDA-231 ( $\text{IC}_{50}$  11,6  $\mu\text{M}$ ) i QGY7703 ( $\text{IC}_{50}$  28,1  $\mu\text{M}$ ), dok je dizidavaron A pokazao umereno inhibitorsko dejstvo prema HeLa tumorskim ćelijama ( $\text{IC}_{50}$  39,9  $\mu\text{M}$ ). Oba jedinjenja inhibitorno deluju na proteinski tirozinski fosfatazu 1B (dizidavaron A  $\text{IC}_{50}$  9,98  $\mu\text{M}$ ; dizidavaron D  $\text{IC}_{50}$  21,60  $\mu\text{M}$ ) sa oleinskom kiselinom kao pozitivnom kontrolom ( $\text{IC}_{50}$  1,90  $\mu\text{M}$ ).<sup>75</sup>

Schmalzbauer *et al.* su prvi uradili totalnu sintezu dizidavarona A i dalje ispitali biološku aktivnost.<sup>76</sup> Utvrđena je značajna aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama (MIK 0,57–28,09  $\mu\text{M}$ ), uključujući i meticilin rezistentni- i MDR *Staphylococcus aureus*. Jedinjenje je vrlo aktivno prema ćelijama humane mijeloidne leukemije HL-60 ( $\text{GI}_{50}$  4,68  $\mu\text{M}$ ) i humanog hepatocelularnog raka HepG2 ( $\text{GI}_{50}$  13,11  $\mu\text{M}$ ).<sup>76</sup>

**Dizideanoni.** Iz istog sundera su izolovani i dizideanoni A–C (slika 9).



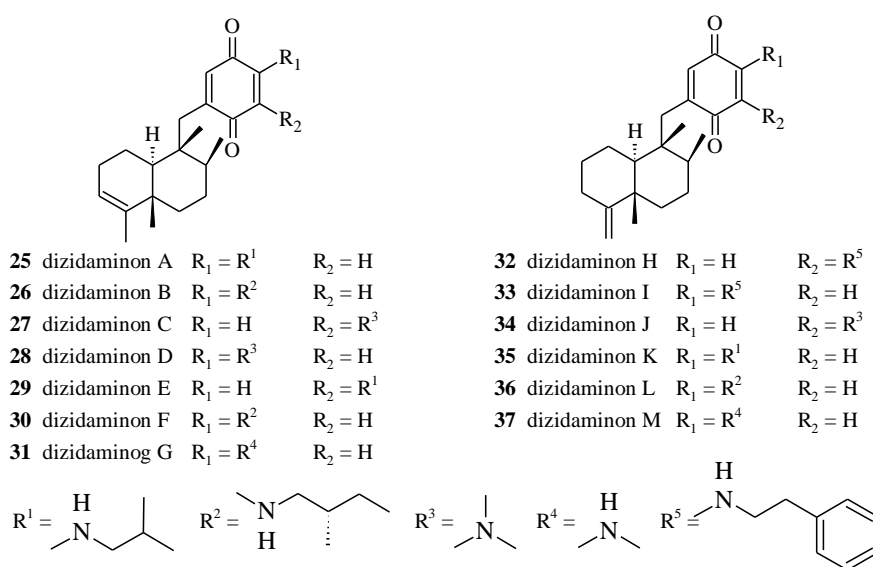
Slika 9. Dizideanoni A–C

Pored seskviterpenskog i hinonskog dela, dizideanoni A i B sadrže dodatni šestočlani prsten, dok su u slučaju dizideanona C prethodno pomenuta jezgra povezana petočlanim prstenom. Dizideanon B je ispitan prema HeLa ( $\text{IC}_{50}$  7,1  $\mu\text{M}$ ) i HepG2 ( $\text{IC}_{50}$



9,4  $\mu\text{M}$ ) ćelijskim linijama sa 5-fluorouracilom kao pozitivnom kontrolom ( $\text{IC}_{50}$  2,3 i 7,6  $\mu\text{M}$ , redom). Za razliku od dizidavarona A koji je pokazao antibakterijsku aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama,<sup>76</sup> dizideanoni nisu pokazali antibakterijsko dejstvo prema *S. aureus* i *Bacillus subtilis*, kao ni antifungalno prema *Candida albicans*, *Rhodothece glutinis* i *Aspergillus niger*.<sup>77</sup>

**Dizidaminoni.** Iz sundera *Dysidea fragilis* (Južno kinesko more) izolovana je paleta dizidaminona A–M (**25–37**) (slika 10) i već poznatih jedinjenja.<sup>78</sup>



Slika 10. Dizidaminoni A–M

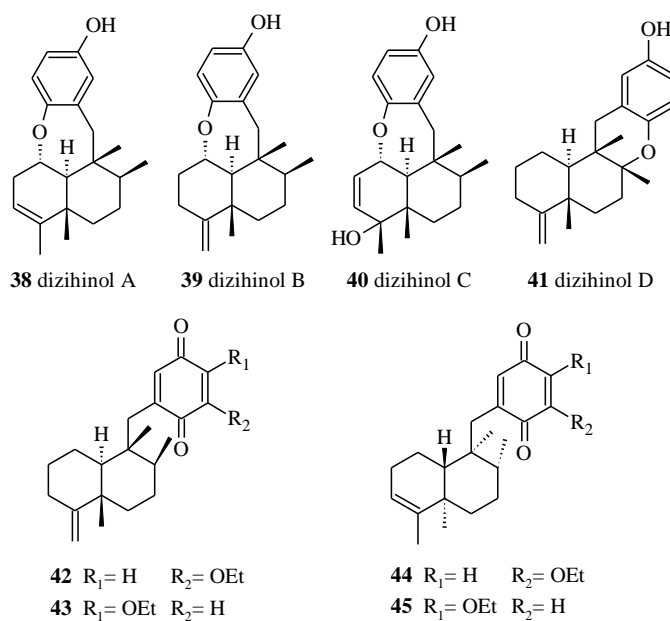
Sva jedinjenja su testirana na ćelije mišjeg melanoma B16F10, humanog mijeloma NCI-H929, hepatoma HepG2 i ovarijuma SK-OV-3. Ispitano je i inhibitorno dejstvo na NF- $\kappa\text{B}$  (tabela 1).

Tabela 1. Citotoksična aktivnost i inhibitorno dejstvo dizidaminona **25–37** prema tumorskim ćelijskim linijama (NCI-H929, HepG2, B16F10, SK-OV-3) i NF-κB

Jed.	IC <sub>50</sub> (μM)				
	NCI-H929	HepG2	B16F10	SK-OV-3	NF-κB
<b>25</b>	15,6	21,8	65,7	73,4	>10
<b>26</b>	36,4	68,9	52,9	31,8	>10
<b>27</b>	0,57	0,45	8,71	5,25	0,22
<b>28</b>	5,78	15,4	32,7	18,5	>10
<b>29</b>	1,13	0,94	9,52	4,54	0,27
<b>30</b>	7,19	8,95	5,39	5,40	1,92
<b>31</b>	16,3	18,4	35,6	27,8	>10
<b>32</b>	0,71	0,62	2,45	9,65	0,23
<b>33</b>	1,39	0,88	6,28	6,22	3,14
<b>34</b>	0,87	0,45	1,43	2,89	0,11
<b>35</b>	4,58	7,86	8,14	9,41	8,62
<b>36</b>	5,18	5,81	7,56	8,41	>10
<b>37</b>	9,21	9,68	4,92	5,83	>10
5-fluorouracil	0,39	7,64	1,23	1,72	-
rokaglamid	-	-	-	-	0,12

Dobijeni rezultati ukazuju na to da je amino grupa (R<sub>1</sub>) na hinonskom jezgru ključni element strukture jedinjenja koja su pokazala izraženu citotoksičnu aktivnost, ali da aktivnost opada sa porastom dužine amino lanca. Potvrđena je i SAR analiza kojom je pretpostavljeno da seskviterpenski hinoni sa egzo-olefinom ( $\Delta^{4,11}$ ) pokazuju jaču citotoksičnost od onih sa endo-olefinom ( $\Delta^{3,4}$ );<sup>79</sup> jedinjenja **25** i **26** su pokazala slabiju aktivnost od **35** i **36**. Nekolicina ispitanih jedinjenja je pokazala izuzetnu inhibitornu aktivnost prema transkripcionom regulatoru NF-κB.<sup>78</sup>

**Dizihinoli.** Daljom analizom ekstrakata sušidera *Dysidea avara*, izolovana je serija hinola, dizihinola A–D (**38–41**), i seskviterpenskih hinona, etoksi derivata neoavarona (**42, 43**) i enantiomera avarona (5*R*, 8*R*, 9*S*, 10*R*) (**44, 45**) (slika 11).



Slika 11. Strukture jedinjenja **38–45** izolovanih iz morskog sundera *D. Avara*

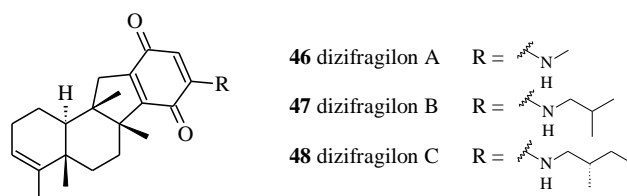
Citotoksična aktivnost i inhibitorno dejstvo prikazani su u *Tabeli 2*.

Tabela 2. Inhibitorno dejstvo i citotoksična aktivnost jedinjenja **38–45** prema NCI-H929 i NF-κB

Jed.	IC <sub>50</sub> (μM)	
	NCI-H929	NF-κB
<b>38</b>	17,4 ± 0,1	>10
<b>39</b>	25,3 ± 0,4	>10
<b>40</b>	14,9 ± 0,3	>10
<b>41</b>	2,81 ± 0,01	0,81 ± 0,01
<b>42</b>	5,45 ± 0,07	>10
<b>43</b>	2,77 ± 0,03	>10
<b>44</b>	21,4 ± 0,2	>10
<b>45</b>	12,8 ± 0,2	>10
avarol	3,16 ± 0,01	>10
rokaglamid	3,94 ± 0,02	2,67 ± 0,04

Jedinjenja **41–43** i avarol su pokazali citotoksično dejstvo prema tumorskoj ćelijskoj liniji NCI-H929. Međutim, samo jedinjenje **41** je pokazalo značajnu inhibitornu aktivnost prema NF-κB, što sugeriše da etarski most između C-8 i C-17 može biti aktivno mesto za dizihinole.<sup>80</sup>

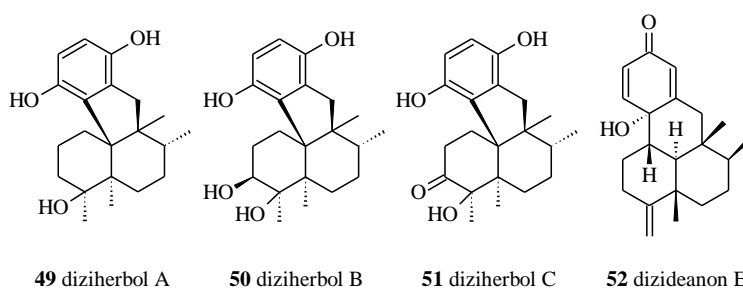
**Dizifragiloni.** Daljim analizom ekstrakata *D. fragilis*, Jiao *et al.* su izolovali tri neobična seskviterpenska aminohinona čija je struktura zasnovana na premeštenom avaronskom skeletu, dizifragilone A–C (**46–48**) (slika 12).<sup>81</sup>



Slika 12. Dizifragiloni A–C

Jedinjenja su pokazala jaku antiinflamatornu aktivnost ( $\text{IC}_{50}$  6,61–17,22  $\mu\text{M}$ ) koja potiče od inhibicije stvaranja NO u lipopolisaharidima stimulisanim mišjim makrofagima RAW 264.7, u poređenju sa pozitivnom kontrolom hidrokortizonom ( $\text{IC}_{50}$  45,72  $\mu\text{M}$ ).<sup>81</sup>

**Diziherboli.** Iz morskog sundera *Dysidea* sp. (Paracelska ostrva, Južno kinesko more) izolovana je grupa tetracikličnih jedinjenja, diziherboli A–C (**49–51**) i dizideanon E (**52**) (slika 13).<sup>82</sup>



Slika 13. Diziherboli A–C i disideanon E

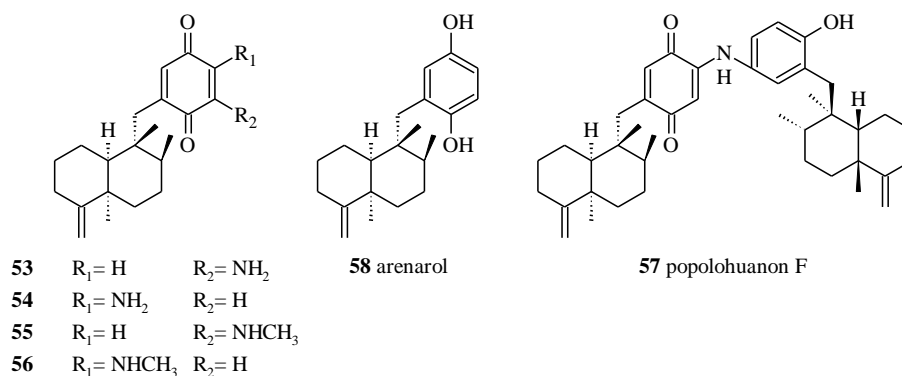
Aktivnost jedinjenja je ispitana prema ćelijskoj liniji humanog mijeloma NCI-H929 i prema transkripcionom regulatoru NF- $\kappa$ B (tabela 3).

Tabela 3. Inhibitorno dejstvo i citotoksična aktivnost jedinjenja 49–52 prema NF-κB i NCI-H929

Jed.	IC <sub>50</sub> (μM)	
	NF-κB	NCI-H929
<b>49</b>	0,49 ± 0,03	0,58 ± 0,02
<b>50</b>	5,9 ± 0,6	15 ± 1
<b>51</b>	6,4 ± 0,4	12 ± 1
<b>52</b>	>10	25 ± 2
avarol	>10	3,32 ± 0,1
rokaglamid	2,6 ± 0,1	3,9 ± 0,1

Diziherbol A je pokazao izuzetno dejstvo u poređenju sa drugim jedinjenjima i kontrolnim jedinjenjima avarolom i rokaglamidom. Rezultat ukazuje da dodatak kiseonične grupe u položaju C-3 negativno utiče na aktivnost diziherbola, te da premeštanje i oksidacija seskviterpenskog dela značajno utiču na aktivnost seskviterpenskih hidrohina.<sup>82</sup>

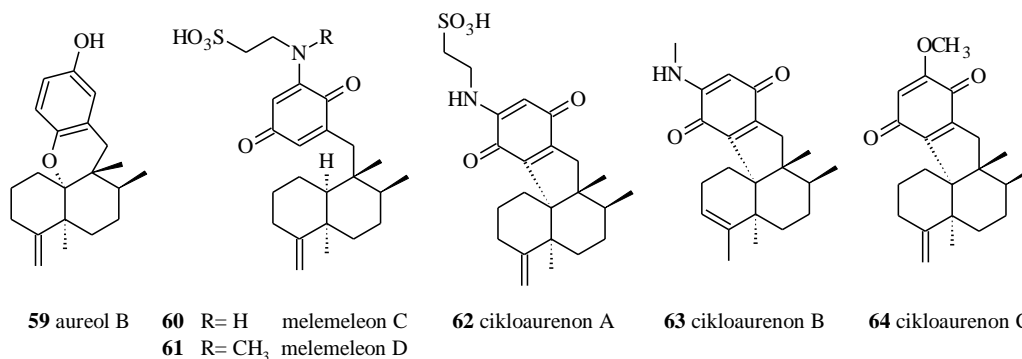
**Derivati arenarona.** Utkina *et al.* su izolovali nove seskviterpenske hinone derivate arenarona (**53–57**), iz suđera *Dysidea* sp. (Australija) (slika 14).<sup>83</sup>



Slika 14. Derivati arenarona

Amino- i metilamino- derivati arenarona (**53–56**) nisu pokazali antioksidativno dejstvo. Popolohuanon F (**57**), dimer 19-aminoarenarona (**54**) i arenarola (**58**), pokazao je umeren potencijal kao hvatač slobodnih radikala (IC<sub>50</sub> 35 μM), dok je za sam arenarol zabeležena vrednost IC<sub>50</sub> jednaka analogu vitamina E, troloksu (IC<sub>50</sub> 16 μM). Nova jedinjenja su neaktivna prema mikroorganizmima *S. aureus*, *C. albicans* i *E. coli*, kao i ćelijama mišjeg Ehrlich raka.<sup>83</sup>

**Ostali terpenoidi.** Iz sundera *Dysidea* sp. (Čuk, Savezne države Mikronezije) izolovano je šest novih terpenoida (slika 15).



Slika 15. Terpenoidi izolovani iz sundera *Dysidea* sp.

Aureol B je ciklični etar arenarola, dok melemeleon C i D na hinonskom delu poseduju taurinske supstituente. Cikloaurenoni A–C sadrže petociklični prsten nastao direktnom C–C vezom između hinona i seskviterpenskog jezgra.<sup>84</sup>

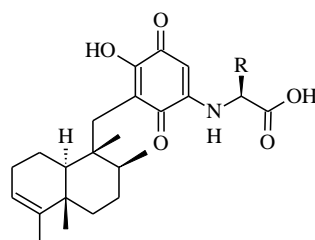
## 2.5. Biološki aktivna jedinjenja sa aminokiselinskim ostacima

### 2.5.1. Hinonska jedinjenja sa aminokiselinama u strukturi

Tokom istraživanja sekundarnih metabolita iz morskih organizama, izolovana je značajna grupa seskviterpenskih hinona, nakidžihinona, iz ekstrakta morskog sundera sa područja ostrva Okinava, familija Spongiidae.

Nakidžihinoni A (**65**) i B (**66**) (slika 16) su prvi seskviterpenski hinoni izolovani iz prirodnog materijala koji u svojoj strukturi poseduju aminokiselinske ostatke (glicin i valin, redom) na hinonskom prstenu. Izolovana jedinjenja su pokazala umerenu *in vitro* antitumorsku aktivnost prema ćelijama mišjeg limfoma L1210 i ćelijama humanog epidermoidnog karcinoma KB. Oba jedinjenja imaju zabeleženo antifungalno dejstvo prema sojevima *Candida albicans* i *Aspergillus niger*. Utvrđeno je i da nakidžihinon A inhibira dejstvo tirozinske protein-kinaze (IC<sub>50</sub> 20 µg/mL).<sup>85</sup>

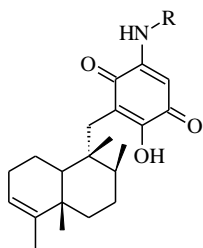
Daljom obradom ekstrakta sundera, izolovani su nakidžihinoni C (**67**) i D (**68**) (slika 16) koji na hinonskom delu imaju serinski, odnosno treoninski supstituent. Citotoksičnost jedinjenja je ispitana *in vitro* prema pomenutim ćelijama L1210 i KB. Daljim ispitivanjem bioloških delovanja izolovanih komponenti, utvrđeno je da pokazuju aktivnost prema c-erbB-2 kinazi (IC<sub>50</sub> 26 μM i 29 μM, redom), zatim EGF receptor-kinazi (IC<sub>50</sub> 170 μM i >400 μM, redom), kao i protein-kinazi C (IC<sub>50</sub> 23 μM i 220 μM, redom).<sup>86</sup>



<b>65</b>	Nakidžihinon A	R = H	<b>67</b>	Nakidžihinon C	R = CH <sub>2</sub> OH
<b>66</b>	Nakidžihinon B	R = CHMe <sub>2</sub>	<b>68</b>	Nakidžihinon D	R = CH(OH)Me

Slika 16. Nakidžihinoni A–D

Za razliku od prethodnih jedinjenja, nakidžihinoni G–I (**69–71**) (slika 17) kao supstituente na hinonskom delu poseduju amine izvedene iz aminokiselina (histidina, arginina, metionina redom).

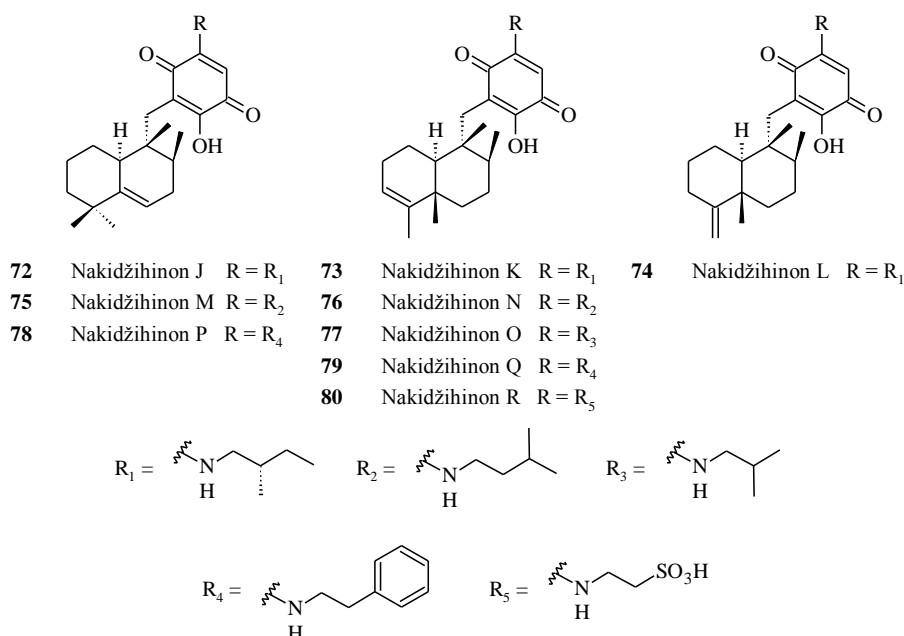


<b>69</b>	nakidžihinon G	R =
<b>70</b>	nakidžihinon H	R =
<b>71</b>	nakidžihinon I	R =

Slika 17. Nakidžihinoni G–I

Jedinjenja su pokazala umerenu aktivnost prema ćelijama mišjih limfoma P388 i L1210, kao i ćelijama KB *in vitro*. Evidentirana je i njihova inhibitorna aktivnost prema HER2 kinazi. Nakidžihinon H je pokazao aktivnost prema bakterijskom soju *Micrococcus luteus* (MIK 16,70  $\mu\text{g/mL}$ ), te antifungalnu aktivnost prema *Cryptococcus neoformans* (MIK 8,35  $\mu\text{g/mL}$ ), *Candida albicans* (MIK 8,35  $\mu\text{g/mL}$ ) i *Aspergillus niger* (MIK 16,70  $\mu\text{g/mL}$ ).<sup>87</sup>

Nakidžihinoni J–R (**72–80**) u svojoj strukturi poseduju 2-metilbutilamin (**72–74**) koji potiče od L-izoleucina, izopentilamin (**75, 76**) izveden od L-leucina, izobutilamin (**77**) koji je ostatak L-valina, fenetilamin (**78, 79**) ostatak fenilalanina, i taurin (**80**) (slika 18).



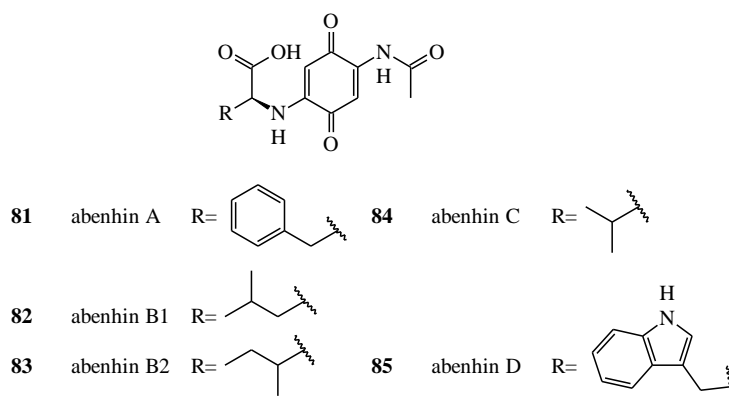
Slika 18. Nakidžihinoni J–R

Nakidžihinoni P i R pokazuju inhibitornu aktivnost prema EGFR tirozin-kinazi (procenat inhibicije 76% i >99%, redom), dok nakidžihinoni N, O i R pokazuju dejstvo prema HER2 tirozin-kinazi (procenat inhibicije 66%, 59% i 52%, redom).<sup>88</sup>

Schulz *et al.* su izolovali grupu sekundarnih metabolita iz bakterija soja *Streptomyces* DB634 (pustinja Atakama, Čile).<sup>89</sup> Abenhini A–D (**81–85**) su jednostavni



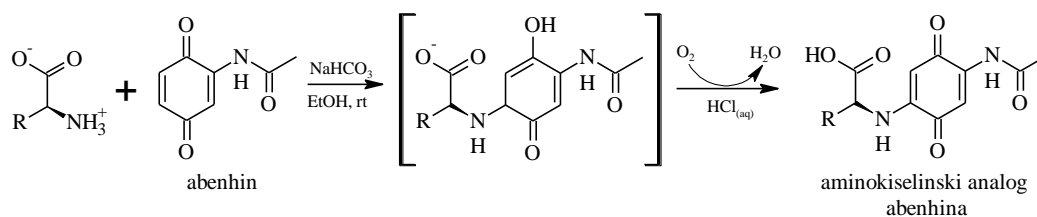
aminobenzohinoni supstituisani različitim nemodifikovanim aminokiselinama (slika 19).



Slika 19. Abenhini A–D

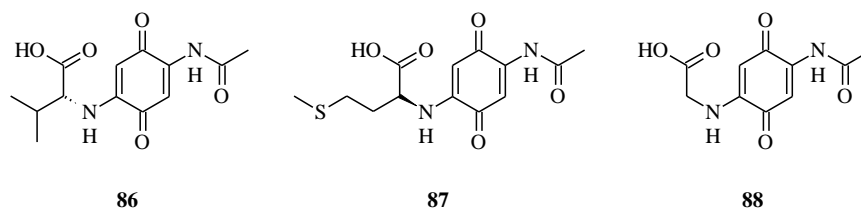
Abenhini A i D, jedinjenja sa aromatičnim bočnim nizom, su pokazali umerenu inhibitory aktivnost prema fosfodiesterazama tipa 4 ( $IC_{50}$  4,6 i 4,2  $\mu$ M, redom)<sup>90</sup>, dok su  $IC_{50}$  vrednosti ostalih jedinjenja bile znatno niže. Slaba aktivnost je zabeležena prema bakteriji *B. subtilis*, dok su jedinjenja potpuno neaktivna prema *Staphylococcus lentus*, *Xanthomonas campestris* i *C. albicans*. Antiproliferativna aktivnost abenhina prema mišjim fibroblastima (NIH-3T3) je takođe slaba ( $IC_{50}$  19,3–57,8  $\mu$ M). Abenhin A je pokazao slabu antifungalnu aktivnost prema dermatofitama *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Microsporum canis*.

S obzirom na malu količinu jedinjenja izolovanih iz prirodnih resursa, Nain-Perez *et al.* su uradili prvu totalnu sintezu abenhina A–D.<sup>91</sup> Autori su razvili kratak i efikasan sintetički put (shema 12) koji je korišćen i za sintezu dodatnih aminokiselinskih analoga (86–88) (slika 20).



Shema 12. Dobijanje aminokiselinskih abenhina

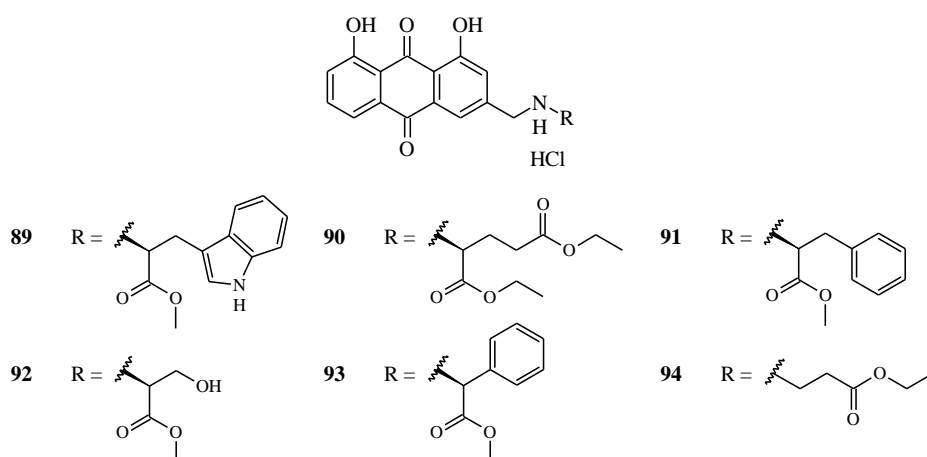
Autori su ispitali toksično dejstvo svih jedinjenja prema cijanobakterijskom model soju *Synechococcus elongatus* PCC6301. Rezultati ukazuju da dva (**87**, **88**) od tri aminokiselinska analoga pokazuju značajno jače inhibitorno dejstvo nego prirodni abenhini.



Slika 20. Aminokiselinski analozi abenhina

Prirodni abenhini i sintetisani aminokiselinski analozi su ispitani prema panelu humanih ćelijskih linija. Abenhini A–D su pokazali slabo citotoksično dejstvo ( $EC_{50} > 30 \mu\text{M}$ ) prema svim ćelijskim linijama. Abenhinski derivat sa D-valinom u bočnom nizu, izomer abenhina C, pokazao je značajno pojačanje aktivnosti ( $EC_{50} 5,7\text{--}12,7 \mu\text{M}$ ) što ukazuje na esencijalnu ulogu D-konfiguracije aminokiselina na citotoksičnu aktivnost ove grupe jedinjenja. Derivat abenhina sa L-metioninom je pokazao jače dejstvo prema testiranim ćelijama od izolovanih jedinjenja, što dokazuje da je, pored optičke izomerije aminokiselina, bitna i struktura bočnog niza aminokiselina.<sup>92</sup>

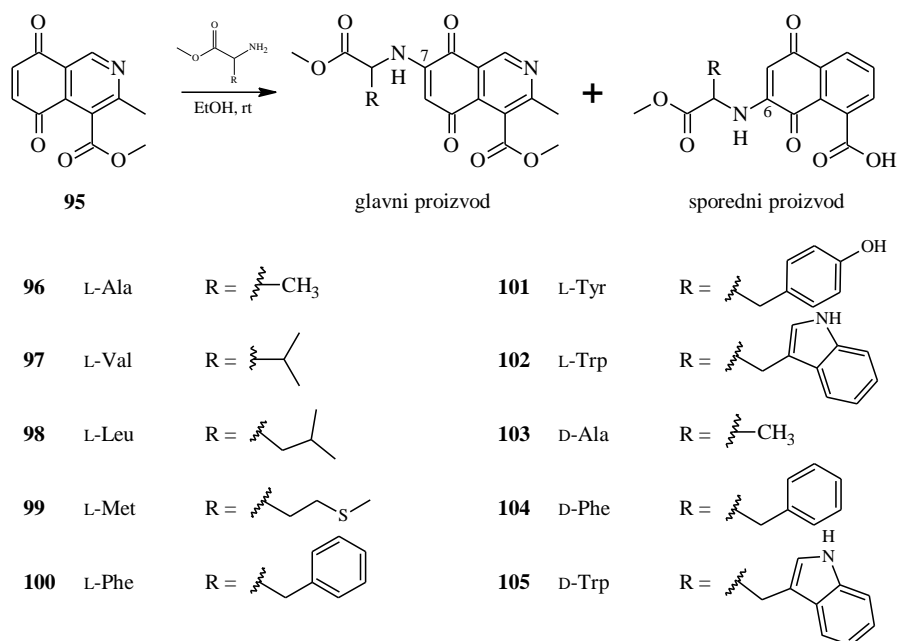
Thimmegowda *et al.* su sintetisali grupu aminokiselinskih derivata prirodnog proizvoda aloe-emodina (**89–94**), hidroksiantrahinona izolovanog iz eskudata biljke *Aloe vera* (slika 21).<sup>93</sup>



Slika 21. Sintetisani aminokiselinski derivati aloe emodina

Dobijenim estarskim aminokiselinskim derivatima je ispitana antitumorska aktivnost prema ćelijskim linijama humanih raka jetre (HepG2), pluća (NCI-H460), prostate (PC3) i grlića materice (HeLa). Metil-estar L-serinskog derivata (**92**) i etil-estar  $\beta$ -alaninskog derivata aloe-emodina (**94**) su pokazali jaču antitumorsku aktivnost prema HepG2 ( $IC_{50}$  4,789 i 11,069  $\mu$ M, redom) i NCI-H460 ( $IC_{50}$  19,054 i 18,476, redom) u poređenju sa jačinom dejstva polaznog jedinjenja prema istim ćelijama ( $IC_{50}$  26,168 i 33,721  $\mu$ M, redom). Isti aminokiselinski derivati su prema ćelijskim linijama PC3 i HeLa pokazali približno istu jačinu kao osnovni hinon.<sup>93</sup>

Valderrama *et al.* su sintetisali seriju aminokiselinskih derivata izohinolinhinona u reakciji 3-metil-4-(metoksikarbonil)izohinolin-5,8-hinona (**95**) i metil-estara različitih L- i D- $\alpha$ -aminokiselina (*shema 13*).<sup>94</sup>



Shema 13. Reakcija izohinolinhinona sa metil estrima aminokiselina

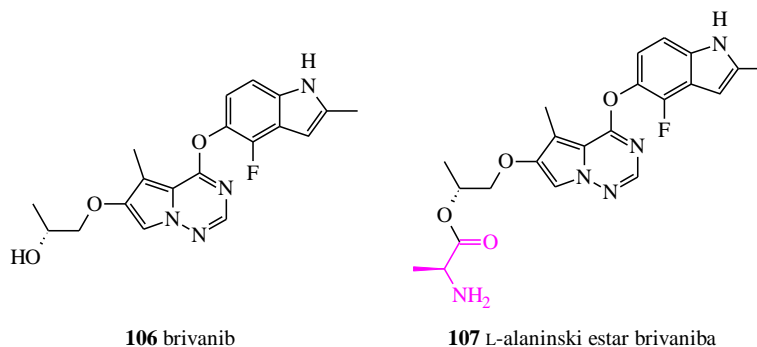
Autori su ispitali *in vitro* citotoksičnu aktivnost sintetisanih jedinjenja prema zdravim humanim fibroblastima pluća (MRC-5) i ćelijskim linijama humanog raka želuca (ASG), pluća (SK-MES-1) i bešike (J82). Zabeležen je umeren do visok nivo citotoksičnosti svih derivata ( $IC_{50}$  0,58–15,43  $\mu$ M), pri čemu su L-valinski (**97**) i L-triprofanski (**102**) derivati hinona supstituisani u položaju C-6 najaktivniji. Derivati koji u svojoj strukturi poseduju L- i D-alanin (**96** i **103**), odnosno L- i D-fenilalanin (**100** i **104**) beleže najbolju selektivnost. Iz prethodno navedenih rezultata se nameće zaključak da veličina aminokiseline nije bitna za mehanizam dejstva. Za enantiomerne parove alaninskih derivata su dobijeni različiti rezultati citotoksične aktivnosti i selektivnosti, ukazujući na to da je hiralno prepoznavanje uključeno u mehanizam antitumorskog dejstva. Kod fenilalaninskih (**100**, **104**) i triptofanskih (**102**, **105**) derivata nije toliko izražen efekat enantiomerije. Uticaj regioselektivnost na nivo citotoksičnosti je izražen kod svih derivata gde su iz reakcije uspešno izolovana oba proizvoda. Nukleofilna adicija aminokiseline na položaj C-6 hinonskog jezgra uvek ima pozitivniji uticaj na aktivnost u poređenju sa derivatom kod kog je ista aminokiselina adirana na položaj C-7.<sup>94</sup>

### 2.5.2. Aminokiseline u sastavu prolekova

Pregledom literature zapažen je značajan broj radova u kojima se aminokiseline pominju u svojstvu jedinica koje učestvuju u građenju prolekova biološki aktivnih jedinjenja. Njihova uloga se zasniva na povećanju rastvorljivosti jedinjenja, olakšanom transportu u ciljne ćelije i povećanju stabilnosti.

**Povećanje rastvorljivosti u vodi.** Brivanib (**106**), inhibitor VEGFR-2 i FGFR-1,<sup>95</sup> koristi se u terapiji hepatocelularnog karcinoma jetre i kolorektalnog karcinoma (slika 22).<sup>96</sup> Niska rastvorljivost jedinjenja u vodi dovodi do brze hidrolize u plazmi, čime se smanjuje koncentracija jedinjenja posle oralne primene.<sup>97</sup>

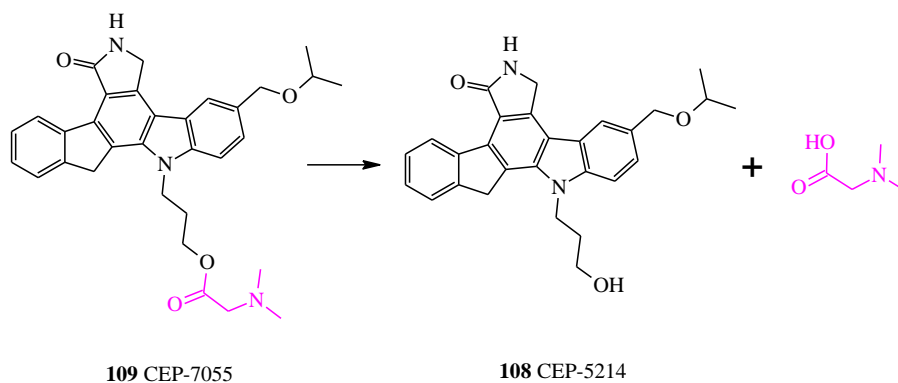
Kako bi se poboljšala rastvorljivost u vodi, Cai *et al.* su sintetisali seriju aminokiselinskih prolekova brivaniba i utvrdili da je L-alanil estar brivaniba (**107**) jedinjenje sa izraženom rastvorljivošću (73 mg/mL na pH 5,8) u poređenju sa brivanibom (<1 µg/mL na pH 6,5).<sup>98</sup> U eksperimentima sa životinjama, dokazano je da pomenuti prolek povećava oralnu biorasploživost brivaniba (55–97%).<sup>99</sup> Sintetisani prolek se tokom apsorpcije brzo i potpuno prevodi u brivanib dejstvom različitih esteraza što poboljšava oralnu upotrebu leka.<sup>100</sup>



Slika 22. Brivanib i njegov alaninski prolek

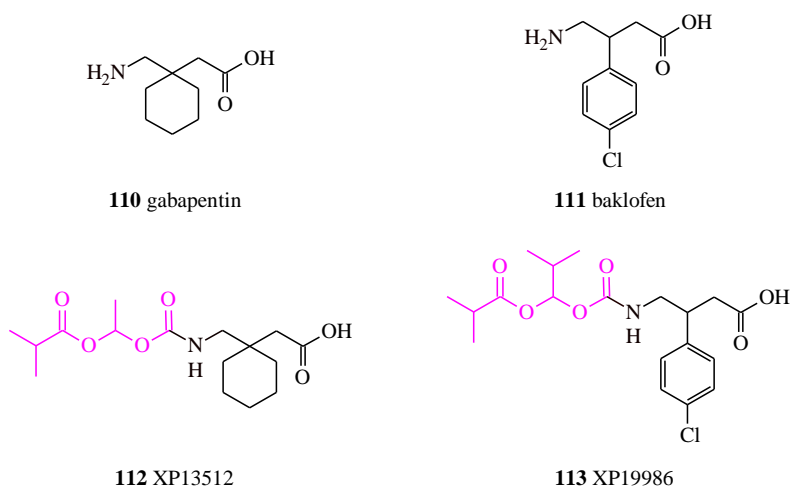
Jedinjenje CEP-5214 (**108**) je inhibitor VEGF-R tirozin-kinaze sa antitumorskom aktivnošću. Slaba rastvorljivost u vodi (< 10 µg/mL) i niska oralna biorasploživost agensa je dovela do sinteze *N,N*-dimetilglicinskog estra jedinjenja, proleka CEP-7055 (**109**).<sup>101</sup> Rastvorljivost u vodi sintetisanog proleka je poboljšana četiri hiljade puta (40 mg/mL) u poređenju sa CEP-5214, dok je oralna biorasploživost

povećana 15–20%. Prolek se hidrolizuje do aktivne komponente tokom apsorpcije u enterocitima dejstvom aminopeptidaza (*shema 14*). CEP-7055 je hemioterapeutski agens koji se koristi u lečenju glioblastoma i raka debelog creva.<sup>101(a), 102</sup>



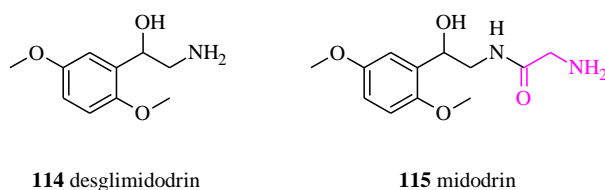
*Shema 14.* Hidroliza CEP-7055 do CEP-5214

**Korišćenje intestinalnih transportera za oralnu upotrebu.** Gabapentin (**110**) i baklofen (**111**) (*slika 23*), strukturni analozi GABA, koriste se u lečenju različitih neuroloških bolesti. Jedinjenja se apsorbuju u tankom crevu preko L-aminokiselinskog transportera ograničenog kapaciteta. U cilju rešavanja farmakokinetičkih ograničenja, sintetisani su prolekovi XP13512 (**112**) i XP19986 (**113**), redom, čiji se transport vrši preko transportera za monokarboksilne kiselina tipa 1 (MCT-1) i Na-zavisnih multivitaminskih transportera (SMVT).<sup>103</sup>



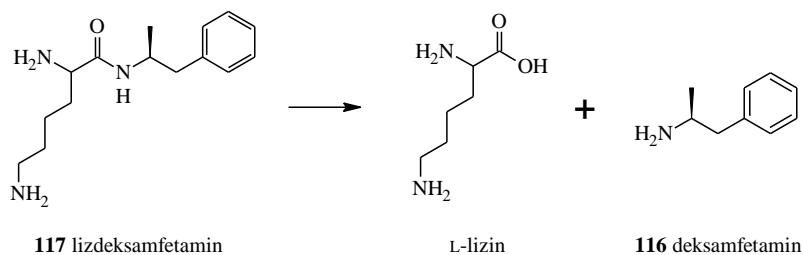
*Slika 23.* Gabapentin i baklofen, te njihovi prolekovi

Midodrin (ProAmatine<sup>®</sup>, Gutron<sup>®</sup>) (**115**) predstavlja glicinski prolek desglimidodrina (**114**), selektivnog agonista  $\alpha 1$ -receptora, i koristi se u tretmanu ortostatske hipotenzije (slika 24).<sup>104</sup> Apsorbuje se uglavnom preko PEPT1 transportera<sup>104</sup> i biokonvertuje uglavnom u jetri i sistemsnoj cirkulaciji dejstvom nepoznatih peptidaza.<sup>105</sup> Oralna bioraspodivnost midodrina (93%) je dvostruko veća od polaznog jedinjenja.<sup>105</sup>



Slika 24. Desglimidodrin i njegov glicinski prolek midodrin

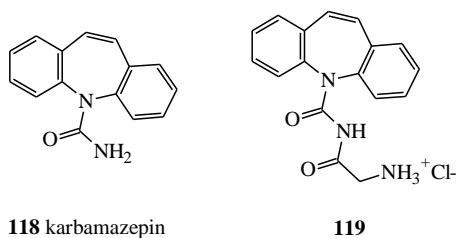
**Produženo oslobađanje.** Lizinski prolek deksamfetamina (**116**), lizdeksamfetamin (**117**) (Vyvanse<sup>®</sup>), koristi se u lečenju hiperkinetičkog poremećaja (ADHD).<sup>106</sup> Prolek se apsorbuje PEPT1 i aminokiselinskim transporterima, dok u eritrocitima dolazi do oslobađanja aktivne komponente (shema 15).<sup>107</sup>



Shema 15. Hidroliza lizdeksamfetamina

Dobrobit proleka leži u produženom oslobađanju i dejstvu, tako da je lek moguće unositi jedanput dnevno. Dodatno, lizdeksamfetamin ima manje neželjenih dejstava od ostalih amfetamina koji se unose inhalacijom ili intravenozno.<sup>108</sup>

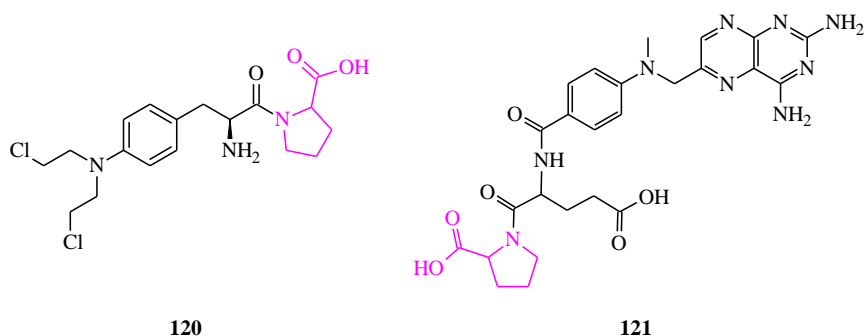
**Prolekovi za intravensku isporuku.** Antiepileptik karbamazepin (**118**) je relativno slabo rastvorljiv u vodi (0,12 mg/mL).



Slika 25. Karbamazepin i glicinski prolek karbamazepina

U cilju dobijanja komercijalno dostupne formule za intravenozni plasman, sintetisan je njegov aminokiselinski derivat. *N*-Glicinski prolek karbamazepina (**119**) (slika 25) je pokazao daleko veću rastvorljivost u neutralnoj formi (4,40 mg/mL), dok je na pH 4,0 zabeležena još značajnija vrednost (50 mg/mL). Hemenway *et al.* su dokazali da se kod pacova nakon intravenozne administracije proleka, aktivna supstanca brzo i potpuno oslobađa. Zbog hemijske stabilnosti proleka ( $t_{90\%} = 5,9$  dana na pH 4, +25 °C), liofilizovani proizvod se rastvara neposredno pred intravenozni plasman.<sup>109</sup>

**Mete za aminokiselinske prolekovе.** Kod nekih tumora je uočena izrazitija aktivnost enzima prolidaze u poređenju sa normalnim tkivima, što je dovelo do sinteze prolinskih prolekova za koje se očekivalo da bi bili aktivirani ovim enzimom. Prolinski prolekovi melfalana<sup>110</sup> (**120**) i metotreksata<sup>111</sup> (**121**) su sintetisani kao supstrati za specifične citosolne peptidaze, prolidaze, kako bi se prevazišla rezistentnost mnogih ćelijskih linija raka na ove lekove (slika 26).<sup>112</sup>



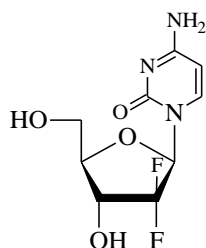
Slika 26. Prolinski prolekovi melfalana i metotreksata

Konkretno, oba proleka su pokazala jaču citotoksičnost od polaznih jedinjenja prema ćelijskoj liniji raka dojke MDA-MB-231. Smatra se da su za to odgovorna dva



mehanizma, činjenica da se prolinski prolekovi efikasnije transportuju u ćelije raka i da povišeno dejstvo prolinaza dovodi do efikasnijeg oslobađanja leka u ćeliji raka.

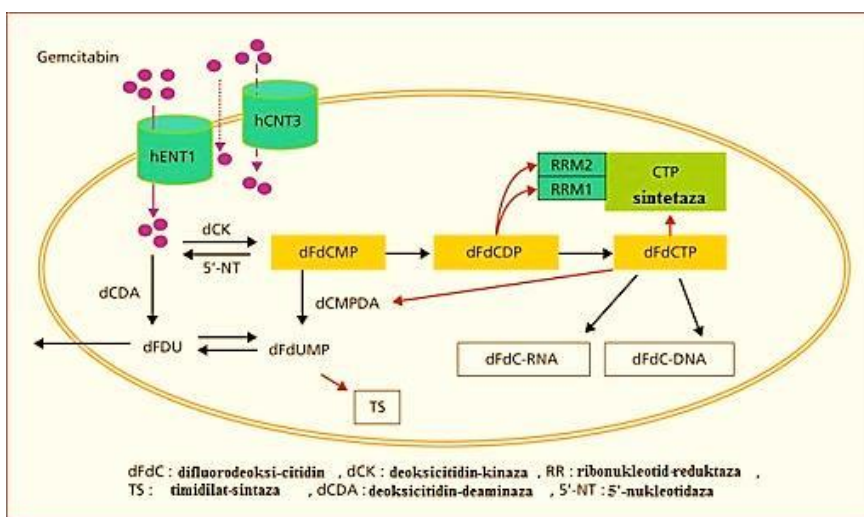
**Povećanje metaboličke stabilnosti leka.** Gemcitabin (**122**) (2',2'-difluor-2'-deoksiuridin, Gemzar<sup>®</sup>) (slika 27) je nukleozidni citotoksični agens koji se koristi u lečenju širokog spektra raka (pluća<sup>113</sup>, dojke<sup>114</sup>, jajnika<sup>115</sup>, bešike<sup>116</sup>, glioblastoma<sup>117</sup>), dok je standard za lečenje raka pankreasa (odobren od FDA 1997. god).<sup>118</sup>



122 gemcitabin

Slika 27. Struktura gemcitabina

Jedan od glavnih problema u terapiji raka jeste činjenica da tumori postanu rezistentni na lek tokom vremena. Gemcitabin se transportuje u ćelije preko različitih transportera, kao što hENT1 (slika 28).

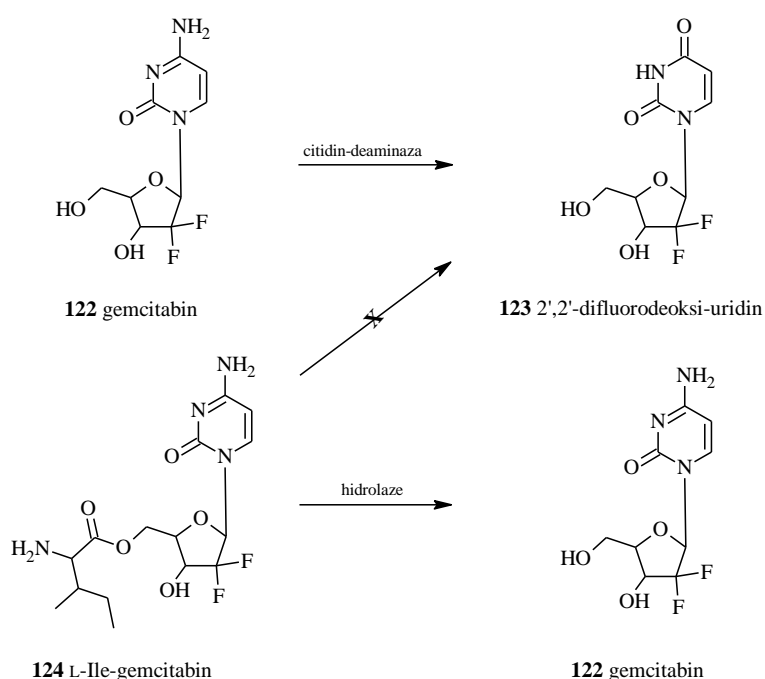


Slika 28. Gemcitabin u ćeliji (izvor: ref<sup>119</sup>)

Snižena ekspresija hENT1 je odgovorna za niži nivo aktivnosti gemcitabina jer je blokirana njegova usvojivost.<sup>120</sup> Nivo dezoksicitidin-deaminaze (dCK) je u korelaciji sa nivoom citotoksičnosti gemcitabina.<sup>121</sup> Kako se jedinjenje u krvi brzo deaminuje dejstvom citidin-deaminaze u neaktivni metabolit 2',2'-difluorodeoksi-uridin (**123**) koji se potom izlučuje preko urina (*shema 16*),<sup>122</sup> gemcitabin ima vrlo kratko poluvreme života.<sup>123</sup>

Aminokiselinski prolekovi gemcitabina su se pokazali kao rešenje za poboljšanje oralne usvojivosti preko oligopeptidnih transportera, kao i za povećanje metaboličke stabilnosti prema citidin-deaminazi.<sup>124</sup>

Song *et al.* su sintetisali seriju aminokiselinskih prolekova gemcitabina.<sup>124(a)</sup> Prolekovi su pokazali visok afinitet prema PEPT1 transporterima u poređenju sa polaznim jedinjenjem. Ipak je samo za 5'-L-valinske, 5'-L-izoleucinske (**124**) i 5'-L-fenilalaninske estre gemcitabina zabeležena povećana usvojivost u HeLa/hPEPT1 ćelijama, u poređenju sa kontrolnim HeLa ćelijama.



*Shema 16.* Dejstvo citidin-deaminaze na gemcitabin i hidroliza proleka gemcitabina

### 3. NAŠI RADOVI

Borba protiv raka je jedan od glavnih ciljeva Svetske zdravstvene organizacije. S obzirom na dosadašnji broj obolelih i učestalost bolesti, te nove mehanizme koje tumorske ćelije razvijaju kako bi preživele, iznalaženje novih antitumorskih agenasa i poboljšanje aktivnosti već postojećih je prioritet naučne zajednice širom sveta.

Morski sunđerri su bogat izvor jedinjenja koja poseduju citotoksičnu aktivnost. S obzirom na njihovu strukturnu raznolikost, vrlo su interesantni za dalje modifikacije. S druge strane, aminokiseline su se pokazale kao bitni faktori u rešavanju problema kao što su rastvorljivost i usvojivost jedinjenja.

Kao cilj ove doktorske disertacije je definisano, pre svega, dobijanje aminokiselinskih derivata osnovnog jedinjenja avarona, seskviterpenskog hinona izolovanog iz morskog sunđera *D. avara*, za koje se očekivalo da budu bolje rastvorljivi u vodi kako od avarona, tako i od aktivnih i selektivnih alkilamino-derivata.

Potom se očekivalo dobijanje iste serije aminokiselinskih derivata model hinona *tert*-butilhinona, kako bi se utvrdilo da li i na koji način pojednostavljenje strukture utiče na biološku aktivnost jedinjenja.

U nastavku je akcenat stavljen na ispitivanje biološke aktivnosti dobijenih aminokiselinskih derivata pomenutih hinona. Ispitivanje citotoksične aktivnosti je bio jedan od glavnih zadataka jer se očekivalo da će derivati avarona biti aktivniji od polaznog jedinjenja. Planirano je rasvetljavanje mehanizma citotoksičnog dejstva jedinjenja, odnosno sticanje uvida u ćelijski ciklus i određivanje ciljnih kaspaza.

Nakon toga je planirano i utvrđivanje antibiotske i antifungalne aktivnosti dobijenih aminokiselinskih derivata.

Potom je planirano ispitivanje interakcija derivata sa biomakromolekulima, odnosno njihova sposobnost da alkiluju ćelijske nukleofile, u ovom slučaju model-enzim lizozim, kao i načina na koji intereaguju sa DNA izolovanom iz timusa govečeta (CT-DNA) i plazmidom pUC19.

Na kraju je planirano utvrđivanje antioksidativne aktivnosti dobijenih aminokiselinskih derivata hinona.

### 3.1. Uvod

Morski sunderi pripadaju grupi najprimitivnijih višćelijskih organizama u životinjskom svetu. Njihov metabolizam je vrlo složen. To potvrđuje i značajan broj strukturno različitih jedinjenja koja su do sada izolovana. Poznato je da sunderi žive u simbiozi sa drugim organizmima, ali nivo njihove prisutnosti varira od vrste do vrste. Zahvaljući tome, teže je razjasniti biosintetski put nastajanja izolovanog jedinjenja, kao i njegovu funkciju u sistemu.

Sedamdesetih godina prošlog veka, iz morskog sundera *Dysidea avara* (Schmidt, 1862), klasa Demospongiae, red Dictyoceratida, familija Dysideidae, rod *Dysidea* (slika 29), izolovana je velika količina seskviterpenskog hidrohinona avarola, dok je njegov oksidovani oblik, seskviterpenski hinon avaron, izolovan u mnogo skromnijem procentu.<sup>125</sup>

S obzirom na to da je utvrđeno da *D. avara* sadrži relativno male količine simbiotskih bakterija, avarol se smatra za biosintetski metabolit samog morskog organizma,<sup>126</sup> dok avaron nastaje njegovom spontanom oksidacijom. Time je naglašena njihova uloga u sistemu odbrane sundera.

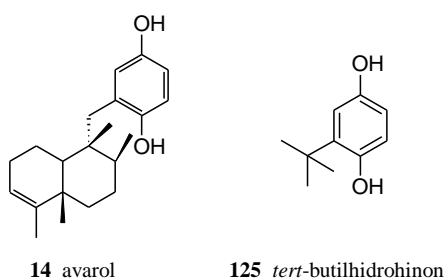


Slika 29. Morski sunder *Dysidea avara*. (izvor: ref <sup>127</sup>)

Avarol i avaron su pokazali vrlo široku paletu bioloških delovanja.<sup>128</sup> Antileukemijsko dejstvo je evidentirano *in vitro* i *in vivo*.<sup>129</sup> Rezultati *in vitro* testova na ćelije L5178y za avarol (ED<sub>50</sub> 0,93 μM) i avaron (ED<sub>50</sub> 0,62 μM) ukazuju na to da su ova jedinjenja aktivnija od terapijski primenjivanog agensa bleomicina. *In vivo* testovi su svrstali avaron u jako aktivne, a avarol u umereno aktivne citostatike, uporedive sa intenzitetom dejstva daunorubicina i metotreksata.

### 3.1.1. Dobijanje aminokiselinskih derivata hinona

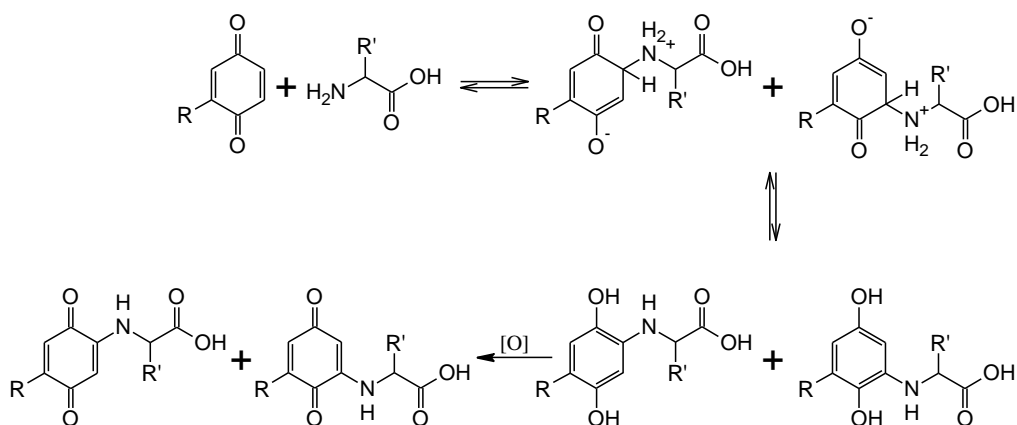
Kao polazna jedinjenja za dobijanje aminokiselinskih derivata korišćeni su avarol (**14**) i komercijalno dostupno model jedinjenje, *tert*-butilhidrohinon (**125**) (slika 30).



Slika 30. Avarol i *tert*-butilhidrohinon

*tert*-Butilhidrohinon je izabran kao model jedinjenje kako bi se ispitalo da li i u kojoj meri pojednostavljene strukture utiče na biološku aktivnost sintetisanih derivata. Struktura jedinjenja je značajno uprošćena u poređenju sa avarolom. Na mestu seskviterpenskog dela avarona se nalazi *tert*-butil grupa koja je hidrofobna i voluminozna, bez prisustva hiralnog centra što je čini veoma pogodnom.

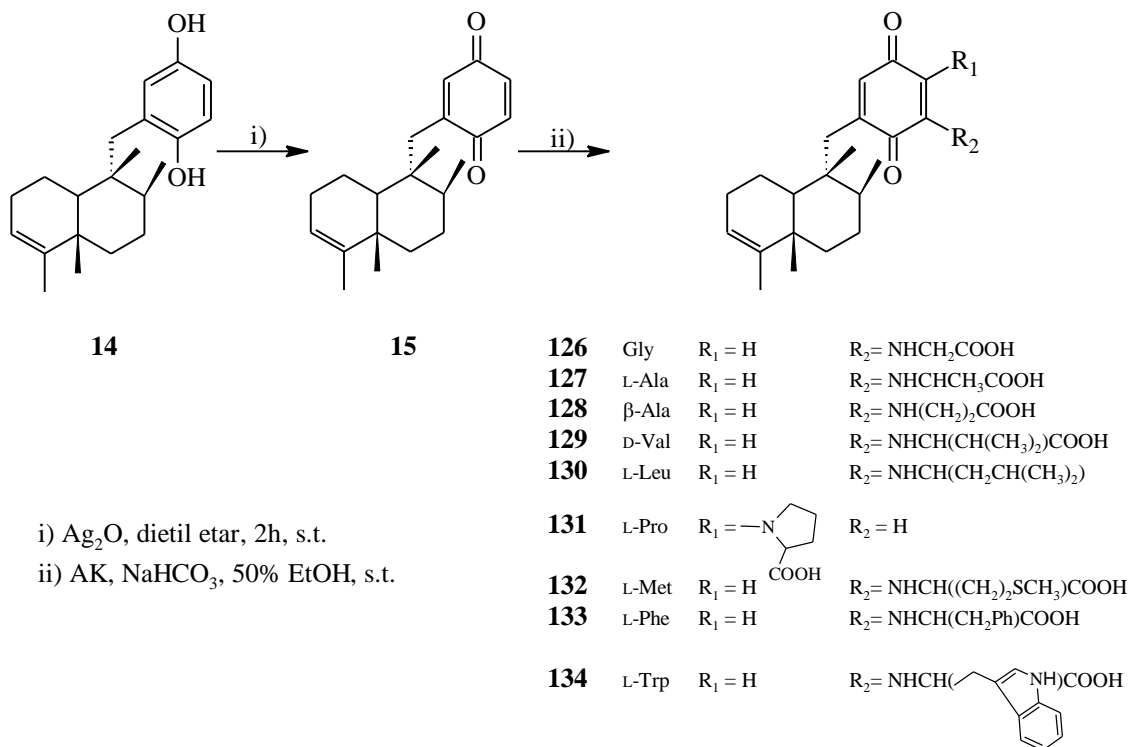
Hidrohinoni su oksidovani u odgovarajuće hinone u reakciji sa srebro-oksidom. Željeni derivati su dobijeni Michael-ovom adicijom aminokiselina na hinonsko jezgro osnovnih jedinjenja (shema 17).



Shema 17. Mehanizam nukleofilne adicije aminokiseline na hinon

### 3.1.2. Dobijanje i karakterizacija aminokiselinskih derivata avarona

Aminokiselinski derivati avarona su dobijeni reakcijom izabrane aminokiseline sa ovim hinonom (shema 18).



Shema 18. Dobijanje aminokiselinskih derivata avarona

*Opšti postupak za dobijanje aminokiselinskih derivata avarona:* U etanolni rastvor avarona lagano je dodavana odgovarajuća aminokiselina, prethodno rastvorena u zasićenom rastvoru natrijum-bikarbonata u cilju povećanja udela molekula sa slobodnom amino grupom. Nakon mešanja na sobnoj temperaturi u toku određenog vremena, potom obrade reakcione smese, te višestrukog hromatografskog prečišćavanja, izolovan je željeni aminokiselinski derivat.

U reakciji glicina sa avaronom, dobijen je čist proizvod **126** u obliku crvenih kristala, u prinosu od 43%.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja **126** pokazuje dublet na  $\delta_{\text{H}}$  6,33 ppm koji odgovara protonu sa C-6', sa konstantom kuplovanja od  $J = 1,6$  Hz, dok dublet na  $\delta_{\text{H}}$  5,32 ppm sa istom vrednošću konstante kuplovanja odgovara protonu sa C-4', što ukazuje na supstituciju u položaju 3'. Singlet na  $\delta_{\text{H}}$  3,62 ppm odgovara protonima sa  $\alpha$ -C atoma glicina. U spektru  $^{13}\text{C}$  NMR javlja se signal na  $\delta_{\text{C}}$  174,6 ppm koji potiče od C-atoma karboksilne grupe, dok se na  $\delta_{\text{C}}$  47,0 ppm beleži signal  $\alpha$ -C atoma aminokiseline. Struktura jedinjenja je potvrđena masenim spektrom visoke rezolucije koji pokazuje signal na  $m/z$  386,23150 (M+H)<sup>+</sup>.

L-Alaninski derivat avarona **127** je dobijen u obliku crvenih kristala, u reakciji polaznog jedinjenja sa L-alaninom u prinosu od 25%. U  $^1\text{H}$  NMR spektru derivata javljaju se dubleti na  $\delta_{\text{H}}$  6,24 i 5,27 ppm ( $J = 2,4$  Hz) što ukazuje na supstituciju u položaju 3'. Karakterističan kvartet na  $\delta_{\text{H}}$  3,71 ppm odgovara rezonanciji protona sa  $\alpha$ -C atoma, dok signal metil grupa iz bočnog niza odgovara dubletu na  $\delta_{\text{H}}$  1,33 ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar prisustvom signala na  $\delta_{\text{C}}$  178,7 ppm ukazuje na prisustvo ugljenika iz karboksilne grupe aminokiseline. Uočljivi su i signali na  $\delta_{\text{C}}$  54,1 i 17,3 ppm koji potiču od rezonancije  $\alpha$ -C atoma i metil grupe alanina, redom. Čistoća derivata **127** je potvrđena karakterističnim signalom koji je lociran na  $m/z$  400,24715 (M+H)<sup>+</sup> u masenom spektru.

Tretiranjem avarona  $\beta$ -alaninom formiran je derivat **128** u prinosu od 34%. Supstitucija hinonskog jezgra u položaju 3' potvrđena je prisustvom dubleta u  $^1\text{H}$  NMR spektru koji odgovaraju protonima sa C-6' i C-4' ( $\delta_{\text{H}}$  6,32 i 5,46 ppm, redom,  $J = 2,8$  Hz). U istom spektru, vidljivi su signali vodonika iz metilenskih grupa aminokiseline u obliku tripleta na  $\delta_{\text{H}}$  3,34 i 2,45 ppm, dok u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru signali na  $\delta_{\text{C}}$  40,8 i 36,7 ppm odgovaraju ugljenicima tih grupa. C-atomu iz aminokiselinske karboksilne grupe

odgovara signal na  $\delta_C$  179,5 ppm. Signal u masenom spektru potvrđuje masu jedinjenja,  $m/z$  400.24846 (M+H)<sup>+</sup>.

Nukleofilnom adicijom D-valina na hinonsko jezgro avarona, dobijen je derivat **129** u prinosu od 40%. U <sup>1</sup>H NMR spektru jedinjenja, pored dubleta na  $\delta_H$  6,33 i 5,42 ppm ( $J = 2,8$  Hz) koji pripadaju hinonskim protonima (supstitucija u položaju 3'), prisutan je multiplet na  $\delta_H$  2,19 ppm koji odgovara protonu sa račvastog C-atoma izopropil grupe valina, kao i dubleti na  $\delta_H$  1,07 i 0,99 ppm koji odgovaraju rezonanciji protona primarnih C-atoma pomenute grupe. Signal protona sa  $\alpha$ -C atoma ima oblik dubleta i javlja se na  $\delta_H$  3,60 ppm, dok signal na  $\delta_C$  64,7 ppm u <sup>13</sup>C NMR spektru potvrđuje postojanje  $\alpha$ -C atoma. <sup>13</sup>C NMR spektar pokazuje signal C-atoma iz karboksilatne grupe na  $\delta_C$  177,6 ppm, dok se C-atomi iz izopropil grupe bočnog niza pojavljuju na  $\delta_C$  32,4 ppm (račvasti C-atom), i  $\delta_C$  20,5 i 18,3 ppm (terminalni C-atomi). Čistoća i bruto formula jedinjenja su potvrđene signalom  $m/z$  428,27917 (M+H)<sup>+</sup> u masenom spektru.

L-Leucinski derivat avarona **130** je dobijen pri istim reakcionim uslovima kao i prethodni derivati. Dobijen je proizvod koji je izolovan u obliku crvenih kristala u prinosu od 30%. Dubleti u <sup>1</sup>H NMR spektru na 6,32 i 5,39 ppm ( $J = 2,8$  Hz) ukazuju na supstituciju u položaju 3'. Singleti na  $\delta_H$  0,93 i 0,96 ppm su karakteristični za protone terminalnih C-atoma izobutil grupe leucina, dok multiplet na  $\delta_H$  1,71 ppm odgovara rezonanciji protona sa preostala dva C-atoma grupe. U <sup>13</sup>C NMR spektru su uočljivi signali metil grupa leucina na  $\delta_C$  22,8 i 23,5 ppm, signal tercijarnog C-atoma izobutil grupe na  $\delta_C$  26,4 ppm, dok signali na  $\delta_C$  42,0 i 58,0 ppm odgovaraju ugljeniku metilenske grupe i  $\alpha$ -C atomu aminokiseline. Signal u masenom spektru ukazuje na korektnu bruto formulu jedinjenja,  $m/z$  442,29476 (M+H)<sup>+</sup>.

Nakon reakcije sa L-prolinom, dobijen je derivat **131** u obliku crvenoljubičastih kristala, u prinosu od 19%. U <sup>1</sup>H NMR spektru jedinjenja prisutni su singleti na  $\delta_H$  5,37 i 6,13 ppm koji potiču od hinonskih protona i ukazuju na supstituciju u položaju 4'. Protoni pirolidinskog prstena se javljaju kao multipleti. U <sup>13</sup>C NMR spektru prisutan je signal C-atoma iz karboksilne grupe prolina na  $\delta_C$  180,0 ppm, kao i signali C-atoma pirolidinskog prstena ( $\delta_C$  66,9, 33,0 i 30,7 ppm). Struktura proizvoda je potvrđena masenim spektrom koji pokazuje karakterističan signal na  $m/z$  426,26373 (M+H)<sup>+</sup>.



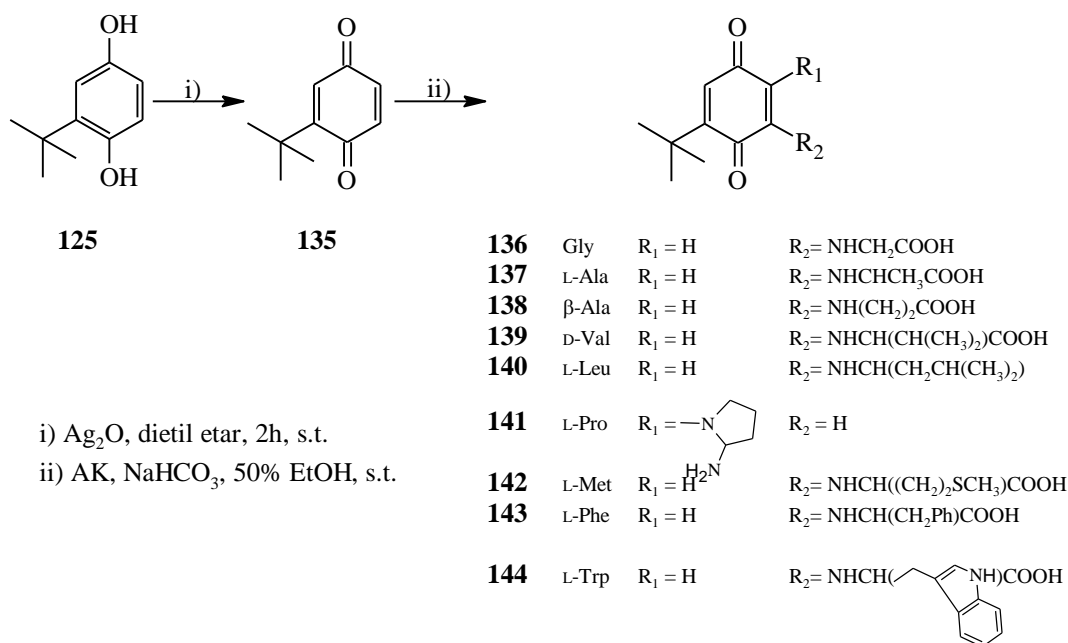
Nukleofilnom adicijom L-metionina na avaron, dobijeno je jedinjenje **132** koje je izolovano u prinosu od 15%. Pristustvo dubleta u  $^1\text{H}$  NMR spektru na  $\delta_{\text{H}}$  6,33 i 5,45 ppm, sa  $J = 2,2$  Hz, potvrđuje da se supstitucija desila u položaju 3'. U istom spektru je prisutan singlet na  $\delta_{\text{H}}$  2,04 ppm koji odgovara rezonanciji protona iz metil grupe aminokiseline, kao i multipleti koji su karakteristični za protone iz metilenskih grupa bočnog niza metionina. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru dobijenog derivata uočljiv je signal na  $\delta_{\text{C}}$  176,9 ppm koji potiče od C-atoma iz karboksilne grupe, kao i signal na  $\delta_{\text{C}}$  57,9 ppm koji odgovara  $\alpha$ -atomu ugljenika iz metionina. C-atomima iz metilenskih grupa bočnog niza aminokiseline odgovaraju signali na  $\delta_{\text{C}}$  32,1 i 31,1 ppm, dok je signal na  $\delta_{\text{C}}$  15,4 ppm karakterističan za ugljenik iz metil grupe istog dela molekula. Signal u masenom spektru jedinjenja na  $m/z$  460,25091 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> potvrđuje korektnu bruto formulu jedinjenja.

L-Fenilalaninski derivat avarona **133** je izolovan u obliku crvenih kristala (prinos 10%).  $^1\text{H}$  NMR spektar potvrđuje supstituciju u 3' položaju hinona ( $\delta_{\text{H}}$  6,26 i 5,21 ppm,  $J = 2,2$  Hz). Širok signal u intervalu  $\delta_{\text{H}}$  7,20-7,08 ppm potiče od protona iz fenil grupe L-fenilalanina. Protoni iz metilenske grupe bočnog lanca se javljaju kao dvostruki dubleti na  $\delta_{\text{H}}$  3,27 i 2,99 ppm. Isti oblik signala na  $\delta_{\text{H}}$  3,98 ppm je karakterističan i za protone  $\alpha$ -C atoma. Signal u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru na  $\delta_{\text{C}}$  176,8 ppm potiče od C-atoma aminokiselinske karboksilne grupe, dok signal na  $\delta_{\text{C}}$  59,9 ppm odgovara  $\alpha$ -atomu ugljenika. C-atomima iz fenil grupe odgovaraju signali u intervalu od  $\delta_{\text{C}}$  138,7–127,6 ppm. Signal ugljenika iz metilenske grupe u bočnom nizu je vidljiv na  $\delta_{\text{C}}$  39,0 ppm. Stepem čistoće jedinjenja je potvrđen masenim spektrom visoke rezolucije koji prikazuje karakterističan signal na  $m/z$  476, 27878 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

Crveni kristali L-triptofanskog derivata avarona **134** su dobijen u prinosu od 32%.  $^1\text{H}$  NMR spektar sadrži signale vodonika iz indolnog prstena aminokiselinskog bočnog niza u intervalu  $\delta_{\text{H}}$  7,55–6,92 ppm. Protonu sa  $\alpha$ -C atomu aminokiseline odgovara široki singlet na  $\delta_{\text{H}}$  4,09 ppm, dok protoni sa metilenske grupe u bočnom nizu daju multiplete u intervalu  $\delta_{\text{H}}$  3,55–3,40 ppm i  $\delta_{\text{H}}$  3,30–3,15 ppm. Signali C-atoma iz indolnog prstena u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru se nalaze u rasponu od  $\delta_{\text{C}}$  137,7–111,2 ppm.  $\alpha$ -Ugljenik odgovara signalu na  $\delta_{\text{C}}$  54,5 ppm, dok C-atom iz metilenske grupe u bočnom nizu daje signal na  $\delta_{\text{C}}$  28,8 ppm. Masa jedinjenja je potvrđena signalom u masenom spektru na  $m/z$  515,28989 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

3.1.3. Dobijanje i karakterizacija aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona

Prvi korak u dobijanju aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona (**135**) je oksidacija komercijalno dostupnog *tert*-butilhidrohinona (**125**) (*shema 19*). Reakcioni uslovi su odgovarali prethodno primenjenim za dobijanje avaronskih derivata, s tim da su vremena trajanja reakcija bila kraća. Prilikom izolovanja je primenjena kiselo-bazna ekstrakcija. Radi olakšane interpretacije rezultata, numeracija ugljenikovih C-atoma u hinonskom jezgru je kod obe serije jedinjenja zasnovana na avaronskom prstenu.



*Shema 19.* Dobijanje aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona

Glicinski derivat *tert*-butilhinona **136** je nagrađen u obliku crvenih kristala, sa skromnim prinosom od 12%. <sup>1</sup>H NMR spektar sadrži dublete na δ<sub>H</sub> 6,41 i 5,30 ppm (*J* = 2,2 Hz) karakteristične za hinonske protone u položajima C-6 i C-4 što potvrđuje supstituciju u položaju C-3. Frekvencije protona sa α-C atoma glicina se beleže na δ<sub>H</sub> 3,64 ppm u obliku proširenog singleta. U <sup>13</sup>C NMR spektru jedinjenja karakteristični su signali na δ<sub>C</sub> 174,9 i 47,0 ppm koji odgovaraju karboksilnoj grupi, odnosno α-C atomu glicina. Struktura jedinjenja **136** je potvrđena prisustvom signala lociranog na *m/z* 238,10636 (M+H)<sup>+</sup> u masenom spektru.

Crveni kristali L-alaninskog derivata *tert*-butilhinona **137** su izolovani u prinosu od 24%. Supstitucija je izvršena u položaju 3 što dokazuju dubleti protona iz hinonskog jezgra ( $\delta_{\text{H}}$  6,40 i 5,35 ppm,  $J = 2,2$  Hz) u  $^1\text{H}$  NMR spektru. Vidljiv je i dublet na  $\delta_{\text{H}}$  1,43 ppm koji odgovara rezonanciji protona iz metil grupe u bočnom lancu alanina. Signal protona sa  $\alpha$ -C atoma aminokiseline javlja se kao kvartet na  $\delta_{\text{H}}$  3,81 ppm. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru uočljiv je signal na  $\delta_{\text{C}}$  179,3 ppm koji pripada aminokiselinskoj karboksilnoj grupi, zatim signal na  $\delta_{\text{C}}$  54,0 ppm karakterističan za  $\alpha$ -C atom, kao i na  $\delta_{\text{C}}$  18,0 ppm od metil grupe alanina. Rezultat masenog spektra  $m/z$  252,12285 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> je u saglasnosti sa izračunatim vrednostima.

$\beta$ -Alaninski derivat **138** je dobijen takođe u obliku crvenih kristala (prinos 48%).  $^1\text{H}$  NMR spektar je potvrdio supstituciju u položaju 3 (dubleti hinonskih protona na  $\delta_{\text{H}}$  6,41 i 5,44 ppm). Triplet na  $\delta_{\text{H}}$  3,30 ppm odgovara metilenskoj grupi bližoj amino grupi, dok je široki signal na  $\delta_{\text{H}}$  2,55 ppm karakteristika druge metilenske grupe iz aminokiselinske strukture. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima se vide signali karboksilne grupe na  $\delta_{\text{C}}$  178,1 ppm, kao i metilenskih grupa ( $\delta_{\text{C}}$  40,4 i 30,0 ppm). Čistoću jedinjenja potvrđuje karakterističan fragment na  $m/z$  252,12255 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

Jedinjenje **139**, tj. D-valinski derivat početnog hinona, dobijen je u reakciji sa D-valinom u prinosu od 28%. Pored dubleta koji odgovaraju protonima iz 3'-supstituisanog hinonskog jezgra ( $\delta_{\text{H}}$  6,41 i 5,40 ppm,  $J = 2,4$  Hz), u  $^1\text{H}$  NMR spektru vidi se dublet na  $\delta_{\text{H}}$  3,61 ppm koji odgovara rezonanciji protona sa  $\alpha$ -C atoma, dok je prisutan i onaj na  $\delta_{\text{H}}$  0,98 ppm koji pripada protonima iz metil grupa bočnog lanca valina. Hemijsko pomeranje protona sa račvastog C-atoma izopropil grupe bočnog lanca zabeleženo je na  $\delta_{\text{H}}$  2,20 ppm u obliku multipleta. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru jedinjenja se vide signali na  $\delta_{\text{C}}$  20,0 i 19,1 ppm koji odgovaraju rezonanciji primarnih ugljenika bočnog niza, dok je signal na  $\delta_{\text{C}}$  32,5 ppm karakterističan za treći C-atom izopropil grupe. Signal  $\alpha$ -C atoma je vidljiv na  $\delta_{\text{C}}$  64,5 ppm, dok je hemijsko pomeranje C-atoma karboksilne grupe zabeleženo na  $\delta_{\text{C}}$  177,6 ppm. Masenim spektrom je potvrđena bruto formula jedinjenja,  $m/z$  280,15442 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

L-Leucinski derivat *tert*-butilhinona **140** je dobijen u obliku crvenih kristala u prinosu od 18%.  $^1\text{H}$  NMR spektar prikazuje dublete hinonskih protona ( $\delta_{\text{H}}$  6,32 i 5,29 ppm,  $J = 2,2$  Hz) karakteristične za 3'-supstituciju, kao i dublete koji odgovaraju hemijskim pomeranjima C-atoma iz metil grupa bočnog niza aminokiseline ( $\delta_{\text{H}}$  0,89 i

0,83 ppm,  $J = 6,0$  Hz). Protoni sa preostala dva C-atoma iz leucinske izobutil grupe javljaju se kao multiplet na  $\delta_H$  1,64 ppm. Hemijsko pomeranje protona sa  $\alpha$ -C atoma zabeleženo je na  $\delta_H$  3,68 ppm. U  $^{13}C$  NMR spektru prisutni su signali primarnih ugljenika iz izobutil grupe aminokiselinskog bočnog niza na  $\delta_C$  22,7 i 23,4 ppm, dok je signal terciarnog C-atoma uočljiv na  $\delta_C$  26,4 ppm. Ugljenik iz metilenske grupe bočnog niza se vidi na  $\delta_C$  42,3 ppm. Signal  $\alpha$ -C atoma leucina se nalazi na  $\delta_C$  58,0 ppm, dok signal na  $\delta_C$  178,4 ppm odgovara karboksilnom ugljeniku. Čistoća i struktura jedinjenja su potvrđene masenim spektrom,  $m/z$  294,16991 (M+H)<sup>+</sup>.

L-Prolinski derivat **141** je dobijen u prinosu od skromnih 9%, u obliku ljubičastih kristala. Nukleofilna adicija L-prolina je išla u položaj 4 što je potvrđeno signalima u  $^1H$  NMR spektru. Naime, u spektru se javljaju signali na  $\delta_H$  5,40 i 6,28 ppm kao singleti koji potiču od hinonskih protona sa položaja 3 i 6. U  $^{13}C$  NMR spektru su uočljivi signali iz pirolidinskog prstena: na  $\delta_C$  66,7 ppm (C-11), 52,2 (C-15), 33,0 (C-13) i 24,0 ppm (C-14). Aminokiselinska karboksilna grupa odgovara signalu na  $\delta_C$  180,1 ppm. Bruto formula jedinjenja **141** je potvrđena masenom spektrometrijom i signalom locinarim na  $m/z$  278,13828 (M+H)<sup>+</sup>.

Crveni kristali L-metioninskog derivata **142** izolovani su u prinosu od 17%. Protonski NMR spektar jedinjenja ukazuje na supstituciju u položaju 3 ( $\delta_H$  6,42 i 5,44 ppm,  $J = 2,2$  Hz). Proton sa  $\alpha$ -C atoma se vidi u obliku dvostrukog dubleta na  $\delta_H$  3,88 ppm. U spektru su prisutni i multipleti u intervalima  $\delta_H$  2,52 i 2,15–2,01 ppm koji potiču od protona metilenskih grupa bočnog niza metionina, dok protoni iz metil grupe odgovaraju singletu na  $\delta_H$  1,98 ppm. U  $^{13}C$  NMR spektru su uočljivi signali metil grupe na  $\delta_C$  15,3 ppm i metilenskih grupa bočnog niza na  $\delta_C$  31,2 i 32,5 ppm. Spektar pokazuje signal karakterističan za  $\alpha$ -C atom na  $\delta_C$  58,0 ppm, kao i signal koji odgovara karboksilnoj grupi na  $\delta_C$  177,0 ppm. Struktura je dodatno potvrđena signalom  $m/z$  312,12628 (M+H)<sup>+</sup> u masenom spektru.

L-Fenilalaninski derivat hinona **143** je dobijen pri istim reakcionim uslovima, u prinosu od 41%.  $^1H$  NMR spektar pokazuje multiplet u intervalu  $\delta_H$  7,14–7,22 ppm koji je karakterističan za protone iz fenil grupe. Protoni iz metilenske grupe bočnog niza aminokiseline se ogledaju u signalima na  $\delta_H$  3,05 i 3,23 ppm, dok se signal protona sa  $\alpha$ -C atoma vidi na  $\delta_H$  3,99 ppm. U  $^{13}C$  NMR spektru se jasno uočavaju signali na  $\delta_C$  127,7 (C-17), 129,4 (C-16, C-18), 130,5 (C-15, C-19) i 138,8 (C-14) ppm. Signali  $\alpha$ -C

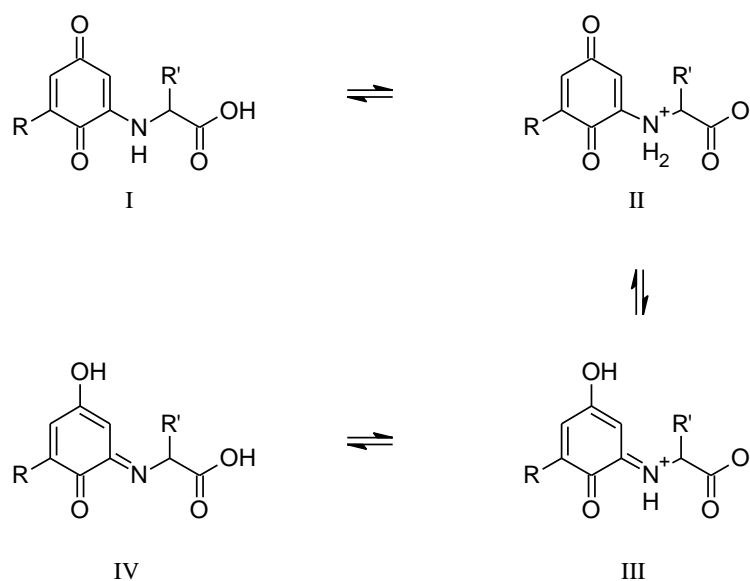
atoma (C-11) i karboksilne grupe (C-12) se nalaze na  $\delta_C$  60,1, odnosno 177,0 ppm. Ugljenikov atom iz metilenske grupe odgovara signalu na  $\delta_C$  38,8 ppm. Signal iz masenog spektra na  $m/z$  328,15398 (M+H)<sup>+</sup> potvrđuje strukturu jedinjenja.

L-Triptofanski derivat **144** je dobijen u obliku crvenih kristala u prinosu od 18%. U <sup>1</sup>H NMR spektru uočljivi su signali koji su karakteristični za indolni prsten. Naime, na  $\delta_H$  7,30 i 7,56 ppm se nalaze dubleti koji odgovaraju rezonanciji protona sa C-17 i C-20, redom; na  $\delta_H$  7,13 je uočljiv singlet protona sa C-15; u intervalu  $\delta_H$  6,90–7,08 ppm se nalaze signali protona sa C-18 i C-19. Hemijsko pomeranje protona iz metilenske grupe u bočnom nizu se beleži na  $\delta_H$  3,27 i 3,49 ppm. Dublet dubleta na  $\delta_H$  4,11 ppm odgovara protonu sa  $\alpha$ -C atoma. <sup>13</sup>C NMR spektar sadrži signale koji odgovaraju ugljenicima indolnog prstena ( $\delta_C$  111,4 (C-14), 112,2 (C-17), 119,4 (C-18), 119,7 (C-19), 122,2 (C-20), 124,5 (C-15), 129,1 (C-21) i 138,0 (C-16) ppm), kao i signal C-atoma iz metilenskog mosta na  $\delta_C$  28,8 ppm.  $\alpha$ -C atom daje signal na  $\delta_C$  59,8 ppm, dok se signal karboksilnog ugljenika vidi na  $\delta_C$  177,6 ppm. Čistoća jedinjenja je potvrđena masenim spektrom, odnosno signalom lociranim na  $m/z$  367,16471 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3.1.4. Osobine dobijenih aminokiselinskih derivata hinona

Iako se očekivalo izolovanje oba oblika derivata, u svim slučajevima su izolovani samo derivati hinona supstituisani u položaju 3'. Izuzetak je reakcija adicije aminokiseline prolina, pri čemu su dobijeni derivati kod kojih je hinonsko jezgro supstituisano u položaju 4'. U našim prethodnim radovima<sup>130</sup> je pokazano da se jači nukleofili adiraju u položaju 4', dok se slabiji adiraju u položaj 3'. Kako je prolinski azot mnogo jači nukleofil od azotovog atoma ostalih aminokiselina,<sup>131</sup> rezultat ipak nije neočekivan.

Na osnovu dobijenih IR spektara može se zaključiti da se derivati u čvrstom stanju nalaze u formi cviter-jona, što je potvrđeno prisustvom jake trake karboksilatnog jona na 1600-1580 cm<sup>-1</sup> i odsustvom trake karboksilne grupe (sa izuzetkom glicinskih derivata).

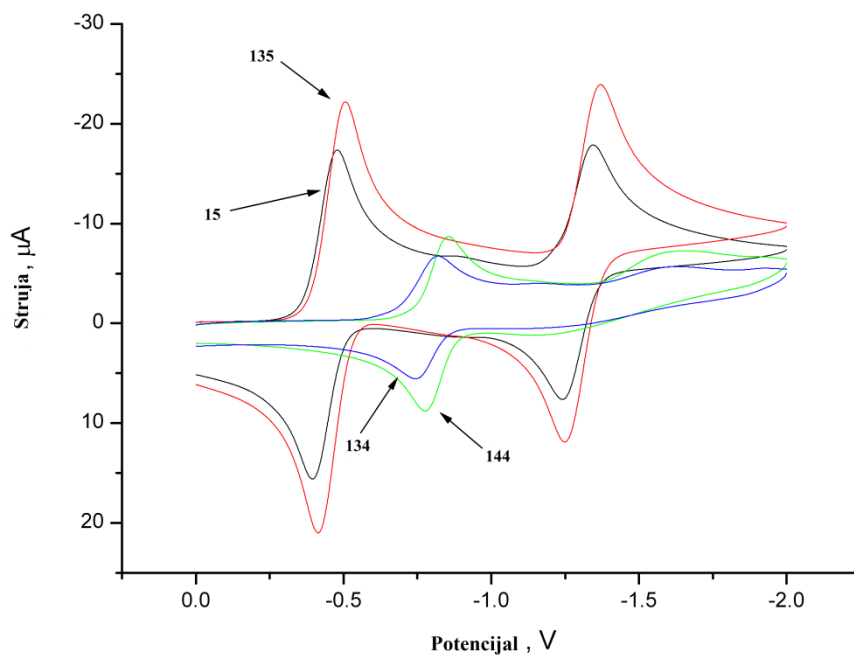


Shema 20. Tautomerni oblici aminokiselinskih derivata hinona

Prisustvo forme III (shema 20) u čvrstom stanju može se potvrditi jakom C–O vibracionom trakom na  $1150\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$  i jakom širokom apsorpcijom na  $3600\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ , nastalom preklapanjem traka O–H i N–H vibracija istežanja. Postoje dva tipa C=O vibracija istežanja, jača traka na oko  $1630\text{ cm}^{-1}$ , koja potiče od karbonilne grupe koja gradi vodoničnu vezu, i slabija na  $1670\text{ cm}^{-1}$ , od konjugovanog karbonila koji ne gradi vodoničnu vezu.

Da dolazi do tautomerne ravnoteže u rastvoru, može se zaključiti na osnovu znatnog širenja signala u NMR spektrima koji su snimani u deuterisanom hloroformu. Signali jedinjenja snimanih u deuterisanom metanolu ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) su oštri i ukazuju na prisustvo dominantnih hinonskih tautomernih oblika. Ti oblici su sada favorizovani jer ne postoji potreba za formiranjem tautomera sa hidroksilnom grupom koja bi učestvovala u građenju vodonične veze sa hinonskim karbonilom, pošto protični rastvarač ima ulogu donora vodonika.

Ciklična voltometrija je poslužila za ispitivanje elektrohemijskih osobina dobijenih aminokiselinskih derivata hinona u cilju povezivanja strukture i biološke aktivnosti. Ciklična voltometrijska merenja avarona i aminokiselinskih derivata ovog hinona u dimetil-sulfoksidu daju dva talasa koji odgovaraju reverzibilnim ili kvazi-reverzibilnim jednoelektronskim procesima (slika 31).



Slika 31. Ciklični voltamogram avarona (**15**), *tert*-butilhinona (**135**) i njihovih triptofanskih derivata (**134** i **144**, redom)

Takvo ponašanje je tipično za redoks par hinon/semihinonski anjon-radikal i semihinonski anjon-radikal/hidrohinonski dianjon, redom. Derivatizacija avarona aminokiselinama dovodi do promena u potencijalu prvog pika ka negativnijim vrednostima (više od 300 mV, *tabela 4*).

Tabela 4. Standardni potencijal prvog pika u odnosu na  $\text{Fc}^+/\text{Fc}$ 

Jed.	$E_0$ (V)	Jed.	$E_0$ (V)
<b>15</b>	-0,910	<b>135</b>	-0,933
<b>126</b>	-1,187	<b>136</b>	-1,239
<b>127</b>	-1,244	<b>137</b>	-1,267
<b>128</b>	-1,226	<b>138</b>	-1,243
<b>129</b>	-1,261	<b>139</b>	-1,252
<b>130</b>	-1,265	<b>140</b>	-1,283
<b>131</b>	-1,362	<b>141</b>	-1,389
<b>132</b>	-1,239	<b>142</b>	-1,260
<b>133</b>	-1,256	<b>143</b>	-1,255
<b>134</b>	-1,256	<b>144</b>	-1,290

Shodno tome, i drugi pik se takođe katodno pomera, ali manje. Generalno, derivatizacija ne menja reverzibilno ponašanje redoks sistema hinon/semihinonski anjon-radikal sa razdvajanjem vrhova talasa u blizini idealnih vrednosti. Međutim, drugi talas ima tendenciju da je širi i/ili manje izražen. Kao rezultat, redoks sistem semihinonski anjon-radikal/hidrohinonski dianjon liči na kvazi-reverzibilni sistem sa razdvajanjem vrhova talasa više od 80 mV. Destabilizacija aminohidrohinonskog anjona u nekim slučajevima čak vodi do nestanka drugog reoksidacionog talasa.

Uticaj *tert*-butil supstituenta prati trend u kom je potencijal pika negativno pomeren za oko 20 mV u odnosu na avaronske analoge. Ovakvo ponašanje se lako može objasniti pozitivnijim induktivnim efektom *tert*-butil grupe i sternim smetnjama. Ovaj efekat je još izraženiji za drugi talas sa pomeranjem vrha za 30 do 90 mV.



## 3.2. Ispitivanje biološke aktivnosti aminokiselinskih derivata hinona

### 3.2.1. Ispitivanje citotoksičnog dejstva

Pri dizajniranju potencijalnih antitumorskih agenasa, glavni cilj je sinteza jedinjenja koja će pokazati vrlo jako inhibitorno dejstvo prema rastu malignih ćelija, kao i visoku selektivnost. Kvantitativna jačina inhibicije se izražava kao  $IC_{50}$  vrednost što podrazumeva koncentraciju ispitivanog jedinjenja pri čijem dejstvu se broj živih ćelija smanjuje za 50% u odnosu na netretiranu ćelijsku kontrolu. Prema ustaljenim kriterijumima, svako jedinjenje sa  $IC_{50}$  vrednostima nižim od 20  $\mu$ M poseduje zadovoljavajuću citotoksičnost. Supstance čije se  $IC_{50}$  vrednosti kreću u rasponu 20–100  $\mu$ M smatraju se umerenim ili slabim citotoksičnim agensima, dok one koje prelaze pomenutu graničnu vrednost spadaju pod neaktivne.

Ispitana je citotoksična aktivnost novosintetisanih aminokiselinskih derivata na rast sledećih humanih malignih ćelijskih linija: karcinom grlića materice (HeLa), melanom (Fem-X), hronična mijeloidna leukemija (K562), adenokarcinom dojke (MDA-MB-453) i adenokarcinom pluća (A549). Radi sticanja uvida u selektivnu citotoksičnost prema tumorskim ćelijskim linijama, ispitana je i citotoksična aktivnost dobijenih jedinjenja na zdravim fetalnim fibroblastama pluća (MRC-5).

Citotoksična aktivnost jedinjenja *in vitro* određena je kolorimetrijskim MTT testom. Princip testa je konverzija, odnosno redukcija tetrazolijumove soli MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid) u formazan, plavo obojen proizvod, u prisustvu mitohondrijskog enzima sukcinat-dehidrogenaze. Količina stvorenog formazana direktno je proporcionalna broju živih ćelija. Vrednosti apsorbancije se očitavaju na 570 nm na ELISA čitaču. Eksperimenti su izvedeni tako što su kulture ćelija izložene dejstvu rastućih koncentracija ispitivanih derivata tokom 72 h. Klinički antitumorski lek cisplatin korišćen je kao referentno jedinjenje. Vrednosti  $IC_{50}$  su prikazane u tabeli 5.

Tabela 5. IC<sub>50</sub> (μM) vrednosti derivata avarona na ćelijske linije

Jed.	HeLa	A549	Fem-X	K562	MDA-MB-453	MRC-5
<b>15</b>	18,12 ± 0,68	30,03 ± 2,88	40,33 ± 2,88	17,08 ± 0,35	16,71 ± 1,74	>200
<b>126</b>	19,87 ± 1,15	46,71 ± 2,53	17,84 ± 1,34	15,63 ± 1,08	5,84 ± 0,92	183,29 ± 1,15
<b>127</b>	11,66 ± 1,74	54,29 ± 1,01	10,29 ± 1,15	15,75 ± 0,19	14,65 ± 1,62	157,38 ± 2,14
<b>128</b>	8,87 ± 1,08	26,91 ± 0,25	20,24 ± 2,89	15,47 ± 1,86	3,31 ± 0,71	80,76 ± 1,54
<b>129</b>	10,92 ± 1,33	23,77 ± 1,21	11,43 ± 0,61	7,78 ± 0,20	8,01 ± 0,57	85,42 ± 1,88
<b>130</b>	7,72 ± 0,89	19,72 ± 2,83	10,87 ± 0,16	11,17 ± 2,83	10,93 ± 0,51	73,39 ± 1,86
<b>131</b>	36,23 ± 0,09	49,21 ± 0,75	39,63 ± 1,13	35,44 ± 1,76	60,63 ± 0,06	96,02 ± 2,24
<b>132</b>	13,91 ± 1,98	47,31 ± 2,86	19,43 ± 1,03	13,58 ± 1,72	25,58 ± 1,20	>200
<b>133</b>	14,64 ± 1,16	40,08 ± 3,43	17,26 ± 1,59	20,46 ± 0,87	16,55 ± 0,93	>200
<b>134</b>	16,24 ± 2,29	39,56 ± 2,21	14,82 ± 2,22	16,12 ± 0,29	22,94 ± 1,82	157,39 ± 2,19
<b>cisplatin</b>	2,1 ± 0,20	11,92 ± 2,19	4,71 ± 0,20	6,89 ± 0,21	3,48 ± 0,22	14,21 ± 1,54

Avaronski derivati pokazali su citotoksičnu aktivnost prema svim testiranim malignim ćelijskim linijama, a veoma slabu citotoksičnost prema normalnim MRC-5 ćelijama. Derivati **128**, **129** i **130** su bili aktivniji nego avaron (**15**) prema svim ćelijskim linijama, sa pojedinim vrlo niskim mikromolarnim IC<sub>50</sub> vrednostima. Sa druge strane, jedinjenje **131** bilo je skoro uvek manje aktivno od avarona. Fem-X ćelijska linija bila je osetljivija na sve derivate avarona (isključujući **131**, koji je bio slične aktivnosti) u poređenju sa njim samim.

β-Alaninski derivat **128** pokazalo je najjaču aktivnost prema ćelijskoj liniji kancera dojke, MDA-MB-453, sa mikromolarnom vrednošću vrlo sličnom onoj određenoj za cisplatin. Potrebno je naglasiti da je jedinjenje **128** ispoljilo znatno nižu citotoksičnost prema zdravoj ćelijskoj liniji MRC-5, za razliku od cisplatina. Derivat **128** je, takođe, pokazao značajnu citotoksičnost i prema HeLa ćelijama, a njegova aktivnost je samo četiri puta slabija od aktivnosti cisplatine. U poređenju sa osnovnim

jedinjenjem **15**, najizraženija razlika je zabeležena prema MDA-MB-453 ćelijskoj liniji gde je aktivnost derivata **128** jača pet puta.

IC<sub>50</sub> D-valinskog derivata **129** ukazuje na veoma dobru antitumorsku aktivnost prema K562 i MDA-MB-453 ćelijskim linijama. Jedinjenje **129** je ispoljilo barem dvostruko jaču citotoksičnost prema pomenutim tumorskim ćelijskim linijama od avarona. Jačina dejstva derivata **129** je uporediva sa dejstvom cisplatine prema ćelijskoj liniji K562, a takođe pokazuje dobru selektivnost prema malignim ćelijama.

Leucinski derivat avarona **130** pokazuje veoma značajnu citotoksičnu aktivnost prema svim ispitivanim ćelijskim linijama, posebno prema HeLa ćelijama. Potrebno je naglasiti da je jedinjenje **130** pokazalo značajnu aktivnost i prema kontrolnim zdravim ćelijama MRC-5, ali opet pet puta slabiju u odnosu na cisplatin.

Takođe, izuzetno dobru citotoksičnost pokazuje glicinski derivat **126** prema MDA-MB-453 ćelijskoj liniji. S druge strane, jedinjenje **126** poseduje visoku selektivnost; skoro trinaest puta je manje aktivno prema zdravoj ćelijskoj liniji nego pozitivna kontrola.

Samo neki odnosi struktura–aktivnost su mogli da se utvrde. Aktivnost se generalno povišava uvođenjem aminokiselinskih supstituenata sa alifatičnim ugljovodoničnim bočnim lancem, kako malim (uključujući i β-alanin), tako i voluminoznim.

Aromatični bočni lanac nije poboljšao aktivnost, a prolinski ostatak je smanjio i aktivnost i selektivnost. Glicinski i β-alaninski derivati su bili selektivni za ćelijsku liniju kancera dojke, dok su alaninski, valinski i leucinski derivati pokazali jaku aktivnost, ali bez izražene specifičnosti prema određenim ćelijskim linijama tumora, iako su pokazali odličnu selektivnost za tumorske ćelijske linije u poređenju sa normalnim MRC-5 ćelijama.

U tabeli 6 su prikazani rezultati dejstva aminokiselinskih derivata model jedinjenja *tert*-butilhinona.

Tabela 6. IC<sub>50</sub> (μM) vrednosti derivata *tert*-butilhinona na ćelijske linije

Jed.	HeLa	A549	Fem-X	K562	MDA-MB-453	MRC-5
<b>135</b>	44,08 ± 2,11	47,02 ± 1,27	41,64 ± 2,55	15,54 ± 1,48	56,83 ± 2,07	>200
<b>136</b>	131,67 ± 2,76	>200	34,33 ± 0,84	85,02 ± 1,61	171,26 ± 2,35	>200
<b>137</b>	89,12 ± 4,09	>200	20,11 ± 1,53	77,63 ± 2,38	112,24 ± 1,73	>200
<b>138</b>	47,11 ± 3,22	171,21 ± 3,27	28,42 ± 0,95	66,96 ± 2,42	94,09 ± 1,23	>200
<b>139</b>	96,55 ± 1,08	154,47 ± 0,75	24,55 ± 0,34	57,84 ± 1,57	133,25 ± 0,55	>200
<b>140</b>	57,22 ± 0,34	97,93 ± 0,42	39,37 ± 2,32	76,54 ± 1,91	84,89 ± 0,43	>200
<b>141</b>	44,94 ± 0,69	186,03 ± 2,47	87,30 ± 1,31	49,24 ± 2,69	67,17 ± 1,04	>200
<b>142</b>	77,41 ± 0,24	>200	34,82 ± 1,73	88,51 ± 1,33	150,95 ± 2,57	>200
<b>143</b>	66,31 ± 1,52	164,17 ± 3,51	67,29 ± 1,11	82,26 ± 2,36	68,01 ± 1,18	>200
<b>144</b>	106,31 ± 1,77	198,04 ± 1,21	34,71 ± 1,12	25,04 ± 3,23	119,86 ± 1,27	>200
<b>cisplatin</b>	2,1 ± 0,20	11,92 ± 2,19	4,71 ± 0,20	6,89 ± 0,21	3,48 ± 0,22	14,21 ± 1,54

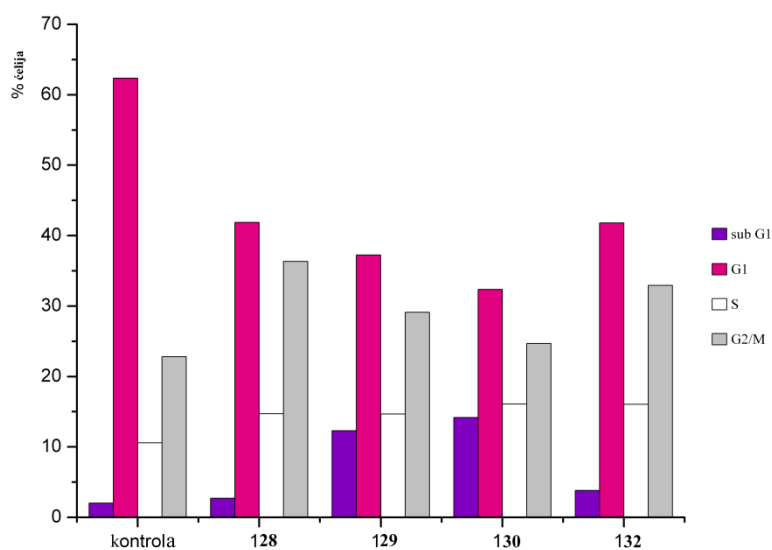
Za razliku od avaronskih, aminokiselinski derivati *tert*-butilhinona su pokazali mnogo slabiju citotoksičnu aktivnost nego odgovarajući avaronski derivati, a jako dobru selektivnost. Sintetisani derivati, sa izuzetkom prolinskog i triptofanskog derivata, pokazali su najjaču citotoksičnu aktivnost prema ćelijskoj liniji Fem-X. Iako je zabeležena aktivnost umerene jačine, sva jedinjenja, osim prolinskih i fenilalaninskih derivata (**141**, odnosno **143**), ispoljila su jače citotoksično dejstvo u poređenju sa osnovnim jedinjenjem *tert*-butilhinonom. Odnosi struktura–aktivnost nisu mogli biti utvrđeni unutar ove serije jedinjenja.

### 3.2.2. Ispitivanje mehanizma antitumorskog dejstva

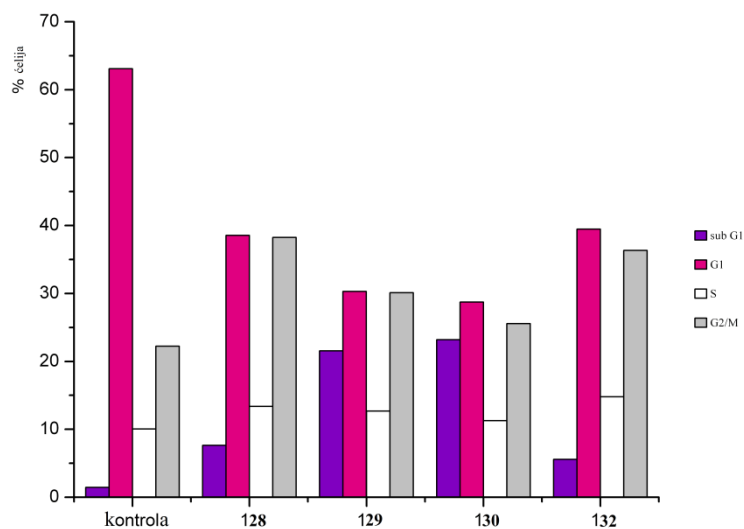
Ispitivanjem uticaja prirodnog seskviterpenskog hinona avarona i *tert*-butilhinona, te njihovih aminokiselinskih derivata na proliferaciju određenih malignih ćelijskih linija, došlo se do zaključka da skoro svi avaronski derivati inhibiraju rast tumorskih ćelija u manjoj ili većoj meri, dok su *tert*-butilhinonski derivati znatno neaktivniji. Uzimajući to u obzir, pristupilo se ispitivanju mehanizma antitumorskog dejstva dobijenih derivata avarona.

Ćelijski ciklus predstavlja skup organizovanih i složenih procesa koji se odvijaju između dve ćelijske deobe, uključujući tu i samu ćelijsku deobu. Kako u toku ćelijske deobe može doći do pojava nepravilnosti ili oštećenja, vrlo značajnu ulogu igraju molekuli koji čine tzv. kontrolni sistem ćelijskog ciklusa. Njihova prevashodna uloga jeste da zaustave prelazak iz jedne faze ćelijske deobe u drugu, kako bi sama ćelija imala dovoljna vremena da sanira nastali 'kvar'. Potrebno je naglasiti da svako narušavanje ovog sistema dovodi do prenošenja nastalih grešaka ili do nekontrolisane deobe ćelija.

U cilju razumevanja mehanizma citotoksičnog dejstva, analizirana je distribucija malignih HeLa ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa nakon dejstva ispitivanih jedinjenja. U ovom testu su korišćena jedinjenja **128–130** i **132** zbog pokazane značajne citotoksične aktivnosti prema HeLa ćelijama. Na osnovu rezultata MTT testa, primenjene su vrednosti koncentracija  $IC_{50}$  i  $2IC_{50}$  za proveru distribucije ćelijskog ciklusa. Na *slikama 32* i *33* prikazana je distribucija ćelijskog ciklusa HeLa ćelija, inkubiranih u odsustvu i prisustvu jedinjenja tokom 24 sata. Rezultati ukazuju na promenu procenta ćelija u svakoj fazi ćelijskog ciklusa: sub-G1, G1, S i G2/M, u poređenju sa netretiranim ćelijama kao kontrolom.



Slika 32. Distribucija ćelijskog ciklusa nakon 24 h kontinuiranog delovanja ispitanih jedinjenja. Koncentracija odgovara  $IC_{50}$ .



Slika 33. Distribucija ćelijskog ciklusa nakon 24 h kontinuiranog delovanja ispitanih jedinjenja. Koncentracija odgovara  $2IC_{50}$ .

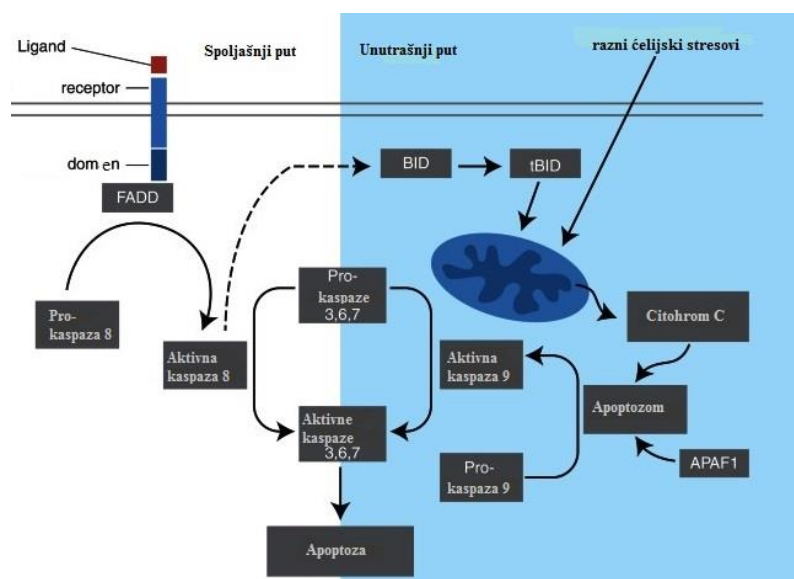
Jedinjenja **129** i **130** dovode do značajnog povećanja broja ćelija u sub-G1 fazi, dok je primetno odgovarajuće smanjenje broja ćelija u G1 fazi, u odnosu na kontrolu.

Nasuprot tome, jedinjenja **128** i **132** uzrokovala su povećanje broja ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa nakon tretmana u trajanju od 24 sata.

Dejstvo jedinjenja **129** dovelo je do akumulacije ćelija u sub-G1 fazi, što je praćeno blagim povećanjem ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa. Dodatno, kako je prikazano na *slikama 32* i *33*, dolazi do značajnog povećanja procenta ciljnih HeLa ćelija u sub-G1 fazi ćelijskog ciklusa, u odnosu na procenat kontrolnog uzorka HeLa ćelija u sub-G1 fazi pri primeni koncentracije  $2IC_{50}$ . Dobijeni rezultati sugerišu da zaustavljanje ćelijskog ciklusa i indukovanje apoptoze može biti mogući mehanizam dejstva ispitivanih jedinjenja u humanim ćelijama kancera. Najjači efekti, i u ispitivanju citotoksičnosti i u narušavanju ćelijskog ciklusa i indukovanju apoptoze, zabeleženi su kod avaronskih derivata sa razgranatim aminokiselinskim bočnim nizom.

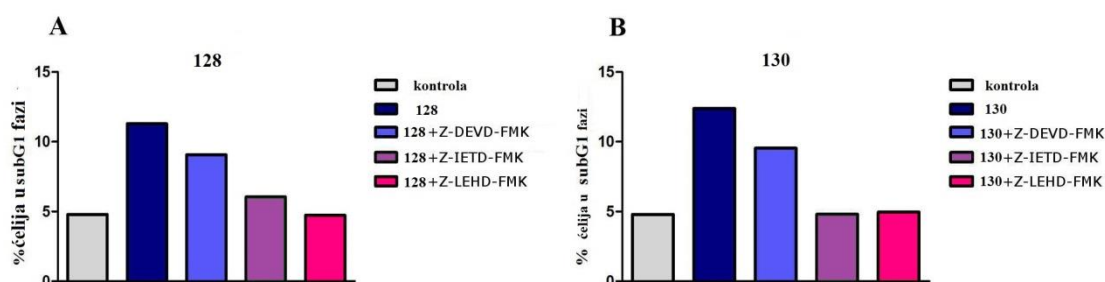
### 3.2.3. Određivanje ciljnih kaspaza

Kaspaze (eng. caspases, **cysteine-aspartic proteases**) spadaju u grupu cisteinskih proteaza koje imaju esencijalnu ulogu u kontrolisanju ćelijske smrti i inflamacije. Grupisane su u više grupa, u zavisnosti od uloga koje imaju u procesu apoptoze (*slika 34*).



Slika 34. Unutrašnji i spoljašnji put apoptoze (Izvor: ref<sup>132</sup>)

U cilju ispitivanja mehanizma apoptoze indukovane ispitivanim jedinjenjima u HeLa ćelijama, pristupilo se rasvetljavanju signalnih puteva, te su određene ciljne kaspaze korišćenjem specifičnih inhibitora kaspaza. U skladu sa tim, izabrana su dva derivata koja su pokazala najjače citotoksično dejstvo prema HeLa ćelijama, **128** i **130**. Aktivnost kaspaza 3, 8 i 9 procenjena je posle inkubacije sa pomenutim jedinjenjima (slika 35).



Slika 35. Uticaj jedinjenja **128** (A) i **130** (B) samog ili u kombinaciji sa inhibitorima kaspaze 3 (Z-DEVD-FMK), kaspaze 8 (Z-IETD-FMK) ili kaspaze 9 (Z-LEHD-FMK) na frakciju HeLa ćelija u fazi sub-G1.

Rezultati su pokazali da je apoptoza izazvana jedinjenjima **128** i **130** posredovana stimulisanjem aktivnosti kaspaza 3, 8 i 9. Evidentno je da specifični inhibitori značajno potiskuju kaspaznu aktivnost i povećavaju ćelijsko preživljavanje. Inhibitor kaspaze 3 pokazao je značajno slabiji uticaj na aktivnost ispitivanih komponenti, sugerišući početak apoptotske ćelijske smrti uglavnom preko mitohondrijskog puta, aktivacijom kaspaza 8 i 9 u HeLa ćelijama. Generalno, aktivacija kaspaza 3, 8 i 9 može biti uključena u apoptozu indukovanu ovim jedinjenjima u HeLa ćelijama.



### 3.2.4. Određivanje antibakterijske aktivnosti

Antibakterijsko dejstvo sintetisanih jedinjenja ispitano je prema šest sojeva Gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), i četiri soja Gram-negativnih bakterija: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

Metodom dvostrukih razblaženja su određene minimalne inhibitorne aktivnosti (MIK) za ispitivana jedinjenja. Rezultati antibakterijskog dejstva aminokiselinskih derivata avarona prikazani su u *tabeli 7*.

Tabela 7. Antibakterijska aktivnost aminokiselinskih derivata avarona (MIK,  $\mu\text{M}$ )

Jed.	<i>S. aureus</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>M. flavus</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. hauseri</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>15</b>	40,06	20,03	80,13	2000,38	20,03	20,03	440,96	27,56	55,12	13,78
<b>126</b>	101,04	810,88	406,74	101,04	406,74	406,74	101,04	810,88	406,74	406,74
<b>127</b>	49,10	1566,42	195,49	97,74	195,49	195,04	49,10	393,48	195,49	195,49
<b>128</b>	24,53	392,97	392,97	48,81	783,44	392,97	48,81	392,97	783,44	783,44
<b>129</b>	22,95	1463,70	91,33	22,95	91,33	91,33	22,95	182,67	182,67	91,33
<b>130</b>	5,55	708,79	88,32	11,10	88,32	44,16	5,55	44,16	88,32	88,32
<b>131</b>	91,55	734,74	183,10	91,55	183,10	368,54	91,55	183,10	183,10	183,10
<b>132</b>	42,39	1358,70	169,57	42,39	169,57	169,57	42,39	341,30	169,57	169,57
<b>133</b>	10,32	330,53	20,63	10,32	82,11	82,11	10,32	82,11	20,63	20,63
<b>134</b>	19,07	305,45	37,94	19,07	37,94	37,94	19,07	37,94	19,07	37,94
<b>amikacin</b>	18,78	3,42	71,72	13,65	3,42	25,61	8,54	11,95	13,66	85,38

Generalno, avaronski derivati su pokazali značajno jaču antibakterijsku aktivnost nego *tert*-butilhinonski (tabela 8). Skoro svi avaronski derivati su imali MIK vrednosti oko 100  $\mu$ M ili niže prema *S. aureus*, *M. luteus* and *E. coli*. Najslabija aktivnost pokazana je prema Gram-pozitivnoj bakteriji *K. rhizophila*.

Najjače je bilo izraženo antibakterijsko dejstvo leucinskog derivata **130** prema *S. aureus* i *E. coli*. Njegove MIK vrednosti pokazuju značajno jače antibakterijsko dejstvo nego amikacin, antibiotik koji je korišćen kao pozitivna kontrola. I bakterijski soj *M. luteus* je bio osetljiviji na dejstvo jedinjenja **130** u poređenju sa amikacinom. Jačina delovanja molekula **130** prema pomenutim bakterijskim kulturama višestruko je izraženija nego što je slučaj sa osnovnim hinonom avaronom.

Rezultati dobijeni za dejstvo derivata koji sadrže ostatke aromatičnih aminokiselina **133** i **134**, pokazali su dobru aktivnost prema *B. subtilis* i *P. aeruginosa*, nekoliko puta bolju nego što je zabeležena za amikacin. Jedinjenje **133** pokazalo je takođe odličnu aktivnost prema sojevima *S. aureus* i *M. luteus*, značajno bolju nego kontrolni antibiotik, ali i osnovno jedinjenje.

U poređenju sa osnovnim jedinjenjem, svi derivati avarona pokazali su jaču aktivnost prema bakterijskim sojevima *M. luteus* i *E. coli*. Odnos struktura–aktivnost drugačiji je od onog izvedenog za citotoksičnost prema tumorskim ćelijama, pošto je najbolja aktivnost dobijena kod derivata sa voluminoznim i aromatičnim bočnim nizom, dok su mali aminokiselinski ostaci smanjili aktivnost u poređenju sa avaronom.

MIK vrednosti antibakterijskog dejstva aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona izložene su u tabeli 8.

Analizom dobijenih vrednosti, lako je uočljivo da su derivati neaktivni prema ispitanim bakterijskim sojevima. S obzirom na to da ni osnovno jedinjenje ne pokazuje antibakterijsku aktivnost, nije svrsishodno vršiti poređenje sa vrednostima dobijenim za derivate.

Tabela 8. Antibakterijska aktivnost aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona (MIK,  $\mu$ M)

Jed.	<i>S. aureus</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>M. flavus</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. hauseri</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>135</b>	237,51	475,03	237,51	237,51	475,03	475,03	237,51	475,03	475,03	475,03
<b>136</b>	662,45	2637,13	1320,68	662,45	2637,13	2637,13	662,45	2637,13	2637,13	662,45
<b>137</b>	1247,01	4980,08	2490,04	1247,02	2490,04	2490,04	1247,01	4980,08	2490,04	2490,04
<b>138</b>	624,80	2487,27	2487,27	1245,62	2487,27	1245,62	1245,62	2487,27	2487,27	2487,27
<b>139</b>	1121,86	4480,29	2240,14	1121,86	2240,14	2240,14	1121,86	4480,28	4480,28	2240,14
<b>140</b>	265,88	2130,49	2130,49	265,88	2130,49	2130,49	265,88	2130,49	2130,49	4260,98
<b>141</b>	566,79	2256,32	1129,96	566,79	2256,32	2256,32	566,79	2256,32	2256,32	2256,32
<b>142</b>	1006,43	2009,64	2009,65	504,82	2009,64	2009,65	1006,43	2009,65	2009,65	2009,64
<b>143</b>	480,12	1911,32	1911,32	480,12	1911,32	1911,32	480,12	1911,32	1911,32	1911,32
<b>144</b>	855,19	1707,65	1707,65	1707,65	1707,65	1707,65	1707,65	1707,65	1707,65	1707,65
<b>amikacin</b>	18,78	3,42	71,72	13,65	3,42	25,61	8,54	11,95	13,66	85,38

### 3.2.5. Određivanje antifungalne aktivnosti

Antifungalna aktivnost aminokiselinskih derivata ispitivana je prema tri soja gljivica: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) i *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) (tabela 9).

Tabela 9. Antifungalna aktivnost derivata avarona i *tert*-butilhinona (MIK,  $\mu$ M)

Jed.	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. brasiliensis</i>	Jed.	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. brasiliensis</i>
15	n.a <sup>a</sup>	n.a <sup>a</sup>	n.a <sup>a</sup>	135	121,80	237,51	121,80
126	12,60	100,26	403,60	136	662,45	662,45	2637,13
127	6,13	195,00	1562,50	137	625,50	625,50	1240,01
128	195,00	12,25	782,50	138	625,50	310,76	2490,04
129	< 2,88	367,68	164,13	139	562,72	562,72	2240,14
130	< 5,54	176,47	1414,03	140	535,84	133,11	1068,26
131	23,01	45,77	734,74	141	566,79	566,79	2256,32
132	< 2,67	87,78	341,30	142	504,82	504,82	2009,65
133	164,21	10,32	1315,79	143	480,12	119,27	957,19
134	305,45	< 2,39	1215,95	144	213,11	213,11	1407,65
nistatin	2700,00	1350,00	1350,00	nistatin	2700,00	1350,00	1350,00

<sup>a</sup>nije aktivno

Svi avaronski derivati su drastično aktivniji prema *C. albicans* i *S. cerevisiae* u poređenju sa pozitivnom kontrolom nistatinom. Takođe, skoro svi derivati su pokazali značajnu aktivnost prema *A. brasiliensis*, iako je njihovo dejstvo prema ovom soju gljivica slabije nego što je to slučaj sa prethodno pomenutim sojevima.

Najizraženiju antifungalnu aktivnost prema soju *C. albicans* među ispitanim avaronskim derivatima, ispoljili su D-valinski i metioninski derivati **129**, odnosno **132**. Intenzitet njihovog dejstva više je nego hiljadu puta jači u poređenju sa široko korišćenim nistatinom. Sličan efekat su pokazali i alaninski i leucinski derivati **127**,

odnosno **130**, dok ni dejstvo glicinskog derivata **126** nije zanemarljivo. Soj *S. cerevisiae* pokazao se kao izuzetno osetljiv na dejstvo triptofanskog derivata **134**, ali je zapaženo i dejstvo  $\beta$ -alaninskog i fenilalaninskog derivata **128**, odnosno **133**.

*tert*-Butilhinonski derivati su pokazali jaču aktivnost prema sojevima *C. albicans* i *S. cerevisiae* nego nistatin. Kod ove grupe derivata, može se primetiti da je osnovno jedinjenje ispoljilo značajnije dejstvo prema ispitanim sojevima gljivica, skoro u svim slučajevima. Bez obzira na to, u većini slučajeva aktivnost ovih derivata bila je mnogo slabija nego avaronskih. Osim efekta alkil grupe vezane za hinonsko jezgro, nije moguće uočiti drugi odnos struktura–aktivnost.

### 3.2.6. Ispitivanje toksične aktivnosti *Brine shrimp* testom

*Brine shrimp* test je brz, jeftin i jednostavan preliminarni biotest koji se zasniva na ispitivanju letalnog dejstva jedinjenja na račiće *Artemia salina*. Rezultati testa se u većini slučajeva mogu dovesti u korelaciju sa citotoksičnom aktivnošću jedinjenja prema ćelijama mišjeg limfoma L5178y i ćelijama leukemije L1210.<sup>133</sup>

Tabela 10. Rezultati *Brine shrimp* testa

Jed.	LC <sub>50</sub> (ppm)	Jed.	LC <sub>50</sub> (ppm)
<b>15</b>	170,00	<b>135</b>	27,40
<b>126</b>	487,10	<b>136</b>	197,40
<b>127</b>	129,40	<b>137</b>	393,80
<b>128</b>	84,30	<b>138</b>	833,20
<b>129</b>	50,50	<b>139</b>	574,90
<b>130</b>	117,00	<b>140</b>	104,80
<b>131</b>	706,60	<b>141</b>	883,40
<b>132</b>	147,70	<b>142</b>	360,20
<b>133</b>	96,70	<b>143</b>	196,80
<b>134</b>	227,40	<b>144</b>	334,10

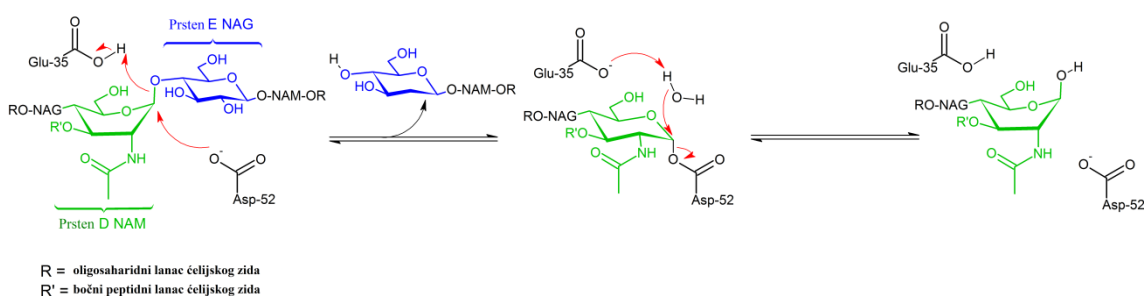
Avaronski derivati (*tabela 10*) su pokazali relativno dobru korelaciju sa antileukemijskom aktivnosti. D-Valinski derivat **129** je bio najefikasniji, dok je prolinski derivat **131** pokazao najslabiju aktivnost.

*tert*-Butilhinonski derivati su pokazali slabiju korelaciju sa rezultatima citotoksične aktivnosti prema ćelijama leukemije.

### 3.2.7. Hemijske modifikacije lizozima

Hinoni poseduju sposobnost da modifikuju proteine, odnosno da ih umrežavaju. Amino i/ili sulfhidrilne grupe aminokiselinskih ostataka enzima se u reakciji nukleofilne adicije kovalentno vezuju za hinonsko jezgro pri čemu nastaju monohinonski adukti,<sup>134</sup> što uslovljava promenu u terciarnoj strukturi proteina, te dovodi i do promena u enzimskoj aktivnosti. Ukoliko hinon nije supstituisan pre reakcije sa enzimom, moguće je nastajanje umreženog proteina, dodatnom nukleofilnom adicijom.<sup>135</sup>

Lizozim (EC 3.2.1.17, 1,4- $\beta$ -*N*-acetilmuramidaza) je bakteriolitički enzim koji hidrolizuje specifičnu 1,4- $\beta$ -glikozidnu vezu između *N*-acetilmuraminske kiseline (NAM) i *N*-acetil-D-glukozaminskih ostataka (NAG) u peptidoglikanu, glavnom konstituentu ćelijskog zida Gram-pozitivnih bakterija (*shema 21*).

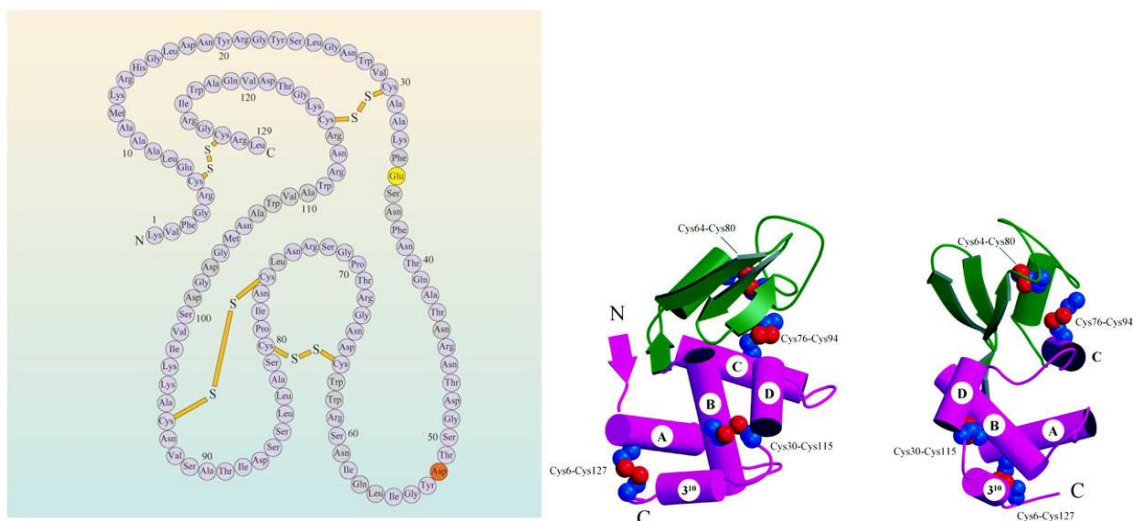


*Shema 21.* Mehanizam dejstva lizozima (izvor: ref <sup>136</sup>)

Lizozim iz belanceta kokošijeg jajeta spada u c-tip lizozima (119–130 AK). U istu grupu spada i lizozim čoveka (130 AK) koji ima 60% sekvencije koja je homologna sa lizozimom iz belanceta kokošijeg jajeta, te mu je po osobinama i 3D strukturi veoma sličan. Primarnu strukturu lizozima izolovanog iz belanceta kokošijeg jajeta (u daljem tekstu samo lizozim) čini polipeptid sa 129 aminokiselinskih ostataka (*slika 36*). U

fiziološkim uslovima, enzim je u globularnom obliku sa dubokim procepom, aktivnim mestom. Molekulska masa je 14307 Da i izoelektrična tačka na pH 11,5. Četiri disulfidna mosta zajedno sa helikoidnim regionima ga čine termalno visoko stabilnim.

Lizozim koji je izolovan iz belanceta kokošijeg jajeta se u biohemijskim istraživanjima koristi kao model-protein zbog svoje relativno male mase i sposobnosti da formira kristale koji su laki za dalju manipulaciju.



Slika 36. Lizozim (izvor: ref <sup>137</sup>)

U prethodnim radovima u okviru naše laboratorije, utvrđeno je da se avaron i njegovi metilamino derivati kovalentno vezuju za amino grupu lizina-97 (Lys-97) u lizozimu.<sup>134</sup> Kako bi se utvrdilo da li i aminokiselinski derivati hinona imaju istu sposobnost, odnosno da li dolazi do nukleofilne adicije, pristupilo se eksperimentima modifikovanja lizozima.

### 3.2.7.1. Reakcioni uslovi

Prethodnim radom su utvrđeni optimalni uslovi za modifikaciju lizozima avaronskim derivatima. Dakle, modifikacija lizozima se odvijala u 20% etanolu, uz dodatak 50 mM amonijum- bikarbonata i u prisustvu kiseonika. Reakcija je trajala 48 h na sobnoj temperaturi, uz konstantno mešanje. Finalna koncentracija lizozima je iznosila 5 mg/mL, dok je hinonsko jedinjenje bilo u velikom višku i njegova finalna koncentracija je bila 2 mg/mL.



Kako se aminokiselinski derivati zbog svoje polarnosti nepotpuno rastvaraju u etanolu, bila je neophodna optimizacija uslova. Kao rastvarač je prvobitno korišćen DMSO jer je u prethodnim radovima dokazano da se modifikacije lizozima avaronskim jedinjenjima dešavaju i u 20% DMSO, dok su drugi uslovi ostali isti. Dakle, kao baza je korišćen 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  kako bi se povećala nukleofilnost aminokiselinskih ostataka lizozima i pH vrednost reakcione smese je iznosila 8.

Potom je, u cilju blagog pojačanja nukleofilnosti lizinskih ostataka lizozima, umesto 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  upotrebljen 50 mM  $\text{NaHCO}_3$  kao baza. pH vrednost na kojoj se odvijala reakcija modifikacije je iznosila 8,5.

Aminokiselinski derivati su takođe rastvorni u metanolu, ali i u vodi. Kako bi se utvrdilo da li izbor rastvarača utiče na stepen modifikacije lizozima, ispitivani derivati su rastvoreni u 20% metanolu, a zatim i u vodi. U oba slučaja je upotrebljivan 50 mM  $\text{NaHCO}_3$  kao baza.

S obzirom na osobine aminokiselinskih derivata, nametnulo se pitanje šta bi se dešavalo kada bi se pH modifikacione smese drastično izmenio. Pregledom literature je utvrđeno da su se modifikacije lizozima hinonskim jedinjenjima odvijale i u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,0 što je imalo za svrhu da simulira uslove slične fiziološkim uslovima u organizmu.<sup>138</sup> Kako bi pH vrednost reakcione smese odgovarala fiziološkom pH, reakcije modifikacije lizozima aminokiselinskim derivatima avarona i *tert*-butilhinona su zatim izvedene u 100 mM fosfatnom puferu pH 7,4.

Reakcije su rađene i u 100 mM acetatnom puferu pH 4,5 i u 100 mM amonijačnom puferu pH 10.

U svim slučajevima su reakcije modifikacije trajale 48 sati uz stalno mešanje na šejkeru na sobnoj temperaturi. Povišenje temperature reakcione smese nije dolazilo u obzir, kako zbog mogućnosti denaturacije enzima, tako i zbog činjenice da dolazi do raspada derivata na višim temperaturama.

S obzirom na to da su aminokiselinski derivati hinona intenzivno (crveno i crvenoljubičasto) obojeni, nije bilo moguće uočiti da li je dolazilo do promene boje reakcione smese nakon dodavanja jedinjenja. Ono što je bilo uočljivo u nekim probama, jeste pojava taloga. U reakcijama aminokiselinskih derivata avarona sa lizozimom je odmah nakon dodavanja jedinjenja dolazilo do pojave taloga (paperjastog, zrnastog),

dok je u reakcijama sa *tert*-butilhinonskim jedinjenjima količina taloga bila minimalna (obično su to bila blaga zamućenja).

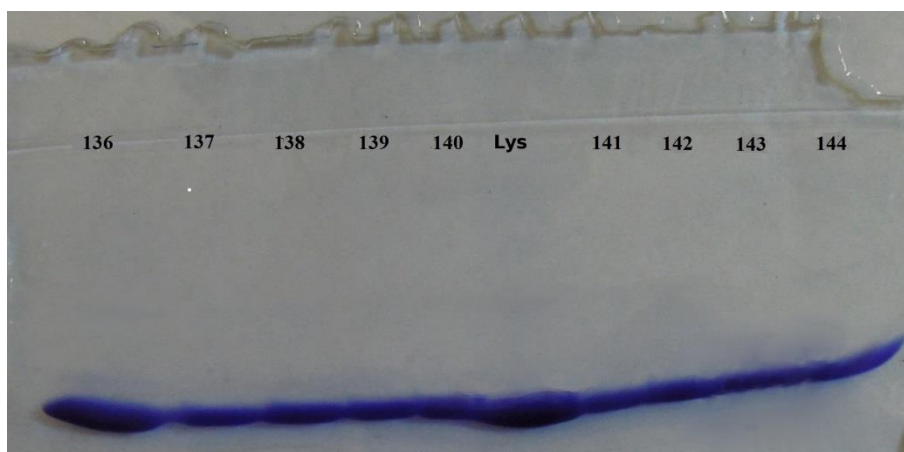
### 3.2.7.2. Obrada reakcionih smesa

Nakon završetka reakcija, sve reakcione smese su centrifugirane. Količina nastalog taloga je varirala, dok u nekim uzorcima nije ni došlo do njegove pojave. Nakon odvajanja supernatanta, pristupilo se obradi postojećeg taloga iz svake reakcione smese. Svaki talog je ekstrahovan vodom kako bi se sprala zaostala količina enzima i jedinjenja. Spot testom je utvrđeno da li je u vodenom rastvoru prisutan lizozim.

Rasoljavanje supernatanata je izvršeno dijalizom. Korišćena su creva za dijalizu koja su omogućila da lizozim, kao i potencijalno nastali modifikati lizozima, budu oslobođeni svih molekula čija je masa manja od 3000.

### 3.2.7.3. Praćenje interakcija lizozim–hinon

**SDS elektroforeza.** Kako bi se utvrdilo da li je došlo do modifikacije ili umrežavanja lizozima aminokiselinskim derivatima hinona, urađena je SDS elektroforeza. Naime, poznato je da lizozim pored monomerne forme, može da se nalazi i formi dimera. Na SDS elektroforegramu prikazanom na *slici 37* se može videti da se nemodifikovani (nativni) lizozim nalazi samo u obliku monomera što odgovara traci na 14 kDa. Dimerni oblik enzima gotovo da nije detektovan.



Slika 37. SDS-PAGE lizozima (Lys) i modifikacija Lys sa derivatima **136-144** u 20% DMSO

Trake lizozima u slučajevima gde je modifikacija pokušana aminokiselinskim derivatima hinona se nalaze na istim vrednostima mase kao i kod samog enzima. Reprezentativni elektroforegram ne ukazuje na pojavu novih traka ili pojačanja onih koje se odnose na dimernu formu. Evidentno je smanjenje intenziteta traka na 14 kDa, što se može objasniti smanjenjem količine enzima u reakciji sa hinonima usled nastajanja taloga.

Gotovo isti SDS elektroforegrami su dobijeni za sve derivate, pri svim uslovima reakcija modifikacija koji su prethodno navedeni.

Dakle, rezultati na SDS elektroforegramu ukazuju da sintetisani aminokiselinski derivati avarona i *tert*-butilhinona ne modifikuju lizozim, odnosno ne dolazi do kovalentnog vezivanja aminokiselinskih ostataka enzima za hinonski deo ispitivanih derivata.

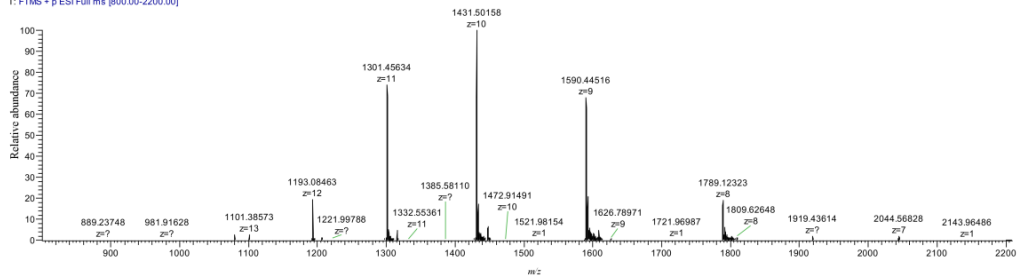
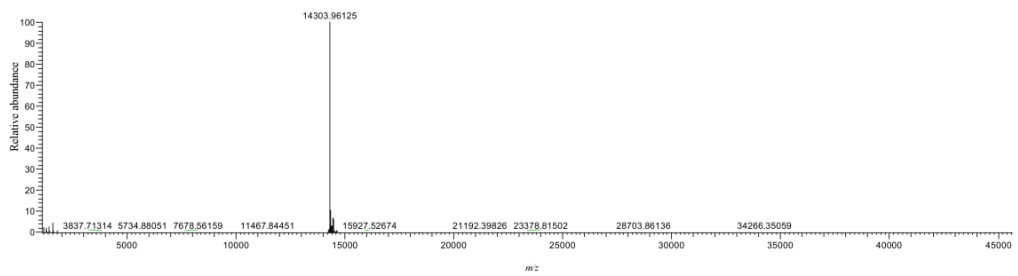
**Masena spektrometrija.** Druga metoda za proveru da li je i u kojoj meri došlo do modifikacije lizozima aminokiselinskim derivatima hinona, bila je masena spektrometrija. Snimljeni su maseni spektri reakcionih smesa nakon isteka 48 h, koliko je bilo vreme trajanja reakcija. Takođe, snimljeni su i spektri lizozima iz vodenih rastvora dobijenih ekstrakcijom nastalih taloga.

U masenom spektru nemodifikovanog lizozima je uočljiv signal na  $m/z$  14303,96125 Da koji odgovara masi enzima (*Slika 38*). Nakon modifikacionih reakcija, u masenim spektrima svih supernatanata i precipitata zapaža se samo signal na  $m/z$  14304,91759 Da, što ukazuje samo na prisustvo lizozima koji očigledno nije modifikovan hinonskim derivatima. Masa lizozima je uvećana za jedan, odnosno za masu jednog atoma vodonika.

Ovim je nedvosmisleno potvrđeno da aminokiselinski derivati avarona i *tert*-butilhinona ne modifikuju lizozim, odnosno da ne dolazi do Michael-ove nukleofilne adicije aminokiselinskih ostataka lizozima za hinonsko jezgro ispitivanih derivata. Ovakvo ponašanja sintetisanih derivata može se objasniti brzim uspostavljanjem tautomerne ravnoteže i, stoga, umanjenim udelom hinonske strukture koja je neophodna za napad proteinskih nukleofila.<sup>139</sup>

A

C:\Xcalibur\data\OB2540\_XT\_00001\_M\_

OB2540 #1-56 RT: 0.01-0.99 Av: 56 NL: 1.20E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [800.00-2200.00]OB2540\_XT\_00001\_M\_#1 RT: 1.00 Av: 1 NL: 3.37E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [800.00-2200.00]

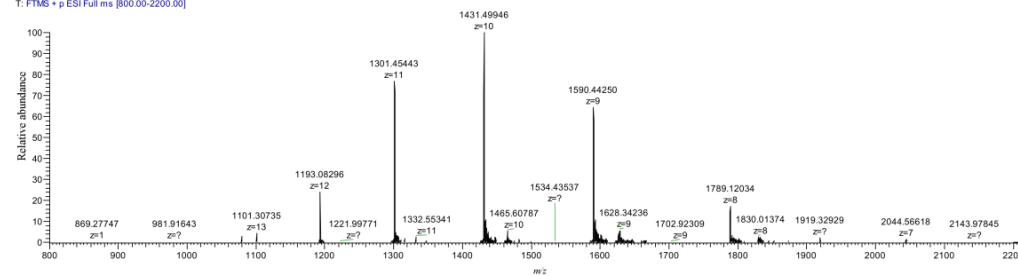
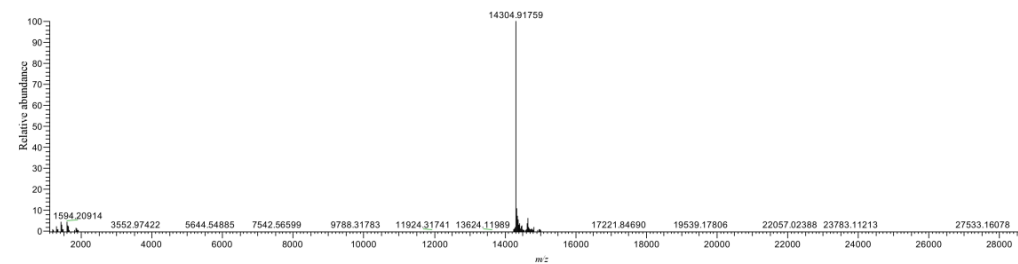
B

C:\Xcalibur\data\OB2541

spray 4.5kV (calibration tune)

OB2541 #1-57 RT: 0.00-1.00 Av: 57 NL: 7.27E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [800.00-2200.00]

Modified lysozyme - 0.1mg/mL in MQ

OB2541\_XT\_00001\_M\_#1 RT: 1.00 Av: 1 NL: 2.05E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [800.00-2200.00]

Slika 38. Maseni spektri lizozima pre i posle dejstva jedinjenja

### 3.2.8. Interakcije derivata sa CT-DNA

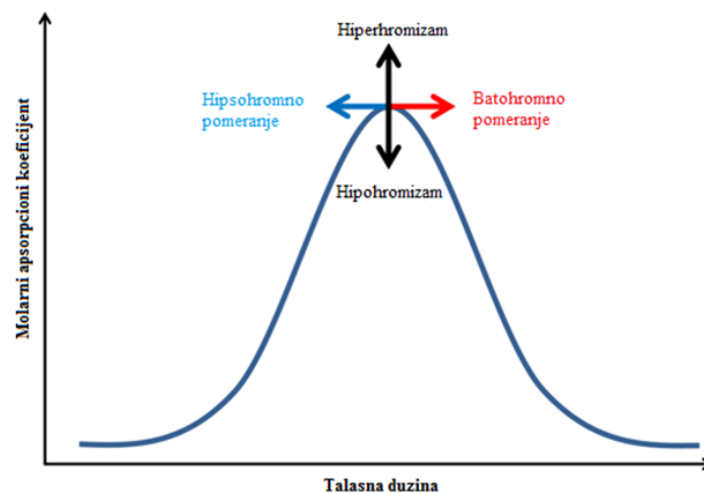
DNA predstavlja glavnu metu na koju deluju različite klase lekova koji se nalaze u kliničkoj praksi za tretman malignih i virusnih oboljenja. Interakcije između DNA i malih molekula mogu biti kovalentne i nekovalentne. Alkilujućí agensi, alkilatori, su jaki elektrofilni koji hemijski reaguju sa nukleofilnim grupama DNA gradeći kovalentnu vezu. Reakcije nukleofilne supstitucije ( $S_N1$  i  $S_N2$  mehanizmi) najčešće se odigravaju na N-7 atomu guanina i N-3 atomu adenina jer su jako nukleofilni i izloženi su u brazdama dvostrukog heliksa DNA. Tri načina na koje mali molekuli nekovalentno interaguju sa DNA su elektrostatičke interakcije, interkalativno vezivanje i vezivanje u brazde. Interkalacija se dešava kada se mali molekul, interkalator (planaran aromatičan/heteroaromatičan), umetne između baznih parova DNA, odnosno kada se postavi normalno u odnosu na dva polimerna lanca DNA bez kovalentnog vezivanja i prekidanja vodoničnih veza između baza. Kao posledica interkalativnog vezivanja molekula dešava se izduživanje dvostrukog lanca DNA za oko 3 Å po vezanom molekulu, te se sprečava proces replikacije i transkripcije usled nemogućnosti delovanja topozomeraza. Interakcije malih molekula sa DNA u maloj i velikoj brazdi ogledaju se u formiranju vodoničnih veza i van der Waals-ovih interakcija bez ikakvih značajnih deformacija dvostrukog heliksa. Molekuli koji se vezuju u malu brazdu DNA obično u svojoj strukturi imaju nekoliko hetrocikličnih ili aromatičnih prstenova koji poseduju slobodu rotacije, što im omogućava da se smeste u prostor male brazde, a što je praćeno istiskivanjem molekula vode. Elektrostatičko vezivanje nastaje usled interakcije između negativno naelektrisanih fosfatnih grupa DNA i pozitivno naelektrisanih krajeva malih molekula.

Zbog brze interkonverzije tautomernih formi sintetisanih derivata i pretpostavljenih teškoća u formiranju kovalentnih veza između derivata i biomolekula, što je dokazano u eksperimentima sa lizozimom, koji sadrži nekoliko veoma nukleofilnih lizinskih ostataka, fokus daljeg rada je usmeren na ispitivanje navedenih nekovalentnih interakcija.

### 3.2.8.1. Apsorpcioni spektri

UV/Vis apsorpciona spektroskopija je jedna od najjednostavnijih tehnika za ispitivanje stabilnosti DNA i njenih interakcija sa malim molekulima. Kada mali molekuli interaguju sa DNA, formira se kompleks, što rezultuje promenama u apsorpcionom spektru, u vrednostima apsorbancije i/ili položaju pikova (slika 39).

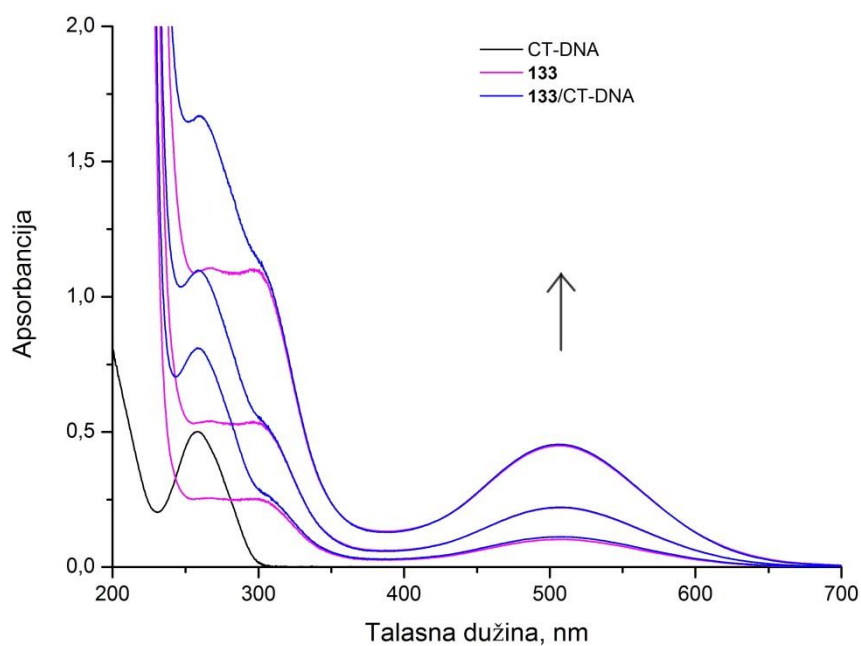
Snimljeni su apsorpcioni spektri samih derivata u različitim koncentracijama, kao i njihovi kompleksi nastali usled interakcija sa CT-DNA. Svaka promena u trakama odgovara nastajanju kompleksa. Interakcije malih molekula i DNA su takođe praćene proučavanjem promena u apsorpcionom spektru DNA. Naši eksperimenti su koncipirani tako da se fiksnoj koncentraciji DNA dodaju različite koncentracije ispitivanih jedinjenja. Dve glavne osobine spektara sa DNA jesu hiperhromni i hipohromni efekat, koji nastaju usled promena u konformaciji i strukturi dvostrukog heliksa DNA. Prilikom interakcija sa malim molekulima, destabilizacija sekundarne strukture DNA dovodi do pojave hiperhromizma, dok stabilizacija sekundarne strukture, bilo elektrostatičkim efektima ili interkalacijom, rezultuje pojavom hipohromizma. Nakon interakcija DNA sa molekulima male molekulske mase, u apsorpcionim spektrima nastalih kompleksa može doći do pomeranja maksimuma apsorpcionih traka ka višim vrednostima talasnih dužina što se označava kao batohromni efekat, tj. 'crveno pomeranje' usled pomeranja ka crvenom delu spektra, ili do pomeranja  $\lambda_{\max}$  ka nižim vrednostima, prema plavom delu spektra, što se označava kao hipsokromni efekat, odnosno 'plavo pomeranje'.



Slika 39. Moguće promene u apsorpcionom spektru DNA (izvor: ref <sup>140</sup>)

U slučajevima kada dolazi do tipične interkalacije malih molekula u DNA, javljaju se hipohromizam (>35%) i batohromni efekat (>15 nm), dok je prilikom vezivanja molekula u brazde DNA crveno pomeranje znatno slabije izraženo (6–8 nm) ili uopšte ne postoji.

Reprezentativni UV apsorpcioni spektar fenilalaninskog derivata avarona **133** je prikazan na slici 40.



Slika 40. UV–Vis apsorpcioni spektar jedinjenja **133** (50, 100 i 200  $\mu\text{M}$ , od dna prema vrhu) pre i posle interakcija sa CT-DNA (100  $\mu\text{M}$ )

U apsorpcionim spektrima aminokiselinskih derivata avarona, apsorpcioni maksimumi samih derivata se nalaze u opsegu od 290–310 nm. Apсорpcioni spektri kompleksa nastalih dejstvom aminokiselinskih derivata avarona na CT-DNA ukazuju na pojavu hiperhromizma. Takođe je uočljivo da dolazi do pomeranja apсорpcionih maksimuma nastalih kompleksa ka višim talasnim dužinama, tj. batohromnog efekta, u poređenju sa maksimumom CT-DNA.



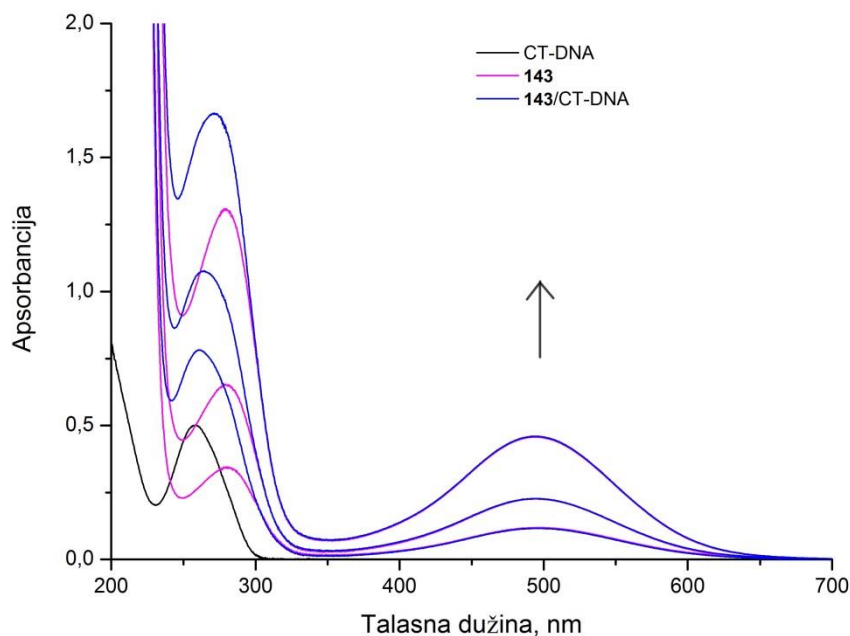
U tabeli 11 su prikazane procentualne vrednosti hiperhromizma koje nastaju tom prilikom.

Tabela 11. Hiperhromizam indukovani derivatima avarona **126–134** koncentracije 50  $\mu\text{M}$ . Procenti su izračunati pomoću jednačine  $100(A_{\text{DNA+D}} - A_{\text{DNA}} - A_{\text{D}}) / A_{\text{DNA+D}}$ , gde se  $A_{\text{DNA}}$ ,  $A_{\text{D}}$  i  $A_{\text{DNA+D}}$  odnose na vrednosti apsorbancije CT-DNA, derivata u 50  $\mu\text{M}$  rastvoru i kompleksa CT-DNA–derivat, redom, na 260 nm

	<b>126</b>	<b>127</b>	<b>128</b>	<b>129</b>	<b>130</b>	<b>131</b>	<b>132</b>	<b>133</b>	<b>134</b>
%	22,19	9,37	6,98	9,72	3,20	27,42	22,18	6,89	10,32

Iz datih rezultata se može zapaziti da metioninski (**131**), a potom glicinski (**126**) i prolinski (**132**) derivati izazivaju najveće povećanje apsorbancije usled interakcija sa CT-DNA. Primetno je da derivati avarona sa nepolarnijim i aromatičnim aminokiselinama dovode do barem dvostruko nižeg porasta apsorbancije u poređenju sa prethodno pomenutim derivatima.

Apsorpcioni spektri aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona pokazuju apsorpcione maksimume u opsegu od 276–283 nm. Reprezentativni spektar fenilalaninskog derivata (**143**) je prikazan na slici 41.



Slika 41. UV–Vis apsorpcioni spektar jedinjenja **143** (50, 100 i 200  $\mu\text{M}$ , od dna prema vrhu) pre i posle interakcija sa CT-DNA (100  $\mu\text{M}$ )

Prilikom interakcija derivata sa CT-DNA, u apsorpcionim spektrima se uočava pojava hiperhromizma, koji opet jasno ukazuje na to da postoje interakcije između derivata i CT-DNA. U poređenju sa spektrom CT-DNA, u svim apsorpcionim spektrima, osim u onima sa prolinskim derivatom **141**, uočljiva je pojava batohromnog efekta.

Procenat hiperhromizma izazvanog ispitivanim jedinjenjima je prikazan u *tabeli 12*.

*Tabela 12.* Hiperhromizam indukovao derivatima *tert*-butilhinona **136–144** koncentracije 50  $\mu$ M. Procenti su izračunati pomoću jednačine  $100(A_{\text{DNA+D}} - A_{\text{DNA}} - A_{\text{D}}) / A_{\text{DNA+D}}$ , gde se  $A_{\text{DNA}}$ ,  $A_{\text{D}}$  i  $A_{\text{DNA+D}}$  odnose na vrednosti apsorbanije CT-DNA, derivata u 50  $\mu$ M rastvoru i kompleksa CT-DNA–derivat, redom, na 260 nm

Jed.	<b>136</b>	<b>137</b>	<b>138</b>	<b>139</b>	<b>140</b>	<b>141</b>	<b>142</b>	<b>143</b>	<b>144</b>
%	26,71	8,55	5,18	8,04	1,12	27,68	16,37	2,20	7,03

Iz prikazanih podataka se može videti da opet isti aminokiselinski ostaci, ovaj put kao bočni nizovi *tert*-butilhinonskih derivata, izazivaju najviše povišenje intenziteta apsorbanije.

S obzirom na to da je u apsorpcionim spektrima aminokiselinskih derivata hinona prisutno pomeranje ka crvenom delu spektra praćeno pojavom hiperhromizma, može se zaljučiti da derivati interaguju sa dvostrukim lancem CT-DNA preko nekovalentnih interakcija,<sup>141</sup> i to pre vezivanjem u brazde i/ili elektrostatičkim interakcijama nego interkalacijom.

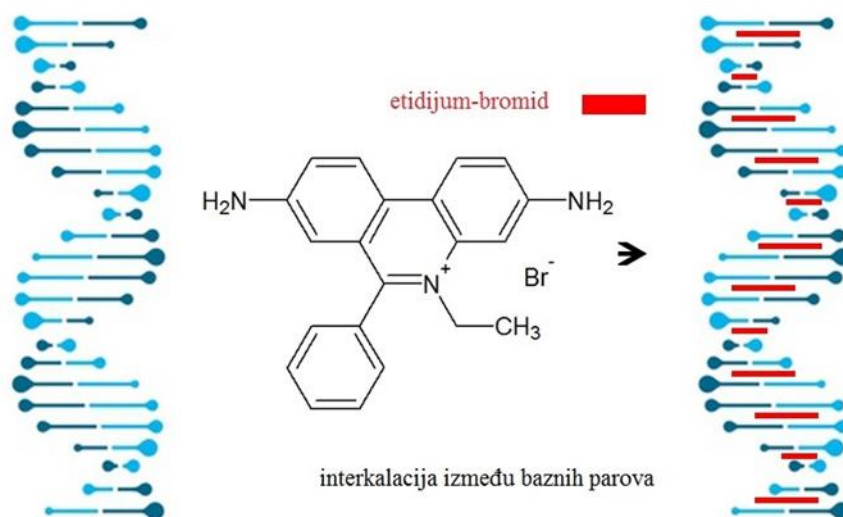
### 3.2.8.2. Fluorescentni spektri

Fluorescentna spektroskopija je tehnika koja je našla široku primenu u ispitivanju interakcija malih molekula sa DNA.

U cilju daljeg ispitivanja načina vezivanja dobijenih derivata za CT-DNA, u eksperimentima su korišćene dve fluorescentne boje različitog načina vezivanja za DNA: etidijum-bromid, koji je opštepoznati interkalator, i Hoechst 33258 koji se vezuje u malu brazdu dvostrukog heliksa DNA.

## a) Etidijum-bromid

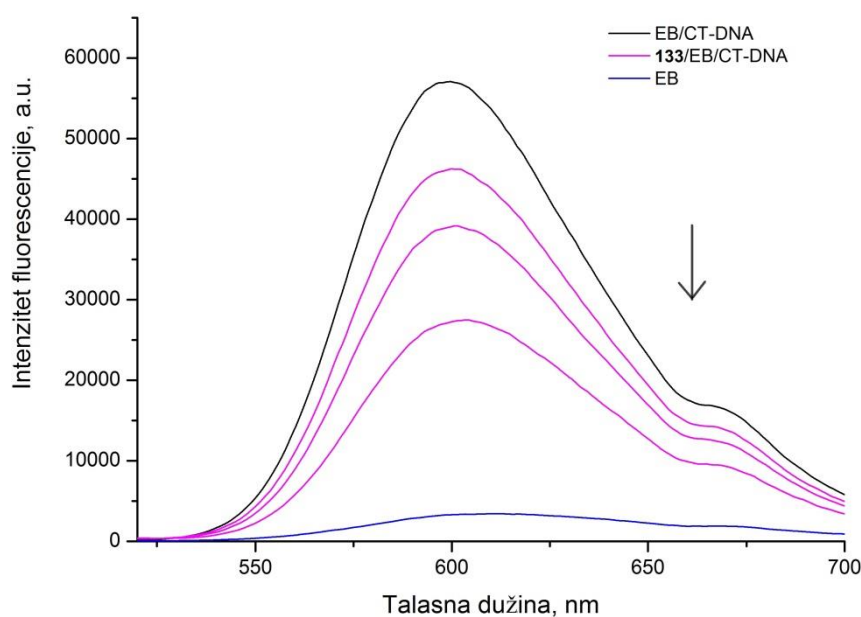
Etidijum-bromid (EB) spada među najosetljivije fluorescentne molekule. Zahvaljujući svojoj planarnoj strukturi, jedinjenje se umeće između baznih parova DNA, odnosno interkalira (*slika 42*).



*Slika 42.* Interkalacija etidijum-bromida u DNA (izvor: ref<sup>142</sup>)

Intenzitet fluorescencije EB značajno raste kada se ovo jedinjenje interkalira među bazne parove DNA. Svako jedinjenje koje na isti način interaguje sa molekulom DNA, kada dođe u dodir sa kompleksom EB–DNA, istiskuje molekule EB i smanjuje intenzitet fluorescencije srazmerno obimu interkalacije u dvostruki heliks DNA.

Tokom eksperimenata u kojima je ispitana mogućnost aminokiselinskih derivata da smanjuju intenzitet fluorescencije EB u kompleksu EB–DNA, vezivanje EB za DNA praćeno je ekscitacijom na 500 nm sa maksimumom fluorescencije na 600 nm. Rezultat sposobnosti reprezentativnog fenilalaninskog derivata avarona (**133**) da istiskuje EB iz molekula CT-DNA je prikazan na *slici 43*.



*Slika 43.* Istiskivanje etidijum-bromida vezanog za CT-DNA dejstvom derivata **133**: emisioni spektar samog EB (donja linija), EB vezan za CT-DNA (gornja linija) i gašenje fluorescencije EB–CT-DNA sistema derivatom **133** (50, 100 and 200  $\mu\text{M}$  rastvor, od vrha ka naniže).

Aminokiselinski derivati avarona značajno smanjuju intenzitet fluorescencije. Procenat smanjenja fluorescencije EB–CT-DNA kompleksa je prikazan u *tabeli 13*.

*Tabela 13.* Smanjenje fluorescencije kompleksa EB–CT-DNA nakon dodatka derivata avarona **126–134** (200  $\mu\text{M}$  rastvor).

Procenat smanjenja je izračunat korišćenjem jednačine

$100(I_{\text{FDNA+EB}} - I_{\text{FDNA+EB+D}} - I_{\text{FEB}}) / I_{\text{FDNA+EB}}$ , gde se

$I_{\text{FDNA+EB}}$ ,  $I_{\text{FDNA+EB+D}}$  i  $I_{\text{FEB}}$  odnose na intenzitet fluorescencije

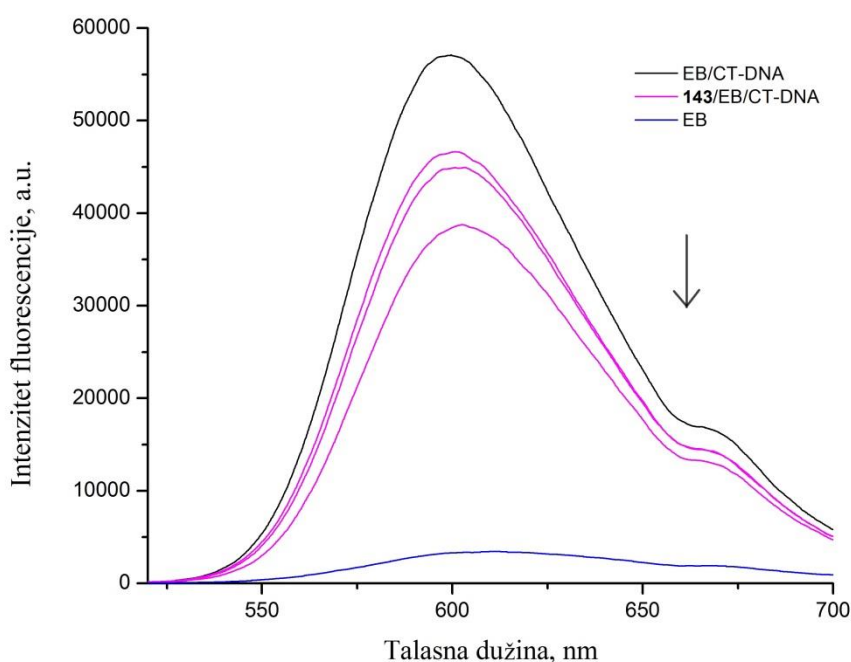
kompleksa EB–DNA, EB–DNA–derivat i EB, redom, na 600 nm

Jed.	<b>126</b>	<b>127</b>	<b>128</b>	<b>129</b>	<b>130</b>	<b>131</b>	<b>132</b>	<b>133</b>	<b>134</b>
%	19,63	31,72	31,72	42,97	28,00	17,50	23,07	46,39	42,50

Najveći stepen smanjenja intenziteta fluorescencije uočen je kod fenilalaninskog (**133**) i triptofanskog (**134**) derivata, što se može pripisati njihovom aromatičnom delu strukture, fenilnoj i indolnoj grupi. Pokazano je da D-valinski derivat avarona (**129**) takođe značajno utiče na interkalaciju EB za DNA. U ovom slučaju se aktivnost ne

može pripisati razgranatom lancu aminokiseline jer rezultati nisu u skladu sa ostalim derivatima sa nepolarnim razgranatim bočnim nizom.

Aminokiselinski derivati *tert*-butilhinona takođe smanjuju intenzitet fluorescencije EB sa povećanjem koncentracije. Na reprezentativnom spektru fenilalaninskog detivata (**143**) se vidi kako njegovo prisustvo utiče na EB–CT-DNA kompleks (slika 44).



Slika 44. Istiskivanje etidijum-bromida vezanog za CT-DNA dejstvom derivata **143**: emisioni spektar samog EB (donja linija), EB vezan za CT-DNA (gornja linija) i gašenje fluorescencije EB–CT-DNA sistema derivatom **143** (50, 100 and 200  $\mu$ M rastvor, od vrha ka naniže).

U tabeli 14 su prikazani rezultati kompetitivnog dejstva derivata *tert*-butilhinona na sistem EB–CT-DNA.

*Tabela 14.* Smanjenje fluorescencije kompleksa EB–CT-DNA nakon dodatka derivata *tert*-butilhinona **136–144** (200  $\mu$ M rastvor). Procenat smanjenja je izračunat korišćenjem jednačine  $100(I_{FDNA+EB} - I_{FDNA+EB+D} - I_{FEB}) / I_{FDNA+EB}$ , gde se  $I_{FDNA+EB}$ ,  $I_{FDNA+EB+D}$  i  $I_{FEB}$  odnose na intenzitet fluorescencije kompleksa EB–DNA, EB–DNA–derivat i EB, redom, na 600 nm

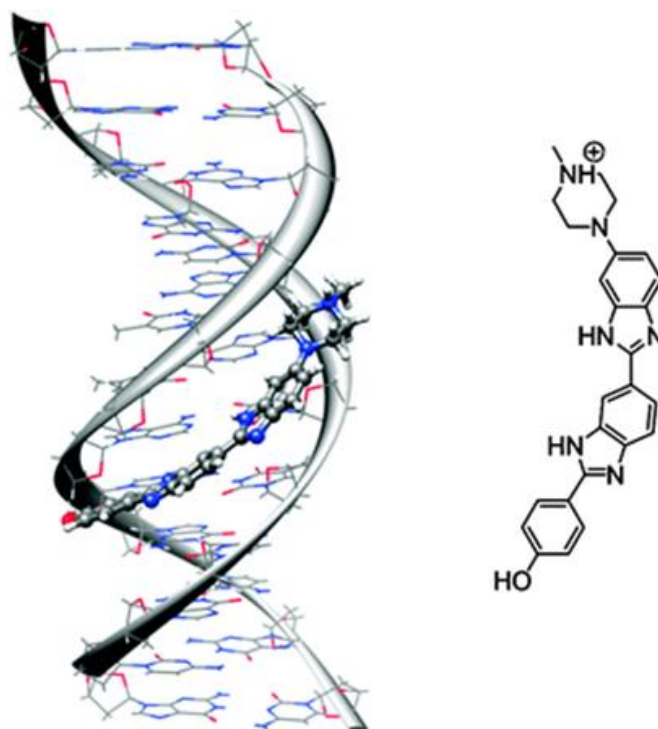
Jed.	<b>136</b>	<b>137</b>	<b>138</b>	<b>139</b>	<b>140</b>	<b>141</b>	<b>142</b>	<b>143</b>	<b>144</b>
%	21,80	23,87	17,85	29,86	19,74	6,59	20,29	26,79	22,64

Najveće smanjenje intenziteta fluorescencije je zabeleženo za alaninski (**137**), D-valinski (**139**), fenilalaninski (**143**) i triptofanski (**144**) derivat, pri njihovim najvišim koncentracijama. Fluorescentni spektar prolinskog derivata (**141**) prikazuje najmanje smanjenje intenziteta fluorescencije, što je u saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima efekta prolina na istiskivanje DNA-vezanog EB gde je pokazano da prolin slabije interkalira u poređenju sa drugim aminokiselinama.<sup>143</sup>

Prema rezultatima i strukturnim razlikama između najaktivnijih derivata, može se zaključiti da derivati interaguju sa DNA, što dovodi do smanjenja intenziteta fluorescencije, ali se rezultati ne mogu smatrati dokazima kojima se potvrđuje interkalacija derivata, posebno s obzirom na to da su UV spektri pokazali hiperhromizam, a ne hipohromizam. Pregledom literature je potvrđeno da se može javiti indirektno istiskivanje boje ukoliko jedinjenja indukuju strukturne promene u DNA i na taj način se smanjuje afinitet vezivanja za EB.<sup>144</sup>

#### **b) Hoechst 33258**

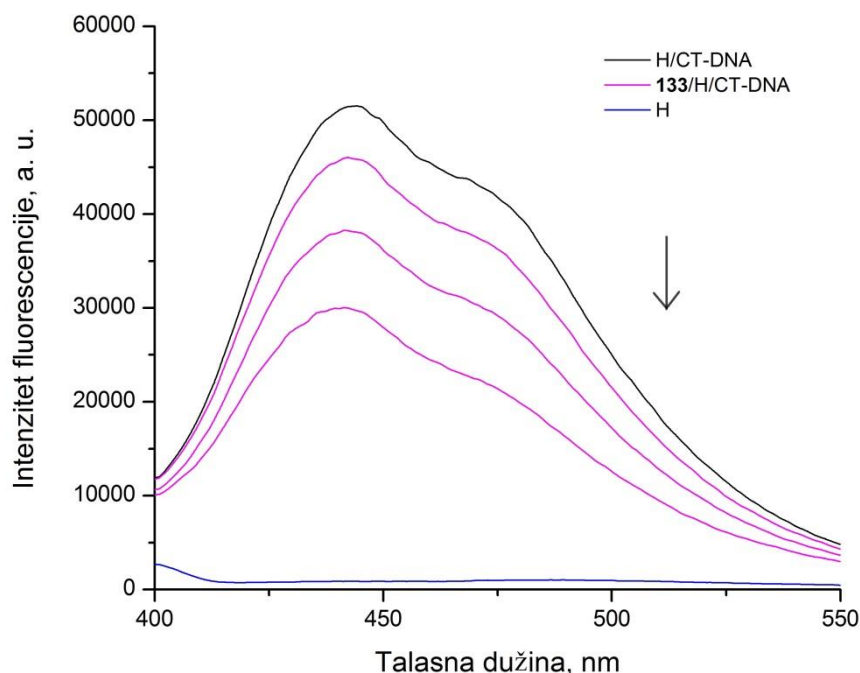
Hoechst 33258 (H) je fluorescentna boja koja se vezuje u malu brazdu dvostrukog heliksa DNA i specifična je za A–T sekvence (*slika 45*). Sama boja u vodenom rastvoru produkuje veoma mali intenzitet fluorescencije. Kada je H u interakciji sa DNA, jačina fluorescencije značajno raste. Mali molekuli koji se vezuju za DNA na isti način kao H, odnosno u malu brazdu, imaju sposobnost da istiskuju molekule boje iz male brazde, što rezultuje smanjenjem intenziteta fluorescencije u poređenju sa sistemom Hoechst–DNA.



Slika 45. Veživanje Hoechst-a u malu brazdu DNA (Izvor: ref <sup>145</sup>)

U cilju daljeg ispitivanja načina veživanja aminokiselinskih derivata za DNA, urađeni su eksperimenti u kojima je ispitana sposobnost derivata da istisnu H iz male brazde.

Veživanje Hoechst 33258 za DNA praćeno je ekscitacijom na 350 nm sa maksimumom fluorescencije na 444 nm. Spektar fenilalaninskog derivata avarona (**133**) je prikazan na slici 46.



Slika 46. Istiskivanje Hoechst 33258 vezanog za CT-DNA dejstvom derivata **133**: emisioni spektar samog H (donja linija), H vezan za CT-DNA (gornja linija) i gašenje fluorescencije H–CT-DNA sistema derivatom **133** (50, 100 and 200  $\mu\text{M}$  rastvor, od vrha ka naniže).

Procenti smanjenja intenziteta fluorescencije kompleksa H–DNA aminokiselinskim derivatima avarona su prikazani u tabeli 15.

Tabela 15. Smanjenje fluorescencije kompleksa H–CT-DNA nakon dodatka derivata avarona **126–134** (200  $\mu\text{M}$  rastvor).

Procenat smanjenja je izračunat korišćenjem jednačine

$100(I_{FDNA+H} - I_{FDNA+H+D} - I_{FH}) / I_{FDNA+H}$ , gde se

$I_{FDNA+H}$ ,  $I_{FDNA+H+D}$  i  $I_{FH}$  odnose na intenzitet fluorescencije kompleksa H–DNA, H–DNA–derivat i H, redom, na 444 nm

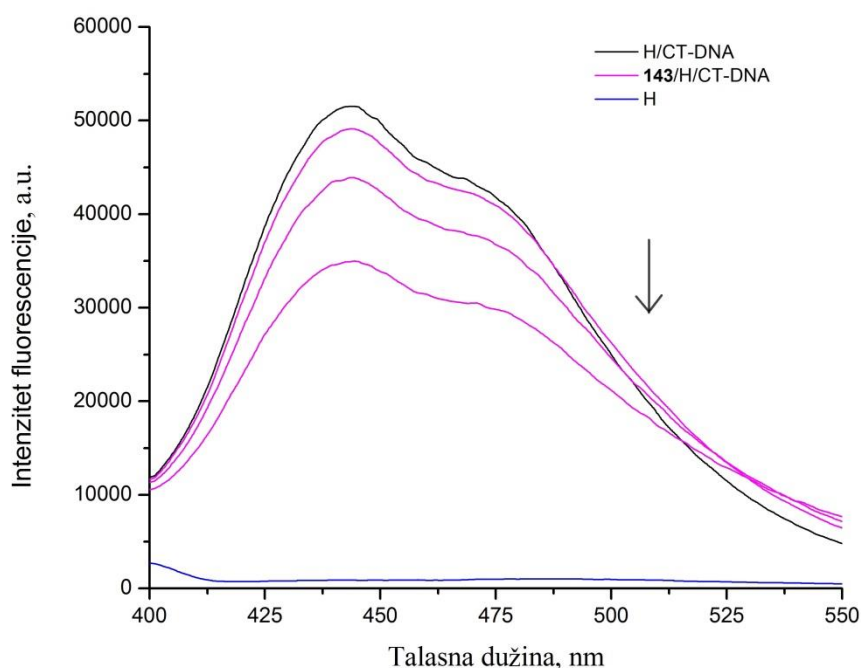
Jed.	<b>126</b>	<b>127</b>	<b>128</b>	<b>129</b>	<b>130</b>	<b>131</b>	<b>132</b>	<b>133</b>	<b>134</b>
%	9,15	31,85	30,37	24,46	38,69	6,81	26,76	40,54	22,77

Iz priloženih rezultata se može videti da svi derivati avarona u manjoj ili većoj meri istiskuju H iz male brazde. Najveći procenat smanjenja intenziteta fluorescencije kompleksa H–DNA je zabeležen dejstvom fenilalaninskog (**133**), a potom leucinskog



(**130**) i alaninskog (**127**) derivata. Ipak, nije moguće izvesti precizniji zaključak o odnosu struktura–aktivnost ako se uzmu u obzir rezultati citotoksičnih ispitivanja aminokiselinskih derivata avarona.

Intenzitet fluorescencije na 444 nm kompleksa H–DNA opada sa povećanjem koncentracije većine aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona, što ukazuje na vezivanje derivata u malu brazdu (slika 47, tabela 16).



Slika 47. Istiskivanje Hoechst 33258 vezanog za CT-DNA dejstvom derivata **143**: emisioni spektar samog H (donja linija), H vezan za CT-DNA (gornja linija) i gašenje fluorescencije H–CT-DNA sistema derivatom **143** (50, 100 and 200  $\mu$ M rastvor, od vrha ka naniže).

Tabela 16. Smanjenje fluorescencije kompleksa H–CT-DNA nakon dodatka derivata *tert*-butilhinona **136–144** (200  $\mu$ M rastvor).

Procenat smanjenja je izračunat korišćenjem jednačine  $100(I_{FDNA+H} - I_{FDNA+H+D} - I_{FH}) / I_{FDNA+H}$ , gde se  $I_{FDNA+H}$ ,  $I_{FDNA+H+D}$  i  $I_{FH}$  odnose na intenzitet fluorescencije kompleksa H–DNA, H–DNA–derivat i H, redom, na 444 nm

Jed.	<b>136</b>	<b>137</b>	<b>138</b>	<b>139</b>	<b>140</b>	<b>141</b>	<b>142</b>	<b>143</b>	<b>144</b>
%	–25,55	19,52	35,83	23,76	–5,50	–37,92	31,16	30,44	33,89

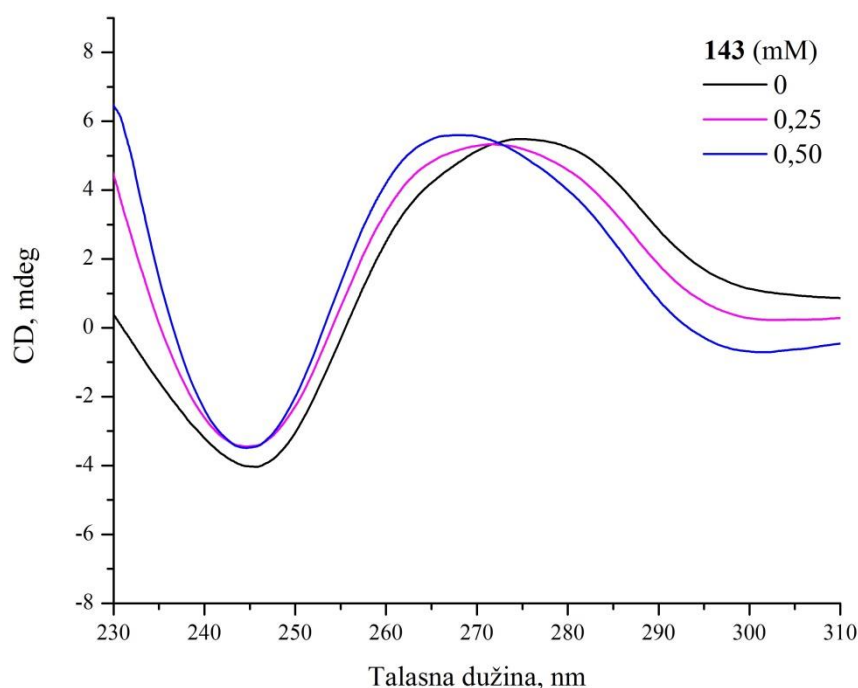
Antitumorska aktivnost jedinjenja se može dovesti u korelaciju sa vezivanjem u malu brazdu. Tri derivata (**136**, **140** i **141**) koja ne istiskuju H iz kompleksa spadaju među najslabije aktivne derivate, sa  $IC_{50}$  vrednostima iznad 30  $\mu$ M prema svim testiranim ćelijama kancera. Pomenuta jedinjenja indukuju povećanje intenziteta fluorescencije kompleksa H–DNA. Moguće objašnjenje za ovu pojavu može da bude formiranje ternarnog kompleksa DNA–boja–hinon. U literaturi je takvo ponašanje zabeleženo za argininamid sa oligonukleotidnim aptamerom.<sup>146</sup> Ovo spoljašnje vezivanje jedinjenja **136** i **141** indukuje visok hiperhromizam u UV/Vis spektrima, dok je vezivanje leucinskog derivata **140** slabo zbog voluminoznosti izobutil grupe.

### 3.2.8.3. Cirkularni dihroizam

Spektroskopija cirkularnog dihroizma (CD) je veoma osetljiva na promene u sekundarnoj strukturi biomakromolekula. Tehnika je široko zastupljena u praćenju promena u sekundarnoj strukturi DNA koje su nastale kao posledica interakcija sa malim molekulima, i nekovalentnih interakcija DNA–ligand, što rezultuje izmenjenim osobinama CD-spektara.

U CD-spektru CT-DNA uočljiv je pozitivan trbuh oko 275 nm zbog naleganja baza (“base stacking“) i negativan trbuh oko 245 nm zbog desne spiralnosti forme B-DNA. Ukoliko se mali molekul interkalira u molekul DNA, uočavaju se značajne promene u intenzitetu oba trbuha usled stabilizacije desno orijentisanog B oblika DNA. Molekuli koji interakciju sa CT-DNA ostvaruju u maloj brazdi ili elektrostatički pokazuju vrlo male ili nikakve promene u spektru.

Na *slici 48* je prikazan reprezentativan CD-spektar jedinjenja **143** nakon interakcija sa CT-DNA. Uočljivo je da ne postoje značajne promene u izgledu krive CT-DNA posle interakcija sa različitim koncentracijama izabranog derivata.



Slika 48. CD spektar CT-DNA (0,50 mM) u bikarbonatnom rastvoru (40 mM, pH 8,4) sa različitim koncentracijama jedinjenja **143**.

Izgled CD-spektra potvrđuje da se aminokiselinski derivati hinona vezuju za molekul DNA u maloj brazdi, i da ne interkaliraju u makromolekul.

### 3.2.9. Molekulsko modelovanje

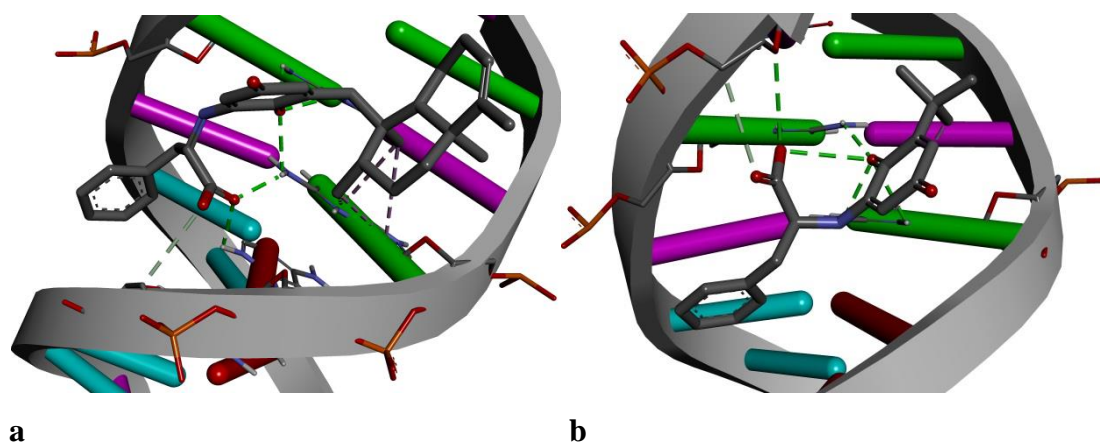
Molekulsko modelovanje je izuzetno pogodno za sticanje uvida u interakcije između malih molekula i ciljnih makromolekula, kao što su proteini ili DNA. Posebno je korisno za potvrđivanje eksperimentalnih rezultata i razumevanje mehanizama interakcija.

Kako bi bili potvrđeni eksperimentalni rezultati koji su ukazali da se aminokiselinski derivati avarona i *tert*-butilhinona vezuju u malu brazdu DNA, pristupljeno je molekulskom modelovanju.

Molekulsko modelovanje aminokiselinskih derivata avarona i *tert*-butilhinona je ispitano korišćenjem 3D DNA sekvencije d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (PBD ID:3U2N) preuzete iz banke podataka. Najpre su uklonjeni svi molekuli vode iz DNA. Potom su

strukture derivata učinjene fleksibilnim kako bi se postigle različite konformacije i orijentacije liganada. Na taj način se došlo do energetski najpovoljnijih konformacija modelovanih struktura koje su naknadno podvrgnute analizi.

Slika 49 jasno ukazuje da se aminokiselinski derivati avarona i *tert*-butilhinona uklapaju u zakrivljene konture male brazde DNA. Ustanovljene interakcije između derivata i baznih parova dodekamera su uglavnom vodonične veze, sa nekoliko ugljenik–vodonik veza i  $\pi$ -alkil interakcija.



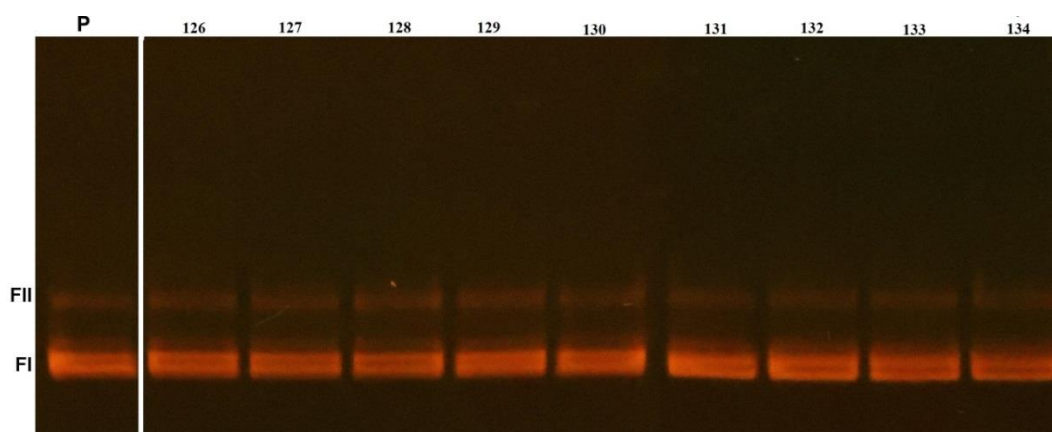
Slika 49. Vezivanje fenilalaninskih derivata avarona (a) i *tert*-butilhinona (b) u malu brazdu DNA

### 3.2.10. Interakcije derivata sa plazmidom pUC19

U prethodnim radovima proisteklim iz naših laboratorija je utvrđeno da neki derivati avarona i *tert*-butilhinona cepaju plazmide DNA.

Kako bi se utvrdilo da li je isti slučaj i sa aminokiselinskim derivatima ovih hinona, ispitana je sposobnost obe grupe sintetisanih derivata da izazivaju prekide nizova nukleinske kiseline. Za model sistem je izabran plazmid pUC19 izolovan iz *Escherichia coli*. Čini ga superuvijena DNA građena od 2686 baznih parova.

Interakcije aminokiselinskih derivata avarona i *tert*-butilhinona sa plazmidom pUC19 su praćene elektroforezom na agaroznom gelu.



Slika 50. Elektroforetski prikaz plazmida pUC19 bez (P) i u prisustvu derivata **126–134** (1 mM)

Kako što se može videti na slici 50, nisu zabeležene transformacije na plazmidu pUC19. Takođe, nije došlo ni do gašenja fluorescencije etidijum-bromida pod dejstvom sintetisanih derivata. I dalje su prisutne superuvijena forma plazmida FI, kao i mnogo manje intenzivna otvorena cirkularna forma FII, tj. nije došlo do transformacije FI i stvaranja dodatne količine otvorene cirkularne forme FII.

Kao što je već napomenuto, dobijeni rezultati se razlikuju od prethodnih. Capanje DNA molekula hinonima *in vitro* je moguće objasniti prisustvom slobodnih radikala koji dovode do jednolančanog i/ili dvolančanog prekida nizova plazmida. Hinoni imaju sposobnost da generišu kiseonične radikale preko semihinonskih intermedijera koji nastaju ili posle nukleofilnog napada na hinonski ostatak ili posle redukcije, a zatim reoksidacije hidrohinona ili semihinonskog radikala u hinon. Kako aminokiselinski derivati podležu brzom tautomerizaciji, nisu podložni nukleofilnim napadima, pa se izostanak oštećenja plazmida mogao pretpostaviti.

### 3.2.11. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

S obzirom na činjenicu da aminokiselinski derivati avarona i *tert*-butilhinona ne generišu slobodnoradikalske vrste *in vitro*, ispitana je njihova sposobnost da iste hvataju.

U cilju ispitivanja antioksidativne aktivnosti dobijenih jedinjenja, urađen je DPPH test koji koristi stabilni slobodni radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH). Test je baziran na merenju kapaciteta antioksidanta da hvata pomenuti radikal. Azotov atom iz DPPH koji poseduje nespareni elektron redukuje se tako što prima vodonikov atom iz antioksidanta i tako nagrađuje odgovarajući hidrazin. DPPH je stabilan slobodni radikal zahvaljujući delokalizaciji nesparenih elektrona iz molekula, tako da se molekuli ne dimerizuju kao većina slobodnih radikala. Delokalizacija dovodi i do pojave jake ljubičaste boje samog rastvora slobodnog radikala DPPH. Pod dejstvom redukujućih agenasa, dolazi do nastajanja redukovane forme DPPH, te slabljenja ili potpunog gubitka ljubičaste boje što zavisi od količine slobodnog radikala DPPH koja je zaostala. Stepem promene boje prati se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 517 nm.

Tabela 17. Antioksidativna aktivnost aminokiselinskih derivate

Jed.	IC <sub>50</sub> (mM)	Jed.	IC <sub>50</sub> (mM)
15	0,51	135	0,68
<b>126</b>	<b>0,07</b>	136	1,57
127	0,74	137	2,87
128	0,70	138	1,25
129	2,22	139	8,89
130	0,47	140	1,27
131	0,27	<b>141</b>	<b>0,34</b>
132	0,67	142	1,37
133	0,66	143	1,02
134	0,71	144	2,37
askorbinska kiselina	0,07	askorbinska kiselina	0.07

Analizom dobijenih rezultata predstavljenih u *tabeli 17*, može se zaključiti da početna jedinjenja, **15** i **135**, i njihovi derivati pokazuju neujednačene antioksidativne aktivnosti u poređenju sa standardnim antioksidativnim jedinjenjem, askorbinskom kiselinom.

Glicinski derivat avarona **126** je pokazao izuzetnu aktivnost sa vrednosti  $IC_{50}$  koja je istovetna vrednosti za vitamin C. Ostali avaronski derivati su pokazali antioksidativnu aktivnost sličnu samom avaronu. Svi derivati *tert*-butilhinona su imali slabiju antioksidativnu aktivnost od osnovnog jedinjenja, sa izuzetkom prolinskog derivata **141** koji je imao dvostruko nižu vrednost  $IC_{50}$ . Prolinski derivat avarona je takođe pokazao dvaput jaču aktivnost nego sam avaron. Ovakvi rezultati prolinskih derivata se mogu pripisati činjenici da se prisustvo aminokiseline prolina generalno dovodi u korelaciju sa dobrom antioksidativnom aktivnošću.<sup>147</sup>

Ovakve aktivnosti sintetisanih derivata se mogu pripisati aminokiselinskom delu molekula. Aminokiseline mogu reagovati sa DPPH radikalom na dva načina; u procesu oksidativne dekarboksilacije koja je inicirana uzimanjem vodonika iz karboksilne grupe, ili oksidativnog deaminovanja, gde se apstrahuje vodonik sa NH grupe.<sup>148</sup> Na osnovu rezultata koji su izloženi, može se zaključiti da ne postoje jasne pravilnosti u odnosu struktura–aktivnost i da se oksidativna dekarboksilacija može smatrati glavnim reakcionim putem ove serije jedinjenja, budući da je prolinski derivat jako aktivan.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

Temperature topljena su određene na aparatu Boetius PHMK, VEB Analytic, Dresden, Germany, i nisu korigovane.

Vrednosti optičke rotacija su izmerene na polarimetru Rudolph research analytical, Autopol IV, na sobnoj temperaturi.

IR spektri su snimljeni na Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR (Smart orbit) spektrofotometru, a položaj traka je dat u  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR Spektri su snimljeni na instrumentu Varian Gemini 2000 na 200 MHz, dok su  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni na istom aparatu na 50 MHz u deuterisanom metanolu uz tetrametil-silan kao interni standard. Hemijska pomeranja ( $\delta$ -skala) su izražena u ppm vrednostima, dok su konstante kuplovanja  $J$  date u Hz. Multiplicitet signala je označen kao s (singlet), brs (prošireni singlet), d (dublet), dd (dublet dubleta) i m (multiplet).

Maseni spektri visoke rezolucije su snimljeni na spektrometru Agilent 6210 Time of Flight LC-MS system u pozitivnom jon-modu. Uzorci su rastvarani u metanolu HPLC čistoće.

Ciklični voltamogrami su snimljeni na potenciostatu CHI 760B, Austin, TX, USA.

UV/Vis spektri su snimljeni na spektrofotometru GBC Cintra 40 i LLG Labware LLG-uniSPEC 2.

Fuorescentni spektri su snimljeni na Thermo Fisher Scientific Lumina fluorescentnom spektrometru.

CD Spektri su snimljeni na Jasco J-815 cirkularni dihiroizam spektropolarimetru.

Tok reakcija je praćen tankoslojnom hromatografijom (TLC) na aluminijumskim folijama Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> (Merck), uz korišćenje UV-svetla za vizuelizaciju.

Hromatografska prečišćavanja su rađena primenom (i) gravitacione hromatografije (Kieselgel 60, 0,063-0,200, E. Merck), (ii) 'dry-flash' hromatografije (Kieselgel 60, 0,040-0,063, E. Merck), (iii) "low bar"-a (Kieselgel 60, 0,040-0,063, E. Merck), (iv) tankoslojne preparativne hromatografije na pločama (20 x 20 cm) na koje se kao stacionarna faza nanosi Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> (1 mm).



Ekstrakti su sušeni iznad anhidrovaniog natrijum-sulfatom.

Organski rastvarači su sveže predestilovani pre upotrebe.

Uparavanje rastvarača je vršeno na rotacionom vakuum uparivaču pri temperaturama vodenog kupatila do 40 °C.

Svi reagensi koji su upotrebljavani prilikom dobijanja derivata su nabavljeni od Sigma Aldrich-a i Merck-a, i nisu dodatno prečišćavani.

#### 4.1. Izolovanje avarola

Avarol je izolovan iz morskog sundera *Dysidea avara*. Sirovi materijal je sakupljen izranjanjem u Bokokotorskom zalivu, Crna Gora.

Svež sunder (3 kg) se homogenizuje u Waring blenderu sa 250 ml etanola. Dobijena masa se ekstrahuje tri puta sa po 500 ml etil-acetata uz mešanje u toku 2 h. Ekstrakti se spoje i isperu tri puta sa po 500 ml vode. Nakon što se organski sloj osuši iznad anhidrovanog natrijum-sulfata, rastvarač se ukloni na vakuum uparivaču. Zaostala tamno braon smolasta masa (48 g) se parcijalno prečišćava primenom hromatografije pod sniženim pritiskom.

Deo ekstrakta (7 g) se rastvori u etil-acetatu, doda se silika gel (20 g), pa potom rastvarač upari. Na prethodno pripremljenu kolonu (dužina 46 cm, 380 g SiO<sub>2</sub>) se postavi 'kolač'. Eluiranje avarola se započinje toluen/EtOAc (95:5, 2 h), a nastavlja toluen/EtOAc (9:1). Silazak jedinjenja je praćen na UV detektoru, na 249 nm i 291 nm.

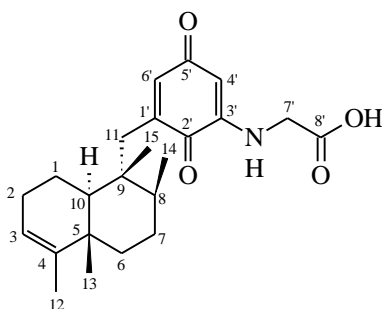
#### 4.2. Dobijanje avarona

Avarol (2 g, 6,36 mmol) se rastvori u 100 ml suvog dietil etra, a potom se lagano, uz mešanje, u malim porcijama dodaje sveže istaložen srebro-oksidi (1,7 g, 7,34 mmol). Smesa se meša tokom 2 h na sobnoj temperaturi, a potom se doda anhidrovani natrijum-sulfat i ostavi preko noći. Talog se odvoji ceđenjem preko infuzorijske zemlje (Kieselguhr) i dodatno ispere dietil etrom (3 x 10 ml). Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Žuta uljasta masa (1,85 g) se prečisti hromatografijom na koloni (20 g silikagela, 0,063-0,200 mm), sa toluenom kao eluentom. Odgovarajuće frakcije se upare i dobiju se žuti kristali avarona (1,676 g, 84,3%).

### 4.3. Sinteze aminokiselinskih derivata avarona

*Opšti postupak za dobijanje aminokiselinskih derivata avarona.* Aminokiselina se rastvori u zasićenom vodenom rastvoru natrijum-hidrogenkarbonata (100 mL), uz dodatak nekoliko kapi 10% rastvora natrijum-hidroksida do pH 10. Smesa se zatim dodaje u porcijama u etanolni rastvor avarona (100 mL). Reakciona smesa se meša određeno vreme na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, etanol se upari, a zaostali deo reakcione smese ekstrahuje etil-acetatom. Organski deo se osuši iznad anhidrovanog natrijum-sulfata, a potom koncentruje na vakuum uparivaču. Sirovi proizvod se prečisti na TLC pločama ili koloni, te rehromatografiše u istom sistemu. Nakon rekristalizacije iz dihlormetana, dobije se čisto jedinjenje.

#### 4.3.1. *N*-[3-[[*(1R,2S,4aS,8aS)*-1,2,3,4,4a,7,8,8a-Oktahidro-1,2,4a,5-tetrametil-1-naftalenil]metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]glicin (**126**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata avarona, jedinjenje **1a** se dobija iz avarona (200 mg, 0,64 mmol) i glicina (240 mg; 3,20 mmol). Reakciona smesa se meša tokom 4,5 h. Proizvod **126** je izolovan nakon dvostruke hromatografije na preparativnim pločama (9:1 CHCl<sub>3</sub>/MeOH) i rekristalizacije, u obliku crvenih kristala (107 mg, 43%).

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **126**:

**tt** 86–88 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -16$  (*c* 0,250 g/L, CH<sub>3</sub>OH); **UV/Vis** (MeOH, nm):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 286 (4,73), 482 (4,20);

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\nu_{\max}$  3457, 3330, 2959, 2930, 2861, 1725, 1673, 1636, 1593, 1457, 1382, 1352, 1262, 1125, 1073, 739;

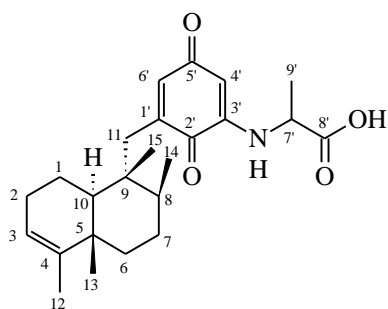
**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  6,33 (d, *J* = 1,6 Hz, 1 H, C6'-H), 5,32 (d, *J* = 1,6 Hz, 1 H, C4'-H), 5,09 (brs, 1 H, C3-H), 3,62 (s, 2 H, C7'-H), 2,57 (d, *J* = 13,4 Hz, 1 H, C11-

H<sub>a</sub>), 2,45 (d,  $J = 13,4$  Hz, 1 H, C11-H<sub>b</sub>), 1,49 (s, 3 H, C12-H), 0,98 (s, 3 H, C13-H), 0,93 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H, C14-H), 0,82 (s, 3 H, C15-H);

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  187,1 (C-5'), 184,5 (C-2'), 174,6 (C-8'), 148,6 (C-3'), 144,9 (C-4), 143,8 (C-1'), 140,8 (C-6'), 121,6 (C-3), 97,6 (C-4'), signal se preklapa sa signalom rastvarača (C-10), 47,0 (C-7'), 43,0 (C-9), 39,4 (C-5), 38,0 (C-8), 37,3 (C-6), 36,1 (C-11), 28,6 (C-7), 27,3 (C-2), 20,5 (C-1), 20,3 (C-13), 18,4 (C-14), 18,1 (C-12), 17,2 (C-15);

HRMS (ESI, MeOH):  $m/e$  386,23150 [M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>4</sub>: 386,23258;  $m/e$  408,21374 [M+Na]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>4</sub>Na: 408,21453.

#### 4.3.2. N-[3-[[*(1R,2S,4aS,8aS)*-1,2,3,4,4a,7,8,8a-oktahidro-1,2,4a,5-tetrametil-1-naftalenil]metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-(*S*)alanin (**127**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata avarona, jedinjenje **127** se dobija iz avarona (200 mg, 0,64 mmol) i L-alanina (179 mg; 2,01 mmol). Rastvor NaOH se ne dodaje. Vreme mešanja smese je 3,5 h. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na koloni (8:2 hloroform/metanol), a potom hromatografijom na TLC pločama u istom sistemu.

Čisto jedinjenje **127** (65 mg, 25%) se izoluje u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **127**:

tt 168–171 °C (dek.);  $[\alpha]_D^{20} = 56$  ( $c$  0,125 g/L, CH<sub>3</sub>OH); UV/Vis (MeOH, nm):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 290 (4,65), 492 (4,26);

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3363, 2960, 2931, 2855, 1670, 1633, 1583, 1498, 1455, 1416, 1358, 1335;

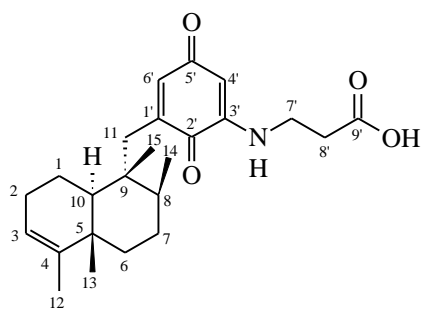
<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  6,24 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H, C6'-H), 5,27 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H, C4'-H), 5,02 (brs, 1 H, C3-H), 3,71 (q,  $J = 6,8$  Hz, 1 H, C7'-H), 2,48 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1 H, C11-H<sub>a</sub>), 2,41 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1 H, C11-H<sub>b</sub>), 1,42 (s, 3 H, C12-H), 1,33 (d,  $J = 6,8$

Hz, 3 H, C9'-H), 0,92 (s, 3 H, C13-H), 0,86 (d,  $J = 6,0$  Hz, 3 H, C14-H), 0,76 (s, 3 H, C15-H);

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  187,2 (C-5'), 184,7 (C-2'), 178,7 (C-8'), 148,1 (C-3'), 145,2 (C-4), 144,0 (C-1'), 140,7 (C-6'), 121,6 (C-3), 97,7 (C-4'), 54,1 (C-7'), signal se preklapa sa signalom rastvarača (C-10), 43,1 (C-9), 39,6 (C-5), 38,0 (C-8), 37,4 (C-6), 36,1 (C-11), 28,6 (C-7), 27,4 (C-2), 20,5 (C-1), 20,4 (C-13), 18,3 (C-14), 18,1 (C-12), 17,3 (C-9'), 17,2 (C-15);

HRMS (MeOH):  $m/e$  400,24715  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{NO}_4$ : 400,24824.

#### 4.3.3. *N*-[3-[[*(1R,2S,4aS,8aS)*-1,2,3,4,4a,7,8,8a-oktahidro-1,2,4a,5-tetrametil-1-naftalenil]metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]β-alanin (**128**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata avarona, jedinjenje **128** se dobija u reakciji avarona (100 mg, 0,32 mmol) i β-alanina (143 mg; 1,61 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na preparativnim TLC pločama (9:1 hloroform/metanol). Dobija se čisto jedinjenje

**128** (43 mg, 34%) u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **128**:

$t_t$  120–122 °C;  $[\alpha]_D^{20} = 64$  ( $c$  0,250 g/L,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); UV/Vis (MeOH, nm):  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 290 (4,75), 490 (4,33);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3386, 2960, 2858, 1671, 1633, 1583, 1513, 1451, 1382, 1254, 1143, 1030;

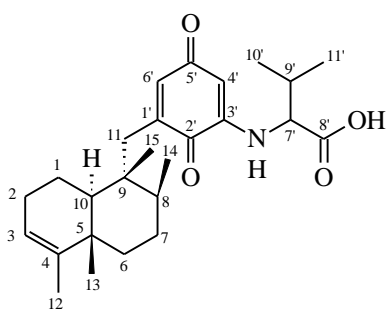
$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6,32 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1 H, C6'-H), 5,46 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1 H, C4'-H), 5,11 (brs, 1 H, C3-H), 3,34 (t,  $J = 5,2$  Hz, 2 H, C7'-H), 2,60 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1 H, C11-H<sub>a</sub>), 2,53 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1 H, C11-H<sub>b</sub>), 2,45 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2 H, C8'-H), 1,51 (s,

3 H, C12-H), 1,00 (s, 3 H, C13-H), 0,93 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H, C14-H), 0,83 (s, 3 H, C15-H);

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  187,1 (C-5'), 184,7 (C-2'), 179,5 (C-9'), 149,4 (C-3'), 145,0 (C-4), 143,9 (C-1'), 140,7 (C-6'), 121,6 (C-3), 97,0 (C-4'), signal se preklapa sa signalom rastvarača (C-10), 43,0 (C-9), 40,8 (C-7'), 39,5 (C-5), 38,1 (C-8), 37,4 (C-6), 36,7 (C-8'), 36,1 (C-11), 28,6 (C-7), 27,4 (C-2), 20,5 (C-1), 20,3 (C-13), 18,3 (C-14), 18,1 (C-12), 17,2 (C-15);

HRMS (MeOH):  $m/z$  400,24846  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{NO}_4$ : 400,24824;  $m/z$  799,48888  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{48}\text{H}_{67}\text{N}_2\text{O}_8$ : 799,48919.

#### 4.3.4. *N*-[3-[[*(1R,2S,4aS,8aS)*-1,2,3,4,4a,7,8,8a-oktahidro-1,2,4a,5-tetrametil-1-naftalenil]metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-(*R*)-valin (**129**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata avarona, jedinjenje **129** se dobija u reakciji avarona (100 mg, 0,32 mmol) i D-valina (113 mg; 0,96 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h na sobnoj temperaturi. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na preparativnim TLC pločama (9:1 toluen/EtOAc). Nakon rekristalizacije, dobije se čisto

jedinjenje **129** (55 mg, 40%) u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **129**:

$t_t$  197–200 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -36$  ( $c$  0,250 g/L,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); UV/Vis (MeOH, nm):  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 286 (4,68), 498 (4,34);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3356, 2961, 2931, 2875, 1670, 1632, 1580, 1507, 1417, 1384, 1344, 1288, 1124, 1092, 644, 612;

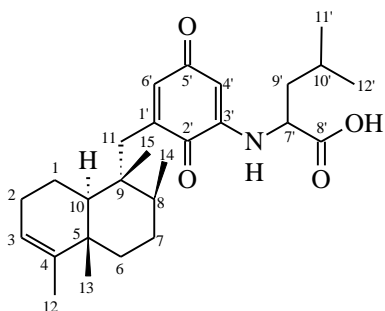
$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6,33 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1 H, C6'-H), 5,42 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1 H, C4'-H), 5,11 (brs, 1 H, C3-H), 3,60 (d,  $J = 4,6$  Hz, 1 H, C7'-H), 2,59 (d,  $J = 14,0$  Hz, 1 H, C11-H<sub>a</sub>), 2,48 (d,  $J = 14,0$  Hz, 1 H, C11-H<sub>b</sub>), 2,19 (m, 1 H, C9'-H), 1,51 (s, 3 H,

C12-H), 1,07 (d,  $J = 1,6$  Hz, 3 H, C10'-H), 1,01 (s, 3 H, C13-H), 0,99 (d,  $J = 1,6$  Hz, 3 H, C11'-H), 0,96 (d,  $J = 2,2$  Hz, 3 H, C14-H), 0,85 (s, 3 H, C15-H);

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  187,3 (C-5'), 184,7 (C-2'), 177,6 (C-8'), 148,7 (C-3'), 145,0 (C-4), 143,9 (C-1'), 140,7 (C-6'), 121,7 (C-3), 97,7 (C-4'), 64,7 (C-7'), signal se preklapa sa signalom rastvarača (C-10), 43,1 (C-9), 39,6 (C-5), 38,3 (C-8), 37,4 (C-6), 36,3 (C-11), 32,4 (C-9'), 28,6 (C-7), 27,4 (C-2), 20,5 (C-1, C-11'), 19,8 (C-13), 19,2 (C-14), 18,3 (C-10'), 18,0 (C-12), 17,2 (C-15);

HRMS (MeOH):  $m/z$  428,27917  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{NO}_4$ : 428,27954;  $m/z$  855,55066  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{52}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_8$ : 855,55179.

#### 4.3.5. *N*-[3-[[*(1R,2S,4aS,8aS)*-1,2,3,4,4a,7,8,8a-oktahidro-1,2,4a,5-tetrametil-1-naftalenil]metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-(*S*)leucin (**130**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata avarona, jedinjenje **130** se dobija u reakciji avarona (100 mg, 0,32 mmol) i L-leucina (126 mg; 0,96 mmol). Reakciona smesa se meša 5 h. Sirovi proizvod se prečisti na preparativnim TLC pločama (9:1 toluen/EtOAc), te rehromatografiše na istima (9:1  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ). Izolovano je jedinjenje **130** (42 mg,

30%) u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **130**:

tt 148–150 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -24$  ( $c$  0,250 g/L,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); UV/Vis (MeOH, nm):  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 286 (4,62), 494 (4,24);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3368, 1670, 1632, 1581, 1512, 1449, 1384, 1343, 1257, 1121, 1029, 737, 702, 613;

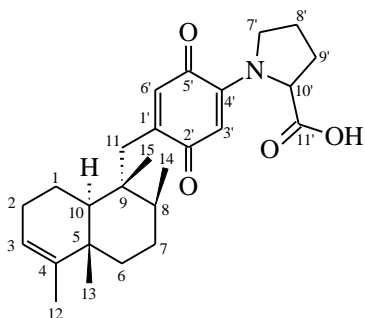
$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6,32 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1 H, C6'-H), 5,39 (d,  $J = 2,8$  Hz, 1 H, C4'-H), 5,10 (brs, 1 H, C3-H), 3,77 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1 H, C7'-H), 2,52 (d,  $J = 14,0$  Hz, 1 H, C11-H<sub>a</sub>), 2,46 (d,  $J = 14,0$  Hz, 1 H, C11-H<sub>b</sub>), 1,71 (m, 3 H, C9'-H, C10'-H), 1,51

(s, 3 H, C12-H), 1,01 (s, 3 H, C13-H), 0,89 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H, C14-H), 0,96 (s, 3 H, C11'-H), 0,93 (s, 3 H, C12'-H), 0,84 (s, 3 H, C15-H);

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  187,2 (C-5'), 184,7 (C-2'), 178,2 (C-8'), 148,6 (C-3'), 145,2 (C-4), 144,0 (C-1'), 140,6 (C-6'), 121,5 (C-3), 97,5 (C-4'), 58,0 (C-7'), signal se preklapa sa signalom rastvarača (C-10), 43,1 (C-9), 42,0 (C-9'), 39,6 (C-5), 37,8 (C-8), 37,4 (C-6), 36,0 (C-11), 28,6 (C-7), 27,4 (C-2), 26,4 (C-10'), 23,5 (C-11'), 22,8 (C-12'), 20,5 (C-1), 20,3 (C-13), 18,3 (C-14), 18,1 (C-12), 17,2 (C-15);

HRMS (MeOH):  $m/z$  442,29476  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{NO}_4$ : 442,29519;  $m/z$  883,58178  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{54}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_8$ : 883,58309.

#### 4.3.6. *N*-[4-[[*(1R,2S,4aS,8aS)*-1,2,3,4,4a,7,8,8a-oktahidro-1,2,4a,5-tetrametil-1-naftalenil]metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-(*S*)proline (**131**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata avarona, jedinjenje **131** se dobija u reakciji avarona (110 mg, 0,35 mmol) i L-prolina (122 mg; 1,06 mmol). Reakciona smesa se meša 1,5 h i dolazi do promene boje iz žute u ljubičastu. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na TLC pločama (9:1 toluen/EtOAc), te rehromatografiše na istima (8:2

$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ). Izoluje se čisto jedinjenje **131** (28 mg, 19%) u obliku crveno-ljubičastih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **131**:

$t_t$  193–195 °C (dek.);  $[\alpha]_D^{20} = -120$  ( $c$  0,125 g/L,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); UV/Vis (MeOH, nm):  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 296 (4,67), 512 (4,34);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3377, 2959, 2925, 2876, 1658, 1629, 1590, 1563, 1452, 1420, 1144;

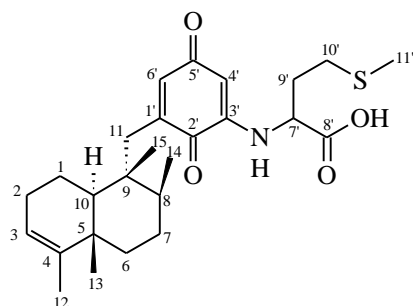
$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6,13 (brs, 1 H, C6'-H), 5,37 (brs, 1 H, C3'-H), 5,00 (bs, 1 H, C3-H), 3,57–3,42 (m, 3 H, C7'-H, C10'-H), 2,51 (d,  $J = 13,0$  Hz, 1 H, C11-H<sub>a</sub>), 2,38 (d,  $J = 13,0$  Hz, 1 H, C11-H<sub>b</sub>), 2,19–2,05 (m, 2 H, C9'-H), 2,05–1,85 (širok

signal, 2 H, C8'-H), 1,41 (s, 3 H, C12-H), 0,91 (s, 3 H, C13-H), 0,85 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H, C14-H), 0,75 (s, 3 H, C15-H);

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  186,3 (C-2'), 185,7 (C-5'), 180,0 (C-11'), 150,1 (C-1'), 148,9 (C-4'), 144,9 (C-4), 134,5 (C-6'), 121,7 (C-3), 102,5 (C-3'), 66,9 (C-10'), signal se preklapa sa signalom rastvarača (C-10, C-7'), 43,7 (C-9), 39,5 (C-5), 38,2 (C-8), 37,4 (C-6), 36,1 (C-11), 33,0 (C-9'), 30,7 (C-8'), 28,7 (C-7), 27,4 (C-2), 20,5 (C-1), 20,4 (C-13), 18,3 (C-14), 18,2 (C-12), 17,3 (C-15);

HRMS (MeOH):  $m/z$  426,26373  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{NO}_4$ : 426,26389;  $m/z$  851,52046  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{N}_2\text{O}_8$ : 851,52049.

#### 4.3.7. *N*-[3-[[*(1R,2S,4aS,8aS)*-1,2,3,4,4a,7,8,8a-oktahidro-1,2,4a,5-tetrametil-1-naftalenil]metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-(*S*)metionin (**132**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata avarona, jedinjenje **132** se dobija u reakciji avarona (200 mg, 0,64 mmol) i L-metionina (239 mg; 1,60 mmol). Reakciona smesa se meša 5 h. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na preparativnim TLC pločama (9:1 toluen/EtOAc) uz rehromatografiju u sistemu

$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (8:2). Nakon rekristalizacije iz dihlormetana, dobiju se crveni kristali jedinjenja **132** (45 mg, 15%).

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **132**:

$t_t$  164–168 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -12$  ( $c$  0,250 g/L,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); UV/Vis (MeOH, nm):  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 290 (4,59), 490 (4,20);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3350, 2959, 2931, 2857, 1669, 1632, 1584, 1489, 1442, 1384, 1339, 1284, 1144, 1029, 628;

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6,33 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, C6'-H), 5,45 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, C4'-H), 5,10 (brs, 1 H, C3-H), 3,89 (dd,  $J = 5,6$  Hz,  $J = 9,0$  Hz, 1 H, C7'-H),

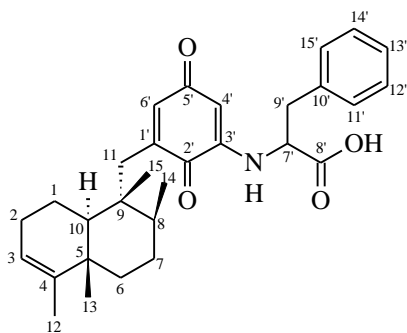


2,66–2,37 (m, 4 H, C11-H<sub>a</sub>, C11-H<sub>b</sub>, C10'-H), 2,17–2,10 (m, 2 H, C9'-H), 2,04 (s, 3 H, C11'-H), 1,50 (s, 3 H, C12-H), 1,00 (s, 3 H, C13-H), 0,94 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H, C14-H), 0,84 (s, 3 H, C15-H);

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  187,2 (C-5'), 184,6 (C-2'), 176,9 (C-8'), 148,3 (C-3'), 145,1 (C-4), 144,1 (C-1'), 140,6 (C-6'), 121,5 (C-3), 97,7 (C-4'), 57,9 (C-7'), signal se preklapa sa signalom rastvarača (C-10), 43,1 (C-9), 39,5 (C-5), 37,8 (C-8), 37,4 (C-6), 35,9 (C-11), 32,1 (C-9'), 31,1 (C-10'), 28,5 (C-7), 27,4 (C-2), 20,5 (C-1), 20,3 (C-13), 18,3 (C-14), 18,1 (C-12), 17,1 (C-15), 15,4 (C-11');

HRMS (MeOH):  $m/z$  460,25091 [M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>4</sub>S: 460,25161;  $m/z$  919,49546 [2M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>52</sub>H<sub>75</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>: 919,49594.

#### 4.3.8. N-[3-[[*(1R,2S,4aS,8aS)*-1,2,3,4,4a,7,8,8a-oktahidro-1,2,4a,5-tetrametil-1-naftalenil]metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-(*S*)fenilalanin (**133**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata avarona, jedinjenje **133** se dobija u reakciji avarona (190 mg, 0,61 mmol) i L-fenilalanina (100 mg; 0,61 mmol). Reakciona smesa se meša 5h. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na preparativnim TLC pločama (9:1 toluen/EtOAc). Izoluje se čisto jedinjenje **133**

(28 mg, 10%) u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **133**:

$t_f$  155–158 °C;  $[\alpha]_D^{20} = 60$  ( $c$  0,250 g/L, CH<sub>3</sub>OH); UV/Vis (MeOH, nm):  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 286 (4,66), 496 (4,26);

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3365, 3026, 2957, 2929, 2857, 1670, 1631, 1581, 1514, 1494, 1440, 1409, 1341, 1288, 1127, 1028;

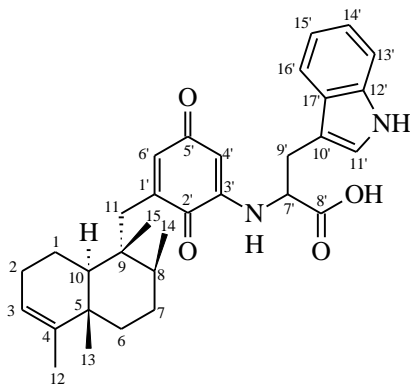
<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7,20–7,08 (širok signal, 5 H, Ph-H), 6,26 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, C6'-H), 5,21 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, C4'-H), 5,13 (brs, 1 H, C3-H), 3,98 (dd,  $J =$

4,4 Hz,  $J = 7,8$  Hz, 1 H, C7'-H), 3,27 (dd,  $J = 6,0$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, 1 H, C9'-H<sub>a</sub>), 2,99 (dd,  $J = 8,0$  Hz,  $J = 14,0$  Hz, 1 H, C9'-H<sub>b</sub>), 2,66 (d,  $J = 13,4$  Hz, 1 H, C11-H<sub>a</sub>), 2,30 (d,  $J = 14,0$  Hz, 1 H, C11-H<sub>b</sub>), 1,54 (s, 3 H, C12-H), 1,01 (s, 3 H, C13-H), 0,92 (d,  $J = 6,2$  Hz, 3 H, C14-H), 0,82 (s, 3 H, C15-H);

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  187,1 (C-5'), 184,3 (C-2'), 176,8 (C-8'), 148,0 (C-3'), 145,0 (C-4), 143,8 (C-1'), 140,5 (C-6'), 138,7 (C-10'), 130,5 (C-11', C-15'), 129,4 (C-12', C-14'), 127,6 (C-13'), 121,8 (C-3), 97,5 (C-4'), 59,9 (C-7'), signal se preklapa sa signalom rastvarača (C-10), 43,0 (C-9), 39,5 (C-5), 39,0 (C-9'), 37,5 (C-8), 37,4 (C-6), 35,6 (C-11), 28,4 (C-7), 27,5 (C-2), 20,5 (C-1), 20,3 (C-13), 18,4 (C-14), 18,1 (C-12), 17,0 (C-15);

HRMS (MeOH):  $m/z$  476,27878 [M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>4</sub>: 476,27954.

#### 4.3.9. *N*-[3-[[*(1R,2S,4aS,8aS)*-1,2,3,4,4a,7,8,8a-oktahidro-1,2,4a,5-tetrametil-1-naftalenil]metil]-2,5-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il]-(*S*)triptofan (**134**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata avarona, jedinjenje **134** se dobija iz avarona (100 mg, 0,32 mmol) i L-triptofana (98 mg; 0,48 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h i dolazi do promene boje iz žute u crvenu-ljubičastu. Sirovi proizvod se prečisti na TLC pločama (9:1 toluen/EtOAc), te rehromatografiše na isti način u sistemu CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1). Nakon rekristalizacije iz

dihlormetana, dobije se jedinjenje **134** (52 mg, 32%) u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **134**:

$t_f$  157–160 °C (dek.);  $[\alpha]_D^{20} = -32$  ( $c$  0,125 g/L, CH<sub>3</sub>OH); UV/Vis (MeOH, nm):  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 282 (4,74), 290 (4,71), 396 (3,82), 500 (4,10);

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3351, 2956, 2839, 1664, 1632, 1581, 1439, 1412, 1145, 1024, 740, 659, 637, 611;

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7,55 (d, *J* = 7,2 Hz, 1 H, C16'-H), 7,30 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H, C13'-H), 7,09 (s, 1 H, C11'-H), 7,05–6,92 (m, 2 H, C14'-H, C15'-H), 6,23 (brs, 1 H, C6'-H), 5,27 (brs, 1 H, C4'-H), 5,07 (brs, 1 H, C3-H), 4,09 (brs, 1 H, C7'-H), 3,55–3,40 (brm, 1 H, C9'-H<sub>a</sub>), 3,30–3,15 (brm, 1 H, C9'-H<sub>b</sub>), 2,55 (d, *J* = 13,4 Hz, 1 H, C11-H<sub>a</sub>), 2,28 (d, *J* = 13,4 Hz, 1 H, C11-H<sub>b</sub>), 1,52 (s, 3 H, C12-H), 0,99 (s, 3 H, C13-H), 0,88 (d, *J* = 6,2 Hz, 3 H, C14-H), 0,80 (s, 3 H, C15-H);

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 187,0 (C-5'), 184,1 (C-2'), 179,8 (C-8'), 148,1 (C-3'), 144,5 (C-4), 143,4 (C-1'), 140,4 (C-6'), 137,7 (C-12'), 128,8 (C-17'), 124,3 (C-11'), 122,2 (C-16'), 121,7 (C-3), 119,8 (C-15'), 119,2 (C-14'), 112,1 (C-13'), 111,2 (C-10'), 97,5 (C-4'), 54,5 (C-7'), signal se preklapa sa signalom rastvarača (C-10), 42,8 (C-9), 39,3 (C-5), 37,4 (C-8), 37,0 (C-6), 35,7 (C-11), 28,8 (C-9'), 28,3 (C-7), 27,2 (C-2), 20,4 (C-1), 20,1 (C-13), 18,3 (C-14), 18,1 (C-12), 17,0 (C-15);

HRMS (MeOH): *m/z* 515,28989 [M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 515,29043.

#### 4.4. Dobijanje *tert*-butilhinona

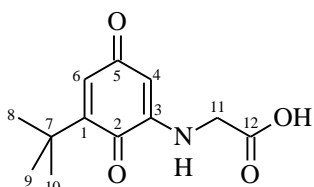
*tert*-Butilhidrohinon (**125**) (2 g, 12,03 mmol) se rastvori u 100 ml suvog dietil etra. U porcijama se dodaje sveže pripremljen srebro-oksidi (3,2 g, 13,81 mmol) i reakcija se meša 2 h na sobnoj temperaturi. Reakciona smesa se dalje tretira kako je prethodno navedeno u odeljku za dobijanje avarona (poglavlje 4.2.). *tert*-Butilhinon (**135**) se dobija u obliku žutih kristala (1,658 g, 83,9%).

#### 4.5. Sinteze aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona

*Opšti postupak za dobijanje aminokiselinskih derivata tert-butilhinona.* Aminokiselina se rastvori u zasićenom rastvoru natrijum-hidrogenkarbonata (100 mL), te se dokapa 10% rastvor natrijum-hidroksida do pH 10. Smesa se lagano dodaje u etanolni rastvor avarona (100 mL). Reakciona smesa se meša određeno vreme na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, etanol se ukloni na vakuum uparivaču, a zaostali deo reakcione smese ekstrahuje etil-acetatom. Vodeni deo se zakiseli 10% hlorovodoničnom kiselinom, pa se ponovi ekstrakcija etil-acetatom. Organski slojevi se osuše iznad

anhidrovanog natrijum-sulfata, a potom koncentruju na vakuum uparivaču. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na TLC pločama, te rehromatografiše u istom sistemu. Nakon rekristalizacije iz dihlormetana, dobije se čisto jedinjenje.

#### 4.5.1. *N*-(5-*tert*-Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-glicin (**136**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona, jedinjenje **136** se dobija iz TBH (180 mg, 1,10 mmol) i glicina (324 mg; 4,32 mmol). Reakciona smesa se meša 2,5 h. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na preparativnim TLC pločama (9:1

CHCl<sub>3</sub>/MeOH), te rehromatografiše na isti način. Nakon rekristalizacije se dobiju crveni kristali jedinjenja **136** (31 mg, 12%).

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **136**:

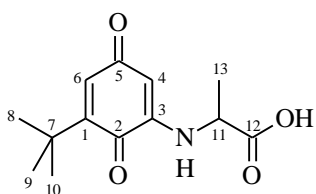
**tt** 104–106 °C (dek.); **UV/Vis** (MeOH, nm):  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 274 (4,60), 368 (3,90), 476 (3,98);

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3356, 2959, 2930, 2871, 1725, 1633, 1591, 1486, 1461, 1393, 1362, 1278, 1124, 1074;

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  6,41 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, C6-H), 5,30 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, C4-H), 3,64 (brs, 2 H, C11-H), 1,27 (s, 9 H, C8-H, C9-H, C10-H);

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  187,8 (C-5), 183,9 (C-2), 174,9 (C-12), 153,1 (C-1), 149,7 (C-3), 135,9 (C-6), 97,0 (C-4), 47,0 (C-11), 35,7 (C-7), 29,4 (C-8, C-9, C-10);

**HRMS** (MeOH):  $m/z$  238,10636 [M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub>: 238,10738;  $m/z$  255,11225 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 255,13393.

4.5.2. *N*-(5-*tert*-Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-alanin (**137**)

Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona, jedinjenje **137** se dobija iz TBH (200 mg, 1,22 mmol) i L-alanina (170 mg; 1,91 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h. Sirovi proizvod se prečisti

hromatografijom na preparativnim TLC pločama (8:2 CHCl<sub>3</sub>/MeOH). Hromatografija se ponovi na isti način. Izoluje se čisto jedinjenje **137** (73 mg, 24%) u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **137**:

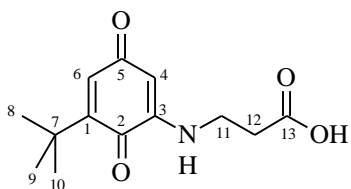
**tt** 159–163 °C (dek.);  $[\alpha]_D^{20} = -32$  (*c* 0,125 g/L, CH<sub>3</sub>OH); **UV/Vis** (MeOH, nm):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 274 (4,87), 486 (4,40);

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3351, 2961, 1673, 1630, 1580, 1488, 1455, 1416, 1365, 1338, 1283, 1171;

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  6,40 (d, *J* = 2,2 Hz, 1 H, C6-H), 5,35 (d, *J* = 2,2 Hz, 1 H, C4-H), 3,81 (q, *J* = 6,8 Hz, 1 H, C11-H), 1,43 (d, *J* = 7,2 Hz, 3 H, C13-H), 1,26 (s, 9 H, C8-H, C9-H, C10-H);

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  187,7 (C-5), 184,0 (C-2), 179,3 (C-12), 153,1 (C-1), 148,8 (C-3), 135,9 (C-6), 97,0 (C-4), 54,0 (C-11), 35,7 (C-7), 29,4 (C-8, C-9, C-10), 18,0 (C-13);

**HRMS** (MeOH): *m/z* 252,12285 [M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub>: 252,12303; *m/z* 503,23881 [2M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: 503,23879.

4.5.3. *N*-(5-*tert*-Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)- $\beta$ -alanin (**138**)

Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona, jedinjenje **138** se dobija iz TBH (100 mg, 0,61 mmol) i  $\beta$ -alanina (110 mg; 1,23 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h. Sirovi proizvod se prečisti

hromatografijom na preparativnim TLC pločama (9:1  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ). Nakon rekristalizacije iz dihlormetana, izoluju se crveni kristali jedinjenja **138** (74 mg, 48%).

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **138**:

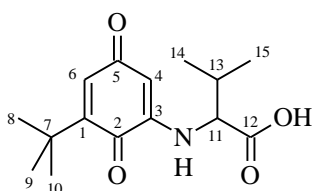
tt 117–120 °C; UV/Vis (MeOH, nm):  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 274 (4,92), 484 (4,44);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3349, 2960, 1673, 1631, 1582, 1509, 1455, 1365, 1256, 1158;

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6,41 (brs, 1 H, C6-H), 5,44 (brs, 1 H, C4-H), 3,30 (t,  $J = 1,6$  Hz, 2 H, C11-H), 2,55 (širok signal, 2 H, C12-H), 1,25 (s, 9 H, C8-H, C9-H, C10-H);

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  187,7 (C-5), 184,0 (C-2), 178,9 (C-13), 153,1 (C-1), 150,1 (C-3), 135,9 (C-6), 96,6 (C-4), 40,4 (C-11), 35,7 (C-7), 30,0 (C-12) 29,4 (C-8, C-9, C-10);

HRMS (MeOH):  $m/z$  252,12255  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_4$ : 252,12303.

4.5.4. *N*-(5-*tert*-Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-D-valin (**139**)

Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona, jedinjenje **139** se dobija u reakciji TBH (130 mg, 0,79 mmol) i D-valina (140 mg; 1,20 mmol). Reakciona smesa se meša 2,5 h. Sirovi proizvod se prečisti

hromatografijom na preparativnim TLC pločama (9:1 toluen/EtOAc) i rehromatografijom u istom sistemu. Nakon rekristalizacije je izolovano jedinjenje **139** (61 mg, 28%) u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **139**:

**tt** 180–183 °C (dek.);  $[\alpha]_D^{20} = -20$  ( $c$  0,250 g/L, CH<sub>3</sub>OH); **UV/Vis** (MeOH, nm):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 274 (4,78), 490 (4,34);

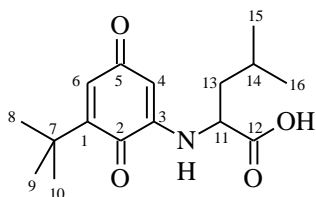
**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3350, 2962, 2873, 1673, 1630, 1578, 1506, 1421, 1340, 1162;

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  6,41 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H, C6-H), 5,40 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H, C4-H), 3,61 (d,  $J = 6,2$  Hz, 1 H, C11-H), 2,20 (m, 1 H, C13-H), 1,26 (s, 9 H, C8-H, C9-H, C10-H), 0,98 (d,  $J = 6,4$  Hz, 6 H, C14-H, C15-H);

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  187,8 (C-5), 184,0 (C-2), 177,6 (C-12), 153,0 (C-1), 149,6 (C-3), 135,9 (C-6), 97,2 (C-4), 64,5 (C-11), 35,7 (C-7), 32,5 (C-13) 29,4 (C-8, C-9, C-10), 20,0 (C-15), 19,1 (C-14);

**HRMS** (MeOH):  $m/z$  280,15442 [M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>: 280,15433;  $m/z$  302,14251 [M+Na]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>Na: 302,13628;  $m/z$  559,30101 [2M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>30</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: 559,30139.

#### 4.5.5. *N*-(5-*tert*-Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-leucin (**140**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona, jedinjenje **140** se dobija u reakciji TBH (100 mg, 0,61 mmol) i L-leucina (80 mg; 0,61 mmol). Reakciona smesa se meša u toku 2 h, te dolazi do promene boje iz žute u crveno-ljubičastu. Sirovi proizvod je prečišćen

hromatografijom na preparativnim TLC pločama (9:1 toluen/EtOAc), te rehromatografisan na isti način u sistemu CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1). Jedinjenje **140** (32 mg, 18%) je izolovano u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **140**:

**tt** 147–148 °C;  $[\alpha]_D^{20} = -20$  ( $c$  0,250 g/L, CH<sub>3</sub>OH); **UV/Vis** (MeOH, nm):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 272 (4,72), 488 (4,258);

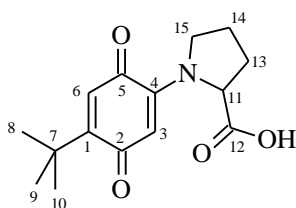
**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3359, 2958, 2871, 1672, 1630, 1578, 1511, 1419, 1365, 1341, 1264, 1165;

**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6,32 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, C6-H), 5,29 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, C4-H), 3,68 (m, 1 H, C11-H), 1,64 (m, 3 H, C13-H, C14-H), 1,18 (s, 9 H, C8-H, C9-H, C10-H), 0,89 (d,  $J = 6,0$  Hz, 3 H, C15-H), 0,83 (d,  $J = 6,0$  Hz, 3 H, C16-H);

**$^{13}\text{C}$  NMR** (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  187,8 (C-5), 184,0 (C-2), 178,4 (C-12), 153,1 (C-1), 149,4 (C-3), 135,9 (C-6), 97,0 (C-4), 58,0 (C-11), 42,3 (C-13), 35,7 (C-7), 29,4 (C-8, C-9, C-10), 26,4 (C-14), 23,4 (C-15), 22,7 (C-16);

**HRMS** (MeOH):  $m/z$  294,16991  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NO}_4$ : 294,16998;  $m/z$  587,33268  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_8$ : 587,33269.

#### 4.5.6. *N*-(4-*tert*-Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-prolin (**141**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona, jedinjenje **141** se dobija u reakciji TBH (200 mg, 1,22 mmol) i L-prolina (280 mg; 2,43 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h, a boje smese se menja iz žute u crvenu-ljubičastu. Sirovi proizvod je prečišćen hromatografijom na

preparativnim TLC pločama (9:1  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ), te rehromatografisan na isti način u sistemu toluen/EtOAc (6:4). Nakon rekristalizacije iz dihlormetana, izolovani su ljubičasti kristali jedinjenja **141** (29 mg, 9%).

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **141**:

**tt** 148–152 °C (dek.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -264$  ( $c$  0,125 g/L,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); **UV/Vis** (MeOH, nm):  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 276 (4,62), 498 (4,11);

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3377, 2962, 1623, 1581, 1424, 1146;

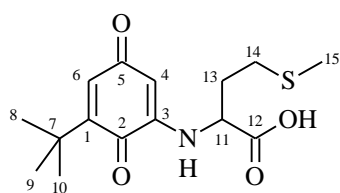
**$^1\text{H}$  NMR** (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6,28 (s, 1 H, C6-H), 5,40 (s, 1 H, C3-H), 3,63 (loše razdvojen dd, preklopljen sa C15-H, 1 H, C11-H), 3,55–3,40 (m, 2 H, C15-H), 2,24–2,12 (m, 2 H, C13-H), 1,90 (brs, 2 H, C14-H), 1,26 (s, 9 H, C8-H, C9-H, C10-H);



$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  187,1 (C-2), 187,0 (C-5), 180,1 (C-12), 158,6 (C-1), 148,7 (C-4), 129,8 (C-6), 104,6 (C-3), 66,7 (C-11), 52,2 (C-15), 36,0 (C-7), 33,0 (C-13), 29,9 (C-8, C-9, C-10), 24,0 (C-14);

HRMS (MeOH):  $m/z$  278,13828  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ : 278,13868.

#### 4.5.7. *N*-(5-*tert*-Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-metionin (**142**)



Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona, jedinjenje **142** se dobija u reakciji TBH (130 mg, 0,79 mmol) i L-metionina (118 mg; 0,79 mmol). Reakciona smesa se meša u toku 2 h.

Sirovi proizvod se prečisti na preparativnim TLC pločama (9:1  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ), te rehromatografiše istim postupkom. Dobije se čisto jedinjenje **142** (43 mg, 17%) u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **142**:

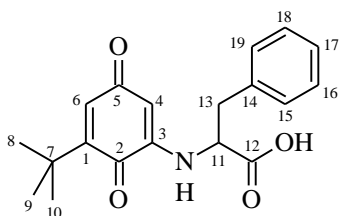
tt 148–152 °C (dek.);  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -24$  ( $c$  0,125 g/L,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ); UV/Vis (MeOH, nm):  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 274 (4,77), 486 (4,31);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3344, 2961, 1671, 1630, 1580, 1488, 1423, 1339, 1143;

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6,42 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, C6-H), 5,44 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1 H, C4-H), 3,88 (dd,  $J = 6,2$  Hz,  $J = 11,8$  Hz, 1 H, C11-H), 2,52 (m, 2 H, C14-H), 2,15–2,01 (m, 2 H, C13-H), 1,98 (s, 3 H, C15-H), 1,27 (s, 9 H, C8-H, C9-H, C10-H);

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  187,8 (C-5), 184,0 (C-2), 177,0 (C-12), 153,2 (C-1), 149,2 (C-3), 135,8 (C-6), 97,2 (C-4), 58,0 (C-11), 35,7 (C-7), 32,5 (C-13), 31,2 (C-14), 29,4 (C-8, C-9, C-10), 15,3 (C-15);

HRMS (MeOH):  $m/z$  312,12628  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{S}$ : 312,12641;  $m/z$  623,24469  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , izračunato za  $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$ : 623,24553.

4.5.8. *N*-(5-*tert*-Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-fenilalanin (**143**)

Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona, jedinjenje **143** se dobija u reakciji TBH (230 mg, 1,40 mmol) i L-fenilalanina (232 mg; 1,40 mmol). Reakciona smesa se meša 3 h. Sirovi proizvod se prečisti hromatografijom na preparativnim

TLC pločama (9:1 hloroform/metanol), te rehromatografiše na isti način u sistemu toluen/etil-acetat (9:1). Nakon rekristalizacije, dobije se čisto jedinjenje **143** (186 mg, 41%) u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **143**:

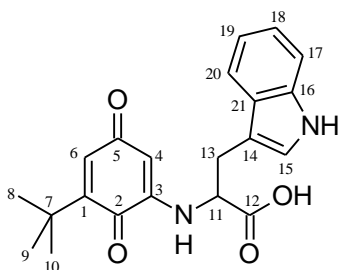
**tt** 143–146 °C;  $[\alpha]_D^{20} = 16$  (*c* 0,250 g/L, CH<sub>3</sub>OH); **UV/Vis** (MeOH, nm):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 274 (4,71), 488 (4,29);

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3353, 3060, 3027, 2960, 2870, 1672, 1627, 1573, 1502, 1449, 1400, 1365, 1340, 1256;

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7,22–7,14 (m, 5 H, C15-H, C16-H, C17-H, C18-H, C19-H), 6,35 (d, *J* = 2,5 Hz, 1 H, C6-H), 5,26 (d, *J* = 2,5 Hz, 1 H, C4-H), 3,99 (dd, *J* = 5,0 Hz, *J* = 7,4 Hz, 1 H, C11-H), 3,23 (m, 1 H, C13-H<sub>a</sub>), 3,05 (dd, *J* = 7,2 Hz, *J* = 13,4 Hz, 1 H, C13-H<sub>b</sub>), 1,22 (s, 9 H, C8-H, C9-H, C10-H);

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  187,8 (C-5), 183,8 (C-2), 177,0 (C-12), 153,0 (C-1), 149,0 (C-3), 138,8 (C-14), 135,7 (C-6), 130,5 (C-15, C-19), 129,4 (C-16, C-18), 127,7 (C-17), 97,2 (C-4), 60,1 (C-11), 38,8 (C-13), 35,6 (C-7), 29,4 (C-8, C-9, C-10);

**HRMS** (MeOH): *m/z* 328,15398 [M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>: 328,15433; *m/z* 655,30056 [2M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>38</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: 655,30139

4.5.9. *N*-(5-*tert*-Butil-3,6-diokso-1,4-cikloheksadien-1-il)-L-triptofan (**144**)

Prema opštem postupku za dobijanje aminokiselinskih derivata *tert*-butilhinona, jedinjenje **144** se dobija u reakciji TBH (100 mg, 0,61 mmol) i L-triptofana (125 mg; 0,61 mmol). Reakciona smesa se meša u toku 1 h. Sirovi proizvod se prečisti hromatografski na preparativnim TLC pločama (9:1 toluen/etil-acetat), te rehromatografiše u sistemu hloroform/metanol (9:1). Nakon rekristalizacije se izoluje jedinjenje **144** (42 mg, 18%) u obliku crvenih kristala.

Fizičke konstante i spektroskopski podaci za **144**:

**tt** 156–159 °C (dek.);  $[\alpha]_D^{20} = -24$  (*c* 0,125 g/L, CH<sub>3</sub>OH); **UV/Vis** (MeOH, nm):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 278 (4,90), 496 (4,27);

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3349, 3001, 2960, 2871, 1671, 1630, 1574, 1501, 1421, 1363, 1341, 1151;

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7,56 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H, C20-H), 7,30 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H, C17-H), 7,13 (s, 1 H, C15-H), 7,08–6,90 (m, 2 H, C18-H, C19-H), 6,34 (d, *J* = 2,0 Hz, 1 H, C6-H), 5,31 (loše razdvojen d, 1 H, C4-H), 4,11 (loše razdvojen dd, 1 H, C11-H), 3,49 (dd, *J* = 4,2 Hz, *J* = 14,4 Hz, 1 H, C13-H<sub>a</sub>), 3,27 (dd, *J* = 7,2 Hz, *J* = 14,4 Hz, 1 H, C13-H<sub>b</sub>), 1,18 (s, 9 H, C8-H, C9-H, C10-H);

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  187,7 (C-5), 183,6 (C-2), 177,6 (C-12), 152,8 (C-1), 149,1 (C-3), 138,0 (C-16), 135,7 (C-6), 129,1 (C-21), 124,5 (C-15), 122,2 (C-20), 119,7 (C-19), 119,4 (C-18), 112,2 (C-17), 111,4 (C-14), 96,9 (C-4), 59,8 (C-11), 35,5 (C-7), 29,3 (C-8, C-9, C-10), 28,8 (C-13);

**HRMS** (MeOH): *m/z* 367,16471 [M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 367,16523; *m/z* 733,32271 [2M+H]<sup>+</sup>, izračunato za C<sub>42</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>: 733,32319.

#### 4.6. Ciklična voltametrija

Za voltametrijska merenja je korišćena elektrohemijska ćelija sa tri elektrode. Kao radna elektroda je upotrebljen disk od staklastog ugljenika (prečnik 2 mm), dok je kao pomoćna elektroda korišćena platinska žica. Referentna elektroda je bila srebrna žica uronjena u rastvor elektrolita. Rastvor referentne elektrode se sastojao od 0,1 M tetrabutilamonijum-perhlorata i 0,01 M srebro-nitrata rastvorenih u dimetilsulfoksidu koji je prethodno predestilovan pod sniženim pritiskom. Aminokiselinski derivati su rastvoreni u DMSO, u koncentraciji od 2 mM. Vrednosti potencijala su dati u odnosu na ferocen. Sva merenja su rađena na sobnoj temperaturi u prisustvu azota.

#### 4.7. Ispitivanje citotoksičnosti sintetisanih aminokiselinskih derivata hinona

Eksperimenti sa tumorskim ćelijskim linijama su urađeni na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu.

U radu je korišćen BD FACSCalibur™ protočni citometar i BD CellQuest Pro softver koji su proizvod BD Biosciences, SAD. Korišćeni Elisa rider je tipa Multiskan EX Thermo LabSystems. Ćelijske linije su poručene iz ATCC kataloga. Hemikalije i reagensi su pribavljeni od Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka. Inhibitori kaspaza su proizvodi R&D Systems, Inc., SAD.

##### 4.7.1. Ćelijske linije

Potencijalno antitumorsko dejstvo dobijenih aminokiselinskih derivata hinona ispitano je prema humanim malignim ćelijskim linijama: adenokarcinom cerviksa (HeLa), melanom (Fem-X), hronična mijeloidna leukemija (K562), adenokarcinom dojke (MDA-MB-453) i adenokarcinom pluća (A549). Pored toga, antiproliferativna aktivnost sintetisanih jedinjenja je ispitana i prema zdravim fetalnim fibroblastima pluća (MRC-5).

Kao medijum u kom su ćelije kultivisane korišćena je hranljiva podloga RPMI-1640 koja je obogaćena 10% serumom fetalnog govečeta (FBS) termički inaktivisanog na 56 °C tokom 30 minuta, zatim L-glutaminom (3 mM), penicilinom (100 IU/mL),

streptomycinom (100 µg/mL) i HEPES-om (25 mM). Vrednost pH 7,2 je podešena bikarbonatnim rastvorom. MDA-MB-453 ćelije su gajene u istom medijumu uz dodatak glukoze (1,11 g/L podloge). Ćelijske kulture su gajene na 37 °C, u vlažnoj atmosferi obogaćenoj 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.7.2. Tretman ćelijskih linija

Štok rastvori (10 mM) ispitivanih jedinjenja u DMSO-u se razblaže odgovarajućim hranljivim medijumom kako bi se dobile željene radne koncentracije. Neoplastične ćelije HeLa (2000 ćelija u 100 µl podloge po bunaru), A549 (5000 ćelija u 100 µl podloge po bunaru), Fem-X (5000 ćelija u 100 µl podloge po bunaru), MDA-MB-453 (3000 ćelija u 100 µl podloge po bunaru), kao i netumorske ćelije MRC-5 (5000 ćelija u 100 µl podloge po bunaru) se zaseju u mikrotitar ploče sa 96 bunara sa ravnim dnom. Kao sleba proba se koristi hranljivi medijum. Sve ćelijske linije, osim K562, se inkubiraju 24 sati u toku čega dođe do adhezije ćelija. Kako ćelije K562 (5000 ćelija u 100 µl podloge po bunaru) rastu u suspenziji, zaseju se 2 sata pre dodavanja ispitivanih derivata i inkubiraju na 37 °C. Prilikom pripreme ćelijskih suspenzija, kao i rasvora ispitivanih jedinjenja koristi se kompletni hranljivi medijum RPMI 1640 prethodno opisan, bez fenol crvenog, pH 7,2. Nakon toga se u odgovarajuće bunare doda 50 µl prethodno pripremljenih rastvora ispitivanih jedinjenja, tako da finalna koncentracija jedinjenja bude 200, 100, 50, 25 i 12,5 µM. U kontrolne uzorke se doda samo ista zapremina hranljivog medijuma. Nakon dodavanja jedinjenja, ćelijske kulture se inkubiraju tokom 72 sata na 37 °C.

#### 4.7.3. Određivanje preživljavanja ćelija

Efekat sintetisanih jedinjenja na preživljavanje ćelija kancera je određen MTT kolorimetrijskim testom po Mosmann-u uz izvesne modifikacije.<sup>149</sup>

Nakon 72 sata inkubacije, u svaki bunar sa tumorskim ćelijama i ispitivanim jedinjenjima se doda po 20 µl MTT reagensa (5 mg/mL, PBS). Uzorci se potom inkubiraju naredna 4 sata na 37 °C, u atmosferi koja je zasićena vodenim parama uz

dati 5% CO<sub>2</sub>. Nakon toga se doda po 100 µl SDS-a (100 mg/mL) i nastavi se sa inkubiranjem tokom naredna 24 sata.

Apsorbancija (A) nagrađenog formazana se očitava na talasnoj dužini od 570 nm na ELISA čitaču. Kako bi se dobio procenat preživelih ćelija S, izmerene apsorbancije uzoraka u kojima ćelije rastu pod uticajem različitih koncentracija testiranih jedinjenja (A<sub>t</sub>) se dele sa apsorbancijom kontrolnog uzorka gde ćelije rastu same u hranljivom medijumu (A<sub>k</sub>), te pomnože sa 100 (*jednačina 1*). Potrebno je naglasiti da se apsorbancija slepe probe (A<sub>s</sub>) uvek oduzima od apsorbancije koja se odnosi na uzorke odgovarajućih ćelijskih uzoraka.

$$S (\%) = \frac{A_t - A_s}{A_k - A_s} \times 100 \quad (\text{jednačina 1})$$

IC<sub>50</sub> vrednost je definisana kao koncentracija ispitivanog jedinjenja koja inhibira preživljavanje ćelija kancera za 50% u odnosu na kontrolu. Kao pozitivna kontrola korišćen je cisplatin. Svi eksperimenti se rade u triplikatu.

#### 4.7.4. Analiza faza ćelijskog ciklusa

HeLa ćelije su zaseju u 2 mL hranljivog medijuma koji se izlije u ploče sa 6 bunara. Nakon 24 sata inkubacije na temperaturi od 37 °C, medijum se ukloni. HeLa ćelije (3 x 10<sup>5</sup> po bunaru) se tretiraju ispitivanim jedinjenjima u kompletnom hranljivom medijumu, sa izuzetkom kontrolnih ćelija u koje se doda samo svež hranljivi medijum. Inkubiranje se nastavlja u naredna 24 sata pod istim uslovima. Finalne koncentracije jedinjenja odgovaraju IC<sub>50</sub> vrednostima koje su dobijene tokom njihovog dejstva u toku 72 sata. Nakon završetka inkubiranja, svi uzorci HeLa ćelija se sakupe tripsinizacijom isperu PBS-om. Ćelije se resuspenduju u 200 µL PBS-a ohlađenog na ledu. Potom se u uzorke ćelija doda kap po kap 2 mL prethodno ohlađenog 70% etanola uz mešanje na vorteksu, te se čuvaju na -20 °C najmanje nedelju dana. Nakon ispiranja HeLa ćelija PBS-om radi uklanjanja ostatka etanola, uzorci se inkubiraju u prisustvu RNaze (100 µg/mL) na 37 °C u toku 30 min, a potom PI (40 µg/mL). Prisustvo ribonukleaza A je vrlo bitno pri analizi ćelijskog ciklusa jer se razgrađivanjem

postojećih molekula RNA sprečavaju njene interakcija sa fluorescentnom bojom propidijum jodidom, koji inače interkalira u molekul DNA.

Nakon inkubacije, uzorci HeLa ćelijske linije se analiziraju na protočnom citometru. DNA histogram se analizira korišćenjem CELLQuest softvera.

#### 4.7.5. Određivanje ciljnih kaspaza

U cilju identifikacije kaspaza uključenih u apoptotsku ćelijsku smrt indukovanu ispitivanim komponentama, određen je procenat HeLa ćelija u sub-G1 fazi ćelijskog ciklusa prethodno tretiranim inhibitorima kaspaza.

U eksperimentima su korišćeni sledeći inhibitori kaspaza: Z-DEVD-FMK (inhibitor kaspaze-3), Z-IETD-FMK (inhibitor kaspaze-8) i Z-LEHD-FMK (inhibitor kaspaze 9). Inhibitori kaspaza se rastvore u DMSO-u (10 mM rastvor), te čuvaju na  $-20$  °C do upotrebe.

HeLa ćelije se zaseju u 2 mL hranljivog medijuma u pločama sa 6 bunara. Nakon inkubacije od 24 sata na 37 °C, medijum se ukloni, te se u bunare sa kontrolnim i referentnim uzorkom doda po 1,5 mL svežeg medijuma, dok se u ostatak bunara doda ista zapremina hranljivog medijuma sa inhibitorom određene kaspaze (finalna koncentracija 40  $\mu$ M). Svi uzorci se inkubiraju u trajanju od 2 sata na 37 °C. Nakon toga se u uzorke HeLa ćelija doda 0,5 mL hranljivog medijum sa ispitivanim jedinjenjima u koncentracijama koje odgovaraju  $2IC_{50}$  vrednostima dobijenim dejstvom tokom 72 sata. U kontrolni i referentni uzorak se doda ista zapremina svežeg hranljivog medijuma. Inkubacija svih uzoraka traje 24 sata. Potom se HeLa ćelije sakupe tripsinizacijom, isperu PBS-om i fiksiraju u hladnom etanolu (70%). Fiksirane ćelije se čuvaju na  $-20$  °C najmanje 7 dana. Nakon toga se ćelije centrifugiraju (10 min na 2000 rpm), isperu PBS-om, a zatim se inkubiraju sa PBS-om u kome je rastvorena Rnaza (100  $\mu$ g/mL), 30 min na 37 °C. Na kraju se HeLa ćelije boje propidijum jodidom (40  $\mu$ g/mL). Podaci za određivanje procenta ćelija u sub-G1 fazi se prikupljaju korišćenjem protočnog citometra, a obrađuju softverskim paketom CellQuest.

#### 4.8. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti dobijenih derivata hinona

Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti sintetisanih jedinjenja, korišćeno je šest sojeva Gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), i četiri soja Gram-negativnih: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). U cilju određivanja antifungalne aktivnosti, aminokiselinski derivati hinona ispitivani su na tri soja gljivica: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) i *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Kao medijum za gajenje bakterija korišćen je Mueller-Hinton bujon (Biolab, Mađarska), dok je za gajenje kultura gljivica korišćen Sabouraud maltozni bujon (Torlak, Srbija). Pripremljeni su po uputstvu proizvođača.

##### Mueller-Hinton bujon (MHB)

MHB prah	22 g
destilovana voda	1000 mL

##### Sabouraud maltozni bujon (SMB)

SMB prah	50 g
destilovana voda	1000 mL

Podloge se zagrevaju do potpunog rastvaranja praha, a zatim autoklaviraju na 121 °C u toku 15 min.

U epruvetu sa mikrobima se dodaje po 5 mL fiziološkog rastvora.

Štok rastvor ispitivanih jedinjenja napravljen je rastvaranjem u DMSO-u, koncentracije 10 mg/mL. Kao kontrolni antibiotik širokog spektra korišćen je amikacin, dok je kao kontrolni antifungalni agens korišćen nistatin.



#### 4.8.1. Određivanje minimalne inhibitorne aktivnosti

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) sintetisanih jedinjenja određena je mikrodilucionom metodom, dvostrukim razblaženjem derivata u mikrotitar pločama. Mikrotitar ploča sadrži 96 bunara, zapremine 300  $\mu\text{L}$ , koji su poređani u 8 redova i 12 kolona.

U svaki bunar se doda po 100  $\mu\text{L}$  sveže podloge. Zatim se u svaki prvi bunar u redu doda po 100  $\mu\text{L}$  štok rastvora (10 mg/mL) ispitivanog jedinjenja. Nakon mešanja sa prethodno dodatom podlogom, 100  $\mu\text{L}$  rastvora iz prvog bunara se prebaci u drugi bunar u istom redu, pa iz drugog u treći, i tako do poslednjeg, odakle se izbaci ista zapremina rastvora. Dakle, napravi se serija dvostrukih razblaženja u svakom redu za jedno ispitivano jedinjenje. Kao pozitivna kontrola za rast bakterija korišćen je amikacin, dok je rast gljivica korišćen nistatin (1 mg/100  $\mu\text{L}$ ). S obzirom da su jedinjenja rastvorena u DMSO-u, rasvarač je korišćen kao negativna kontrola.

U svaki bunar se doda po 10  $\mu\text{L}$  bakterija ( $10^6$  ćelija po bunaru) ili gljivica ( $10^5$  spora po bunaru). Mikrotitar ploče sa bakterijama se inkubiraju na 37 °C u toku 24 sata, dok se one sa gljivicama inkubiraju na 28 °C u toku 48 sati. Najniža koncentracija jedinjenja koja inhibira rast mikroba definisana je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), odnosno minimalna koncentracija koja ne dovodi do vidljivog rasta ćelija u bunaru.

#### 4.9. *Brine shrimp* test toksičnosti

Kesica (18 g) sa liofilizovanim jajašcima *Artemia salina* dodata je u 500 mL česmenske vode, uz dodatak nekoliko zrnaca suvog kvasca. Kroz suspenziju je prodivavan vazduh pomoću pumpe tokom 48 h, uz konstantno osvetljavanje i temperaturu u rasponu od 18–20 °C. Sveže izlegnuti račici korišćeni su u daljim eksperimentima.

Svi derivati su rastvoreni u DMSO-u (1 mg/mL). Različite količine jedinjenja (1–0.01 mg) dodate su u 950  $\mu\text{L}$  veštačke morske vode sa 10–20 razvijenih račića. Finalna koncentracija DMSO-a u svakom uzorku bila je 5%. Posle 24 h osvetljavanja na sobnoj temperaturi, izbrojani su preživeli i uginuli račići. Rezultat je izražen kao procenat

uginulih račića. Daljom statističkom analizom, definisana je  $LC_{50}$  vrednost kao koncentracija koja je letalna za 50% račića. Sve probe su rađene u triplikatu.

#### 4.10. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti DPPH testom

Dobijeni derivati hinona rastvoreni su u metanolu, u koncentracijama 1 mg/100  $\mu$ L. U istom rastvaraču rastvoreno je i komercijalno jedinjenje DPPH ( $6,58 \times 10^{-5}$  M). Test je rađen u mikrotitar pločama sa 96 bunara. U svaki bunar je dodato po 100  $\mu$ L DPPH rastvora i 50  $\mu$ L metanolnog rastvora ispitivanog jedinjenja prethodno pripremljenog u deset različitih koncentracija, ili samo 50  $\mu$ L čistog metanola, kao kontrola. Nakon mešanja, rastvori su ostavljeni na sobnoj temperaturi u toku 30 min na tamnom mestu, nakon čega je mereno smanjenje apsorbancije na talasnoj dužini od 517 nm. S obzirom na to da metanolni rastvori ispitivanih jedinjenja imaju jaku boju, snimljene su apsorbance samih jedinjenja istih koncentracija koje su korišćenje sa DPPH. Askorbinska kiselina rastvorena u vodi sa koncentracijama u intervalu od 50 to 500  $\mu$ g/mL, korišćena je kao pozitivna kontrola. Svi uzorci su rađeni u triplikatu.

Procenat antioksidativne aktivnosti ispitivanih jedinjenja, računat je prema sledećoj jednačini 2:

$$I (\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{slepapropa} - A_{uzorka}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (\text{jednačina 2})$$

$A_{DPPH}$  i  $A_{slepapropa}$  predstavljaju vrednost apsorbancije samog slobodnog radikala, odnosno rastvora samih ispitivanih derivata, dok  $A_{uzorka}$  odgovara apsorbanciji DPPH nakon reakcije sa hinonskim derivatima.

Rezultat je dat kao  $IC_{50}$ , koncentracija koja smanjuje količinu početnog DPPH radikala za 50%. Izračunat je sa grafika zavisnosti procenta antioksidativne aktivnosti jedinjenja i njihovih koncentracija.

#### 4.11. Hemijske modifikacije lizozima aminokiselinskim derivatima hinona

##### 4.11.1. Uslovi modifikacija

Modifikacije lizozima iz belanceta jajeta u prisustvu aminokiselinskih derivata hinona praćene su pod različitim uslovima, odnosno u različitim medijumima i pri različitim pH vrednostima.

Prvobitno su postavljeni eksperimenti u kojima je lizozim rastvoren u 960  $\mu\text{L}$  destilovane vodi, dok su hinonski derivati rastvoreni u 240  $\mu\text{L}$  DMSO-a, metanola ili vode. Finalna koncentracija proteina je iznosila 5 mg/mL, a hinona 2 mg/mL u 20% rastvaraču ili čistoj vodi. Sve reakcione smese su sadržale ili 50 mM rastvor  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8) ili  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8,5), u zavisnosti od eksperimenta. Reakcije su se odigravale na sobnoj temperaturi tokom 48 sati uz konstantno mešanje na šejkeru, tokom čega je došlo do pojave taloga. Reakcije modifikacije se prekidaju centrifugiranjem 5 min na 14000 rpm. Supernatanti su odvojeni, te je izvršeno njihovo rasoljavanje dijalizom prema destilovanoj vodi. Talози su obrađeni tako što je svakom dodata trostruka zapremina vode, nakon čega su odvojeni rastvori podvrgnuti istom tretmanu kao i prethodno pomenuti supernatanti.

U drugoj šarži su postavljeni eksperimenti sa istim koncentracijama jedinjenja i lizozima, ali u različitim medijumima i bez dodatka baze: *i*) fosfatnom puferu (100 mM, pH 7,4), *ii*) acetatnom puferu (100 mM, pH 4,5) i *iii*) amonijačnom puferu (100 mM, pH 10). Sirove reakcione smese su obrađene na isti način kao u prethodnim slučajevima.

#### 4.11.2. SDS elektroforeza

Priprema rastvora<sup>150</sup>:

1. AA: Monomerni rastvor (30% T, 2,7% C)

(T je masa (g) akrilamida plus masa (g) bisakrilamida u 100 mL rastvora, dok je C masa (g) bisakrilamida u odnosu na zbirnu masu akrilamida i bisakrilamida. Obe vrednosti se izražavaju u procentima.)

akrilamid	58,4 g
bisakrilamid	1,6 g
destilovana voda do	200,0 mL

2. tris pH 8,8: Pufer za razdvajajući gel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)

tris	36,3 g
destilovana voda do	200,0 mL
4 M HCl do	pH 8,8

3. tris pH 6,8: Pufer za koncentrujući gel (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)

tris	6,0 g
destilovana voda do	100,0 mL
4 M HCl do	pH 6,8

4. SDS: Rastvor detergenta 10% (m/V) SDS

SDS	10,0 g
destilovana voda do	100,0 mL

5. APS: Inicijator (amonijum-persulfat) 10% m/V

APS	0,2 g
destilovana voda do	2,0 mL

6. Rastvor za nadslojevanje (2-butanol ili n-butanol zasićen vodom)
- |                         |                                 |
|-------------------------|---------------------------------|
| n-butanol ili 2-butanol | 100 mL                          |
| destilovana voda        | do postojanog donjeg sloja vode |
- Rastvor se pre upotrebe promućka i ostavi da se slojevi razdvoje.  
Koristi se gornji sloj.
7. PUZ: Pufer za obradu uzoraka
- |                              |         |
|------------------------------|---------|
| 0,5 M Tris-HCl pH 6,8        | 9,38 mL |
| 85% glicerol                 | 9,0 mL  |
| čvrst SDS                    | 1,5 g   |
| 0,1% bromfenol-plavo         | 1,5 mL  |
| komercijalni β-merkaptetanol | 3,75 mL |
| destilovana voda do          | 25,0 mL |
8. Pufer za elektroforezu (0,025 M tris, 0,192 M glicin, pH 8,3)
- |                     |        |
|---------------------|--------|
| tris                | 3,0 g  |
| glicin              | 14,4 g |
| destilovana voda do | 1 L    |
9. Rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje (50% (V/V) metanol, 10% (V/V) sirćetna kiselina)
- |                     |        |
|---------------------|--------|
| metanol             | 500 mL |
| sirćetna kiselina   | 100 mL |
| destilovana voda do | 1L     |
10. Rastvor boje (0,1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina)
- |                 |        |
|-----------------|--------|
| CBB G ili R 250 | 0,5 g  |
| rastvor 9       | 500 mL |
11. Rastvor za obezbojavanje (5% metanol, 7% sirćetna kiselina)
- |                   |       |
|-------------------|-------|
| metanol           | 50 mL |
| sirćetna kiselina | 70 mL |
| voda do           | 1 L   |

Priprema gelova:

<u>Rastvori</u>	<u>gel za razdvajanje, 10%</u>	<u>gel za koncentrovanje, 4%</u>
AA	10 mL	400 $\mu$ L
tris pH 8,8	7,5 mL	-
tris pH 6,8	-	750 $\mu$ L
destilovana voda	12,05 mL	1,8 mL
TEMED	10 $\mu$ L	8 $\mu$ L
	dezaeracija 5–10 minuta	
SDS	300 $\mu$ L	30 $\mu$ L
APS	150 $\mu$ L	15 $\mu$ L
finalna zapremina	30 mL	3 mL

Dezaerisani rastvor gela za razdvajanje se sipa između dve staklene ploče nakon čega se nadsloji rastvorom 6. Nakon što gel za razdvajanje polimerizuje, na njega se izlije rastvor gela za koncentrovanje u koji se odmah potom postavi češalj. Nakon njegove polimerizacije, češalj se pažljivo izvadi, a nastali bunari se isperu vodom. U svaki bunar se unese prethodno pripremljen uzorak.

Priprema uzoraka:

uzorak	0,5 mL
puffer za uzorke ( PUZ )	0,5 mL

Rastvor se zagreva u toku 3 min na ključalom vodenom kupatilu.

U bunare se nanese uzorci zapremine 25  $\mu$ L. Napon struje se drži na konstantnoj vrednosti od 80 V dok uzorci ne uđu u gel za razdvajanje, a zatim se voltaža povećava od 150 do 400 V sve do završetka elektroforeze.

Obrada gela nakon elektroforeze:

<u>faza</u>	<u>rastvor, broj</u>	<u>trajanje, min</u>
ispiranje	voda	1
fiksiranje	9	20
bojenje	10	20
obezbojavanje	9	20
obezbojavanje	11	preko noći

#### 4.11.3. Masena spektrometrija

Maseni spektri nemodifikovanog lizozima i lizozima nakon tretmana hinonima su snimani na hibridnom masenom spektrometru LTQ Orbitrap XL sa Acella UHPLC i easyLC II nanoLC sistemima. Uzorci su uvođeni direktnom injekcijom u aparat. Uzorci su jonizovani korišćenjem HESI (*eng.* Heated ElectroSpray Ionization) (napon jonizujućeg zračenja 4.5 kV, temperature isparivača 50 °C, protok gasa 12.00 µL/min, protok pratećeg gasa 3.00 µL/min, električni napon kapilare 42 V, temperatura kapilare 250 °C, napon jonske optike 110 V). Snimanje je rađeno u pozitivnom modu u opsegu masa od 800–2200 m/z. Podaci su skupljen i obrađeni korišćenjem softverskih paketa Xcalibur software i ToxID Automated Screening Software.

#### 4.12. Dejstvo dobijenih derivata na DNA

##### 4.12.1. Hemikalije i reagensi

Priprema rastvora:

##### 1. Pufer za rastvaranje DNA

Tris	2,42 g
destilovana voda	do 1 L

Finalno pH 7,5 se podesi osetljivom elektrodom na pH-metru pomoću 1M HCl.

2. 0,5 M EDTA

EDTA	93,05 g
destilovana voda	400 mL
10% NaOH do	pH 8,0

Rastvor se zatim razblaži destilovanom vodom do konačne zapremine od 500 mL.

3. 25X TAE (osnovni rastvor)

tris	30,25 g
glacijalna sirćetna kiselina	7,13 mL
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	12,5 mL

Dobijeni rastvor se zatim razblaži destilovanom vodom do konačne zapremine od 250 mL.

4. 1X TAE (radni rastvor)

25X TAE	4 mL
destilovana voda do	100 mL

5. Pufer za nanošenje uzoraka:

bromfenol plavo	10 mg
ksilen-cijanol	10 mg
glicerol (88%)	10 mL

6. Rastvor etidijum-bromida

etidijum-bromid (10%)	3 $\mu$ L
1X TAE do	30 mL

Svi puferski rastvori su pripremljeni u dejonizovanoj vodi i filtrirani preko filtera (0,2  $\mu$ m, Nalgene, USA). Liofilizovana, veoma polimerizovana DNA iz govedeg timusa (CT-DNA, Serva, Heidelberg) rastvorena je u Tris-u (20 mM Tris-HCl, pH 7,5) i ostavljena preko noći na 4 °C. Štok rastvor je čuvan na istoj temperaturi i ostao je stabilan nekoliko dana. Odnos UV apsorpcije na 260 i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$  1,94) ukazuje da je vodeni rastvor CT-DNA sa dovoljno niskom koncentracijom proteina. Koncentracija CT-DNA (3,12 mg/mL) određena je iz vrednosti UV apsorpcije na 260



nm korišćenjem ekstinkcionog koeficijenta  $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Rastvor CT-DNA je čuvan u frižideru.

Štok rastvori ispitivanih jedinjenja pripremljeni su njihovim rastvaranjem u DMSO-u (10 mM).

#### 4.12.2. Snimanje UV/Vis apsorpcionih spektara

Reakciona smesa finalne zapremine 1 mL sadržala je 40 mM bikarbonatni rastvor, različite zapremine ispitivanih jedinjenja (5, 10 ili 20  $\mu\text{L}$  štok rastvora) i 10  $\mu\text{L}$  rastvora CT-DNA. Inkubiranje je izvedeno na 37 °C tokom 90 minuta sa povremenim mešanjem. UV-Vis spektri su snimljeni na spektrofotometru na talasnim dužinama u opsegu od 200 do 800 nm u kvarcnoj kiveti (1,0 cm). Snimljeni su takođe i spektri samih jedinjenja u istim koncentracijama, kao i spektar same CT-DNA.

#### 4.12.3. Snimanje fluorescentnih spektara

Kompetitivne interakcije hinona i fluorescentnih jedinjenja, etidijum bromida (EB) i Hoechst 33258 (H), sa CT-DNA ispitivane su praćenjem promena u intenzitetu fluorescencije slobodne CT-DNA u rastvoru i u kompleksima sa ispitivanim jedinjenjima. U 1 mL ukupne zapremine reakcione smese se nalazilo 10  $\mu\text{L}$  CT-DNA i različite koncentracije aminokiselinskih derivata (5, 10 ili 20  $\mu\text{L}$  štok rastvora). Dodato je bikarbonatnog rastvora do ukupne zapremine od 1 mL. Reakciona smesa je inkubirana na 37 °C tokom 90 minuta uz povremeno mešanje. U svaku reakcionu smesu je dodat rastvor fluorescentnih jedinjenja, tako da je njihova finalna koncentracija iznosila 25  $\mu\text{M}$  za EB ili 28  $\mu\text{M}$  za H. Inkubiranje je produženo za narednih 20 minuta. Promene u intenzitetu fluorescencije merene su ekscitacijom na 500 nm u opsegu od 520–700 nm za EB i ekscitacijom na 350 nm u opsegu od 400–550 nm za H. Rastvori u kojima su se nalazili EB–CT-DNA i H–CT-DNA korišćeni su kao kontrola. Potrebno je naglasiti da rastvori samih hinona nisu pokazali sposobnost fluorescencije pri primenjenim uslovima.

#### 4.12.4. Snimanje CD spektara

CD spektri same CT-DNA (0,5 mM) i reakcione smese sa dve koncentracije izabranih derivata (0,25 i 0,50 mM) su snimani u bliskoj UV/VIS spektralnoj oblasti. Reakcione smese su inkubirane na 37 °C tokom 90 minuta uz povremeno mešanje. Nakon toga je temperatura uzoraka održavana na konstantnih 25 °C. Svi spektri su snimani u rasponu od 220 do 320 nm, u kivetama širine 1 mm. Podaci su prikupljeni u intervalu od 0,1 nm, pri brzini od 200 nm/min. Spektri su snimani sa tri akumulacije, nakon čega je od spektra uzorka oduzet referentni spektar bikarbonatnog pufera (40 mM, pH 8,4).

#### 4.12.5. Elektroforeza na agaroznom gelu

Plazmid pUC19 (2686 bp) je pripremljen transformacijama u hemijski kompetentnim ćelijama *Escherichia coli* soj XL1 blue. Amplifikacija klona je urađena prema protokolu za rast kultura *E. coli* preko noći u LB medijumu na 37 °C. Prečišćavanje je urađeno korišćenjem kita Qiagen Plasmid plus Maxi. DNA je rastvorena u 10 mM Tris-HCl puferu (pH 7,9) i skladištena na -20 °C. Koncentracija plazmidne DNA (460 ng/μL) je određena merenjem apsorbancije rastvora DNA na 260 nm. Jedna optička jedinica odgovara koncentraciji od 50 μg/mL dvolančane DNA.

Reakcije cepanja superuvijenog plazmida pUC19 različitim jedinjenjima (finalne koncentracije 1 mM) ispitana je inkubacijom 460 ng plazmida u 20 μL reakcione smese u 40 mM rastvoru bikarbonata (pH 8,4) na 37 °C u toku 90 minuta. Reakciona smesa je mešana na vorteksu s vremena na vreme. Reakcija je prekinuta kratkim centrifugiranjem na 10000 rpm i dodatkom 5 μL pufera za nanošenje uzorka. Uzorci (20 μL) su analizirani pomoću elektroforeze na 1% gelu pripremljenom u TAE puferu pH 8,24. Elektroforeza je izvedena pri konstantnoj voltaži (80 V) dok bromfenol plavo nije prešlo preko 75% gela. Posle elektroforeze, gel je bojen tokom 30 minuta tako što je potopljen u vodeni rastvor etidijum bromida (0,5 μg/mL).

#### 4.13. Molekulsko modelovanje

Za simulaciju DNA dokinga, korišćena je kristalna struktura dodekamera d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>, PDB ID: 3U2N<sup>151</sup> koja je pribavljena iz Banke proteinskih podataka<sup>152</sup>. Svi molekuli vode i joni, kao i ligandi su uklonjeni korišćenjem Autodock Tools 1.5.6.<sup>153</sup>

Hinonski molekuli su pripremljeni korišćenjem Maestro 10.4 iz Schrodinger Suite 2015-4.<sup>154</sup> Sve postojeće tautomerne forme na pH 7.00 ± 2.00 su generisane upotrebom Epik 3.4 iz Schrodinger Suite 2015-420<sup>155</sup>, a njihova naelektrisanja su određena u Jaguar 9.0<sup>156</sup> korišćenjem metode HF/6-31g\*. Ova naelektrisanja su upotrebljena u daljim doking simulacijama. Doking simulacije su realizovane u Autodock Vina 1.1.2.<sup>157</sup> Veličina prostora za simulaciju vezivanja (grid box) je podešena na 25×28×45 Å<sup>3</sup>, a parametar exhaustiveness na 500. Za vizuelizaciju interakcija upotrebljen je Discovery Studio Visualizer 4.5.<sup>158</sup>

## 5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije je sintetisano devet aminokiselinskih derivata prirodnog hinona avarona, kao i devet aminokiselinskih derivata avaronskog mimetika *tert*-butilhinona.

Utvrđeno je da aminokiselinski derivati avarona u većini slučajeva pokazuju jače antitumorsko dejstvo u poređenju sa polaznim jedinjenjem avaronom. Jedinjenja koja su pokazala aktivnost istog reda veličine kao i cisplatin jesu  $\beta$ -alaninski derivat prema MDA-MB-453 ( $IC_{50}$   $3,31 \pm 0,71 \mu M$ ) i valinski derivat prema K562 ( $IC_{50}$   $7,78 \pm 0,20 \mu M$ ), s tim da su oko šest puta slabije aktivna prema zdravim ćelijama pluća nego on sam.

Aminokiselinski derivati *tert*-butilhinona su pokazali slabiju antitumorsku aktivnost u poređenju sa osnovnim jedinjenjem (izuzetak je dejstvo skoro svih jedinjenja prema tumorskim ćelijama Fem-X) i cisplatinom, ali i avaronskim derivatima istih aminokiselina.

Prilikom ispitivanja mehanizma dejstva aminokiselinskih jedinjenja prema tumorskim ćelijama grlića materice (HeLa), utvrđeno je da je zaustavljanje ćelijskog ciklusa i indukovanje apoptoze mogući mehanizam dejstva, i to aktivacijom određenih kaspaza (3, 8 i 9).

Aminokiselinski derivati avarona su pokazali značajno antibiotsko dejstvo, posebno prema *M. luteus* i *E. coli* u poređenju sa osnovnim jedinjenjem. Derivati sa aromatičnim aminokiselinama u bočnom nizu, kao i valinski derivat su pokazali jače dejstvo prema nekim bakterijskim sojevima nego antibiotik amikacin. Najjače dejstvo je zabeleženo za leucinski derivat (**130**, MIK  $5,55 \mu M$ ) prema *S. aureus* i *E. coli*.

Aminokiselinski derivati *tert*-butilhinona su se pokazali kao neaktivni prema svim bakterijskim sojevima.

Antifungalno dejstvo dobijenih derivata avarona je izuzetno ako se uzme u obzir da avaron nije aktivan prema testiranim sojevima gljivica, dok su neki derivati i preko hiljadu puta aktivniji u odnosu na široko primenjeni antifungalni agens nistatin. Najjaču aktivnost su pokazali valinski (**129**, MIK  $< 2,88 \mu M$ ) i metioninski (**132**, MIK  $< 2,67$

$\mu\text{M}$ ) derivat prema *C. albicans*, dok je triptofanski derivat (**134**,  $\text{MIK} < 2,39 \mu\text{M}$ ) pokazao najbolju aktivnost prema soju *S. cerevisiae*.

Aminokiselinski derivati *tert*-butilhinona su pokazali jače antifungalno dejstvo u poređenju sa nistatinom, ali uglavnom slabije od polaznog jedinjenja.

*Brine shrimp* testom je pokazano da postoji dobra korelacija sa antileukemijskom aktivnosti kod derivata avarona, dok je ista korelacija kod derivata *tert*-butilhinona značajno slabija.

Aminokiselinski derivati nijednog hinona nisu pokazali mogućnost da modifikuju lizozim što je potvrđeno SDS elektroforezom i masenom spektrometrijom.

Apsorpcioni spektri derivata avarona, odnosno *tert*-butilhinona ukazuju na prisustvo interakcija između njih i CT-DNA. Zabeležena je pojava pomeranja apsorpcionih maksimuma nastalih kompleksa ka crvenom delu spektra uz pojavu hiperhromizma, što ukazuje na to da derivati interaguju sa dvostrukim lancem CT-DNA nekovalentnim interakcijama, i to pre vezivanjem u brazde i/ili elektrostatičkim interakcijama nego interkalacijom.

Fluorescentni spektri jedinjenja i CT-DNA u prisustvu fluorescentnih boja potvrđuju da jedinjenja smanjuju intenzitet fluorescencije etidijum-bromida (EB) i Hoechsta 33258 (H). Uzimajući u obzir rezultate i apsorpcionih i fluorescentnih spektara može se pretpostaviti da dolazi do indirektnog istiskivanja EB jer jedinjenja indukuju strukturne promene u DNA i na taj način se smanjuje afinitet vezivanja EB za DNA. Spektralni podaci ukazuju da ispitivana jedinjenja gase intenzitet fluorescencije kompleksa H-CT-DNA, što ukazuje na to da se derivati umeću u malu brazdu DNA.

Spektri cirkularnog dihroizma potvrđuju da se aminokiselinski derivati hinona vezuju u malu brazdu DNA, odnosno da nema interkalacije.

Molekulskim modelovanjem je potvrđeno da se aminokiselinski derivati hinonskih jedinjenja uklapaju u malu brazdu DNA.

Dobijeni aminokiselinski derivati hinona nemaju sposobnost da interaguju sa plazmidom pUC19, odnosno ne dovode do prekida nizova DNA.

Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti derivata ukazuju na to da su jedinjenja hvatači slobodnih radikala. Derivati avarona imaju jaču antioksidativnu aktivnost nego što je to slučaj sa aktivnostima istih aminokiselinskih derivata *tert*-

butilhinona. Najjaču aktivnost je pokazao glicinski derivat avarona (**126**) čija je jačina dejstva jednaka dejstvu vitamina C.

---

<sup>1</sup> Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. Cancer Statistics, 2017. *Ca-Cancer J. Clin.* **2017**, *67*, 7–30.

<sup>2</sup> <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> , 16. 3. 2017.

<sup>3</sup> Vogelstein, B., Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 789–799.

<sup>4</sup> (a) McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W. T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M., Franklin, R. A. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 1263–1284.

(b) Witsch, E., Sela, M., Yarden, Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*. **2010**, *25*, 85–101.

(c) Martini, M., De Santis, M. C., Braccini, L., Gulluni, F., Hirsch, E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann. Med.* **2014**, *46* (6), 372–383.

<sup>5</sup> (a) Sherr, C. J. Principles of tumor suppression. *Cell* **2004**, *116*, 235–246.

(b) Sun, W., Yang, J. Functional mechanisms for human tumor suppressors. *J. Cancer* **2010**, *1*, 136–140.

<sup>6</sup> (a) Meek, D. W. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem. J.* **2015**, *469*, 325–346.

(b) Dick, F. A., Rubin, S. M. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 297–306.

<sup>7</sup> Letai, A. G. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 121–132.

<sup>8</sup> Maciejowski, J., de Lange, T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 175–186.

- 
- <sup>9</sup> Hoff, P. M., Machado, K. K. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, *38*, 825–833.
- <sup>10</sup> Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., Sharma, V. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: a review. *J. Clin. Diagn. Res.* **2015**, *9*, XE01–XE05.
- <sup>11</sup> Leber, M. F., Efferth, T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *Int. J. Oncol.* **2009**, *34* (4), 881–895.
- <sup>12</sup> (a) Guan, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 402–418.
- (b) Steeg, P. S. Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 201–218.
- <sup>13</sup> Djamgoz, M. B., Coombes, R. C., Schwab, A. Ion transport and cancer: from initiation to metastasis. *Philos. Trans. R. Soc., B* **2014**, *369*, 20130092.
- <sup>14</sup> (a) Wang, P., Yang, H. L., Yang, Y. J., Wang, L., Lee, S. C. Overcome cancer cell drug resistance using natural products. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, *2015*, 767136.
- (b) Eid, S. Y., El-Readi, M. Z., Fatani, S. H., Nour Eldin, E. E. M., Wink, M. Natural products modulate the multifactorial multidrug resistance of cancer. *Pharmacol. Pharm.* **2015**, *6*, 146–176.
- (c) Aung, T. N., Qu, Z., Kortschak, R. D., Adelson, D. L. Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 656.
- <sup>15</sup> Lenaz, G., Genova, M. L. Mobility and function of coenzyme Q (ubiquinone) in the mitochondrial respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2009**, *1787*, 563–573.
- <sup>16</sup> (a) Saini, R. Coenzyme Q10: the essential nutrient. *J. Pharm. BioAllied Sci.* **2011**, *3*, 466–467.
- (b) Acosta, M. J., Vazquez Fonseca, L., Desbats, M. A., Cerqua, C., Zordan, R., Trevisson, E., Salviati, L. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2016**, *1857*, 1079–1085.



- 
- <sup>17</sup> Shearer, M. J., Fu, X., Booth, S. L. Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research. *Adv. Nutr.* **2012**, *3*, 182–195.
- <sup>18</sup> Ju, C., Uetrecht, J. P. Detection of 2-hydroxyiminostilbene in the urine of patients taking carbamazepine and its oxidation to a reactive iminoquinone intermediate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *288*, 51–56.
- <sup>19</sup> Cuttle, L., Munns, A. J., Hogg, N. A., Scott, J. R., Hooper, W. D., Dickinson, R. G., Gillam, E. M. Phenytoin metabolism by human cytochrome P450: involvement of P450 3A and 2C forms in secondary metabolism and drug-protein adduct formation. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 945–950.
- <sup>20</sup> Chowdhury, G., Shibata, N., Yamazaki, H., Guengerich, F.P. Human cytochrome P450 oxidation of 5-hydroxythalidomide and pomalidomide, an amino analogue of thalidomide. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 147–156.
- <sup>21</sup> (a) Smith, R. A., Murphy, M. P. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1201*, 96–103.
- (b) Kumar, A., Singh, A. A review on mitochondrial restorative mechanism of antioxidants in Alzheimer's disease and other neurological conditions. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 206.
- <sup>22</sup> Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., Monks, T. J. Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 135–160.
- <sup>23</sup> Colucci, M. A., Moody, C. J., Couch, G. D. Natural and synthetic quinones and their reduction by the quinone reductase enzyme NQO1: from synthetic organic chemistry to compounds with anticancer potential. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 637–656.
- <sup>24</sup> Monks, T. J., Jones, D. C. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. *Curr. Drug Metab.* **2002**, *3*, 425–438.
- <sup>25</sup> Bolton, J. L., Dunlap, T. Formation and biological targets of quinones: cytotoxic versus cytoprotective Effects. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30*, 13–37.

- 
- <sup>26</sup> Forman, H. J., Zhang, H., Rinna, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 1–12.
- <sup>27</sup> Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., Dowd, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* **2001**, *360*, 1–16.
- <sup>28</sup> Reigan, P., Siegel, D., Guo, W., Ross, D. A mechanistic and structural analysis of the inhibition of the 90-kDa heat shock protein by the benzoquinone and hydroquinone ansamycins. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *79*, 823–832.
- <sup>29</sup> (a) Sridhar, J., Liu, J., Foroozesh, M., Klein Stevens, C. L. Inhibition of cytochrome p450 enzymes by quinones and anthraquinones. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 357–365.
- (b) Landa, P., Kutil, Z., Temml, V., Vuorinen, A., Malik, J., Dvorakova, M., Marsik, P., Kokoska, L., Pribylova, M., Schuster, D., Vanek, T. Redox and non-redox mechanism of in vitro cyclooxygenase inhibition by natural quinones. *Planta Med.* **2012**, *78*, 326–333.
- <sup>30</sup> (a) Smythies, J., Galzigna, L. The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**, *1380*, 159–162.
- (b) Parkinson, E. I., Hergenrother, P. J. Deoxyneboquinones as NQO1-activated cancer therapeutics. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2715–2723.
- (c) Balyan, R., Kudugunti, S. K., Hamad, H. A., Yousef, M. S., Moridani, M. Y. Bioactivation of luteolin by tyrosinase selectively inhibits glutathione S-transferase. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *240*, 208–218.
- <sup>31</sup> (a) Sumi, D., Numasawa, Y., Endo, A., Iwamoto, N., Kumagai, Y. Catechol estrogens mediated activation of Nrf2 through covalent modification of its quinone metabolite to Keap1. *J. Toxicol. Sci.* **2009**, *34*, 627–635.
- (b) Dong, G. Z., Oh, E. T., Lee, H., Park, M. T., Song, C. W., Park, H. J. Beta-lapachone suppresses radiation-induced activation of nuclear factor-kappaB. *Exp. Mol. Med.* **2010**, *42*, 327–334.

- 
- <sup>32</sup> Penning, T. M., Burczynski, M. E., Hung, C. F., McCoull, K. D., Palackal, N. T., Tsuruda, L. S. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 1–18.
- <sup>33</sup> (a) Penning, T. M. Human aldo-keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27*, 1901–1917.  
(b) Dong, H., Shi, Q., Song, X., Fu, J., Hu, L., Xu, D., Su, C., Xia, X., Song, E., Song, Y. Polychlorinated biphenyl quinone induces oxidative DNA damage and repair responses: The activations of NHEJ, BER and NER via ATM-p53 signaling axis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *286*, 10–16.
- <sup>34</sup> (a) Park, J. H., Troxel, A. B., Harvey, R. G., Penning, T. M. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the aldo-keto-reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 719–728.  
(b) Park, J. H., Mangal, D., Tacka, K. A., Quinn, A. M., Harvey, R.G., Blair, I. A., and Penning, T. M. Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol activation in human lung A549 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 6846–6851.
- <sup>35</sup> Park, J. H., Gelhaus, S., Vedantam, S., Oliva, A. L., Batra, A., Blair, I. A., Troxel, A. B., Field, J., Penning, T. M. The pattern of p53 mutations caused by PAH o-quinones is driven by 8-oxo-dGuo formation while the spectrum of mutations is determined by biological selection for dominance. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1039–1049.
- <sup>36</sup> Yue, W., Yager, J. D., Wang, J. P., Jupe, E. R., Santen, R. J. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* **2013**, *78*, 161–170.
- <sup>37</sup> (a) Brown, N. S., Bicknell, R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2001**, *3*, 323–327.

---

(b) Yager, J. D., Davidson, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **2006**, 354, 270–282.

<sup>38</sup> (a) Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. Depurinating estrogen-DNA adducts, generators of cancer initiation: their minimization leads to cancer prevention. *Clin. Transl. Med.* **2016**, 5, 12.

(b) Zahid, M., Saeed, M., Yang, L., Beseler, C., Rogan, E., Cavalieri, E. L. Formation of dopamine quinone–DNA adducts and their potential role in the etiology of Parkinson’s disease. *IUBMB Life* **2011**, 63, 1087–1093.

<sup>39</sup> (a) Wu, Q., Fang, J., Li, S., Wei, J., Yang, Z., Zhao, H., Zhao, C., Cai, Z. Interaction of bisphenol A 3,4-quinone metabolite with glutathione and ribonucleosides/deoxyribonucleosides in vitro. *J. Hazard. Mater.* **2017**, 323, 195–202.

(b) McCoull, K. D., Rindgen, D., Blair, I. A., Penning, T. M. Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, 12, 237–246.

<sup>40</sup> (a) Wang, P., Gao, J., Li, G., Shimelis, O., Giese, R. W. Nontargeted analysis of DNA adducts by mass-tag MS: reaction of pbenzoquinone with DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25, 2737–2743.

(b) Xie, Z., Zhang, Y., Guliaev, A. B., Shen, H., Hang, B., Singer, B., Wang, Z. The p-benzoquinone DNA adducts derived from benzene are highly mutagenic. *DNA Repair* **2005**, 4, 1399–1409.

<sup>41</sup> Cavalieri, E., Saeed, M., Zahid, M., Cassada, D., Snow, D., Miljkovic, M., Rogan E. Mechanism of DNA depurination by carcinogens in relation to cancer initiation. *IUBMB Life* **2012**, 64, 169–79.

<sup>42</sup> Pizzimenti, S., Ciamporcero, E., Daga, M., Pettazzoni, P., Arcaro, A., Cetrangolo, G., Minelli, R., Dianzani, C., Lepore, A., Gentile, F., Barrera, G. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front. Physiol.* **2013**, 4, 242.

<sup>43</sup> (a) Shichiri, M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2014**, 54, 151–160.

---

(b) Negre-Salvayre, A., Auge, N., Ayala, V., Basaga, H., Boada, J., Brenke, R., Chapple, S., Cohen, G., Feher, J., Grune, T., Lengyel, G., Mann, G. E., Pamplona, R., Poli, G., Portero-Otin, M., Riahi, Y., Salvayre, R., Sasson, S., Serrano, J., Shamni, O., Siems, W., Siow, R. C., Wiswedel, I., Zarkovic, K., Zarkovic, N. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radical Res.* **2010**, *44*, 1125–1171.

(c) Nam, T. G. Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicol. Res.* **2011**, *27*, 1–6.

<sup>44</sup> <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>, poslednja poseta 21. 6. 2017.

<sup>45</sup> Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.* **2014**, *10*, 853–858.

<sup>46</sup> Gewirtz, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727–741.

<sup>47</sup> Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., Henikoff, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1845*, 84–89.

<sup>48</sup> Eizaguirre, A., Yáñez, M., Eriksson, L. A. Stability and iron coordination in DNA adducts of anthracycline based anti-cancer drugs. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 12505–12514.

<sup>49</sup> Wakaki, S., Marumo, H., Tomioka, K., Shimizu, G., Kato, E., Kamada, H., Kudo, S., Fujimoto, Y. Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. *Antibiot. Chemother. (Northfield)*. **1958**, *8*, 228–240.

<sup>50</sup> Paz, M. M. Antitumour Antibiotics. In *Anticancer Therapeutics* (Missailidis, S., Ed.), John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom, **2008**, pp. 112–115.

<sup>51</sup> (a) Tomasz, M. Mitomycin C: Small, fast and deadly (but very selective). *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 575–579.

---

(b) Tomasz, M., Palom, Y. The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *76*, 73–87.

<sup>52</sup> Wang, Y., Gray, J. P., Mishin, V., Heck, D. E., Laskin, D. L., Laskin, J. D. Distinct roles of cytochrome P450 reductase in mitomycin C redox cycling and cytotoxicity. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 1852–1863.

<sup>53</sup> Hoey, B. M., Butler, J., Swallow, A. J. Reductive activation of mitomycin C. *Biochemistry* **1988**, *27*, 2608–2614.

<sup>54</sup> Palom, Y., Suresh Kumar, G., Tang, L. Q., Paz, M. M., Musser, S. M., Rockwell, S., Tomasz, M. Relative toxicities of DNA cross-links and monoadducts: new insights from studies of decarbamoyl mitomycin C and mitomycin C. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1398–1406.

<sup>55</sup> (a) Sharma, M., Tomasz, M. Conjugation of glutathione and other thiols with bioreductively activated mitomycin C. Effect of thiols on the reductive activation rate. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 390–400.

(b) Sharma, M., He, Q. Y., Tomasz, M. Effects of glutathione on alkylation and cross-linking of DNA by mitomycin C. Isolation of a ternary glutathione–mitomycin–DNA adduct. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 401–407.

(c) Snodgrass, R. G., Collier, A. C., Coon, A. E., Pritsos, C. A. Mitomycin C inhibits ribosomal RNA: A novel cytotoxic mechanism for bioreductive drugs. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19068–19075.

<sup>56</sup> (a) Celli, C. M., Jaiswal, A. K. Role of GRP58 in mitomycin C-induced DNA cross-linking. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6016–6025.

(b) Adikesavan, A. K., Jaiswal, A. K. Thioredoxin-like domains required for glucose regulatory protein 58 mediated reductive activation of mitomycin C leading to DNA cross-linking. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2719–2727.

<sup>57</sup> (a) Paz, M. M. Reductive activation of mitomycin C by thiols: kinetics, mechanism, and biological implications. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1663–1668.

---

(b) Paz, M. M. Cross-linking of dithiols by mitomycin C. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1384–1392.

<sup>58</sup> Paz, M. M., Zhang, X., Lu, J., Holmgren, A. A new mechanism of action for the anticancer drug mitomycin C: mechanism-based inhibition of thioredoxin reductase. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1502–1511.

<sup>59</sup> Zhong, L., Arnér, E. S. J., Holmgren, A. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 5854–5859.

<sup>60</sup> (a) Yoo, M. H., Xu, X. M., Carlson, B. a, Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L. Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 13005–13008.

(b) Rigobello, M. P., Gandin, V., Folda, A., Rundlöf, A. K., Fernandes, A. P., Bindoli, A., Marzano, C., and Björnstedt, M. Treatment of human cancer cells with selenite or tellurite in combination with auranofin enhances cell death due to redox shift. *Free Radical Biol. Med.* **2009**, *47*, 710–721.

<sup>61</sup> Rao, K. V., Cullen, W. P. Streptonigrin, an antitumor substance. I. Isolation and characterization. *Antibiot. Annu.* **1959–1960**, *7*, 950–953.

<sup>62</sup> Rao, K. V., Biemann, K., Woodward, R. B. The structure of streptonigrin. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2532–2533.

<sup>63</sup> (a) Chiu, Y. Y., Lipscomb, W. N. Molecular and crystal structure of streptonigrin. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 2525–2530.

(b) Harding, M. M., Long, G. V., Brown, C. L. Solution conformation of the antitumor drug streptonigrin. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3056–3060.

<sup>64</sup> (a) Reilly, H. C., Sugiura, K. An antitumor spectrum of streptonigrin. *Antibiot. Chemother.* **1961**, *11*, 174–177.

(b) Beall, H. D., Murphy, A. M., Siegel, D., Hargreaves, R. H., Butler, J., Ross, D. Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate): quinone oxidoreductase (DT-

---

diaphorase) as a target for bioreductive antitumor quinones: quinone cytotoxicity and selectivity in human lung and breast cancer cell lines. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 499–504.

<sup>65</sup> Davis, H. L. Jr, von Hoff, D. D., Henney, J. E., Rozenzweig, M. The role of antitumor antibiotics in current oncologic practice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1978**, *1*, 83–90.

<sup>66</sup> Bolzán, A. D., Bianchi, M. S. Genotoxicity of streptonigrin: a review. *Mutat. Res.* **2001**, *488*, 25–37.

<sup>67</sup> (a) Levine, M., Borthwick, M. The action of streptonigrin on bacterial DNA metabolism and on induction of phage production in lysogenic bacteria. *Virology* **1963**, *21*, 568–574.

(b) Lown, J. W., Sim, S. K. Studies related to antitumor antibiotics. Part VIII. Cleavage of DNA by streptonigrin analogues and the relationship to antineoplastic activity. *Can. J. Biochem.* **1976**, *54*, 446–452.

(c) Cone, R., Hasan, S. K., Lown, J. W., Morgan, A. R. The mechanism of the degradation of DNA by streptonigrin. *Can. J. Biochem.* **1976**, *54*, 219–223.

(d) Beall, H. D., Liu, Y., Siegel, D., Bolton, E. M., Gibson, N. W., Ross, D. Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) in cytotoxicity and induction of DNA damage by streptonigrin. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51*, 645–652.

<sup>68</sup> (a) Ross, D., Beall, H., Traver, R. D., Siegel, D., Phillips, R. M., Gibson, N. W. Bioactivation of quinones by DT-diaphorase, molecular, biochemical, and chemical studies. *Oncol. Res.* **1994**, *6*, 493–500.

(b) Sharp, S. Y., Kelland, L. R., Valenti, M. R., Brunton, L. A., Hobbs, S., Workman, P. Establishment of an isogenic human colon tumor model for NQO1 gene expression: application to investigate the role of DT-diaphorase in bioreductive drug activation *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 1146–1155.

<sup>69</sup> Kremer, W. B., Laszlo, J. Comparison of biochemical effects of isopropylidene azastreptonigrin (NSC-62709) with streptonigrin (NSC-45383). *Cancer Chemother. Rep.* **1967**, *51*, 19–24.



- 
- <sup>70</sup> (a) Gutteridge, J. M. Streptonigrin-induced deoxyribose degradation: inhibition by superoxide dismutase, hydroxyl radical scavengers and iron chelators. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 3059–3062.
- (b) Testoni, M. I., Bolzán, A. D., Bianchi, M. S., Bianchi, N. O. Effects of antioxidants on streptonigrin-induced DNA damage and clastogenesis in CHO cells. *Mutat. Res.* **1997**, *373*, 201–206.
- <sup>71</sup> Dreyton, C. J., Anderson, E. D., Subramanian, V., Boger, D. L., Thompson, P. R. Insights into the mechanism of streptonigrin-induced protein arginine deiminase inactivation. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1362–1369.
- <sup>72</sup> (a) Arai, M., Kobayashi, M. Chemical biology of marine natural products. *Kagaku to Seibutsu* **2009**, *47*, 275–282.
- (b) Glaser, K. B., Mayer, A. M. S. A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 440–448.
- (c) Raviña, E. The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs; Wiley-WCH: Weinheim, Germany, **2010**.
- (d) Bailly, C. Ready for comeback of natural products in oncolology. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 1447–1457.
- (e) Cragg, G. M., Grothaus, P. G., Newman, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3012–3043.
- (f) Gordaliza, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol.* **2007**, *9*, 767–776.
- (g) Cimino, G., De Rosa, S., De Stefano, S., Cariello, L., Zanetti, L. Structure of two biologically active sesquiterpenoid amino-quinones from de marine sponge *Dysidea avara*. *Experientia* **1982**, *38*, 896.
- (h) Cozzolino, R., De Giulio, A., De Rosa, S., Strazzullo, G., Gašič, M. J., Sladić, D., Zlatović, M. Biological activities of avarol derivatives, 1. Amino derivatives. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 699–702.
- (i) Müller, W. E. G., Maidhof, A., Zahn, R. K., Schröder, H. C. M., Gasic, M. J., Heidemann, D., Bernd, A., Kurelec, B., Eich, E., Seibert, G. Potent antileukemic activity of the novel cytostatic agent avarone and its analogues in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 4822–4826.

(j) Müller, W. E. G., Sobel, C., Sachsse, W., Diehl-Seifert, B., Zahn, R. K., Eich, E., Kljajić, Z., Schröder, H. C. Biphasic and differential effects of the cytostatic agents avarone and avarol on DNA metabolism of human and murine T and B lymphocytes. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1986**, *22*, 473–476.

(k) Müller, W. E. G., Sobel, C., Diehl-Seifert, B., Maidhof, A., Schöder, H. C. Influence of the antileukemic and anti-human immunodeficiency virus agent avarol on selected immune responses in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 1489–1494.

(l) Sarin, P. S., Sun, D., Thornton, A., Müller, W. E. G. Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus/lymphadenopathyassociated virus) by avarol and avarone. *J. Natl. Cancer Inst.* **1987**, *78*, 663–666.

<sup>73</sup> Lee, H. Y., Chung, K. J., Hwang, I. H., Gwak, J., Park, S., Ju, B. G., Yun, E., Kim, D. E., Chung, Y. H., Na, M., Song, G. Y., Oh, S. Activation of p53 with ilimaquinone and ethylsmenoquinone, marine sponge metabolites, induces apoptosis and autophagy in colon cancer cells. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 543–557.

<sup>74</sup> Guzmán, F. S., Copp, B. R., Mayne, C. L., Concepcion, G. P., Mangalindan, G. C., Barrows, L. R., Ireland, C. M. Bolinaquinone: a novel cytotoxic sesquiterpene hydroquinone from Philippine *Dysidea* sponge. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8042–8044.

<sup>75</sup> Jiao, W. H., Huang, X. J., Yang, J. S., Yang, F., Piao, S. J., Gao, H., Li, J., Ye, W. C., Yao, X. S., Chen, W. S., Lin, H. W. Dysidavarones A–D, new sesquiterpene quinones from the marine sponge *Dysidea avara*. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 202–205.

<sup>76</sup> Schmalzbauer, B., Herrmann, J., Müller, R., Menche, D. Total synthesis and antibacterial activity of dysidavarone A. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 964–967.

<sup>77</sup> Jiao, W. H., Xu, T. T., Yu, H. B., Chen, G. D., Huang, X. J., Yang, F., Li, Y. S., Han, B. N., Liu, X. Y., Lin, H. W. Dysideanones A–C, unusual sesquiterpene quinones from the South China Sea sponge *Dysidea avara*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 346–350.

<sup>78</sup> Jiao, W. H., Xu, T. T., Yu, H. B., Mu, F. R., Li, J., Li, Y. S., Yang, F., Hana, B. N., Lin, H. W. Dysidaminones A–M, cytotoxic and NF-κB inhibitory sesquiterpene

---

aminoquinones from the South China Sea sponge *Dysidea fragilis*. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 9236–9246.

<sup>79</sup> Sakurai, J., Oguchi, T., Watanabe, K., Abe, H., Kanno, S., Ishikawa, M., Katoh, T. Highly efficient total synthesis of the marine natural products (+)-avarone, (+)-avarol, (-)-neoavarone, (-)-neoavarol and (+)-aureol. *Chemistry* **2008**, *14*, 829–837.

<sup>80</sup> Jiao, W. H., Xu, T. T., Gu, B. B., Shi, G. H., Zhu, Y., Yang, F., Han, B. N., Wang, S. P., Li, Y. S., Zhang, W., Lid, J., Lin, H. W. Bioactive sesquiterpene quinols and quinones from the marine sponge *Dysidea avara*. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 87730–87738.

<sup>81</sup> Jiao, W. H., Xu, T. T., Zhao, F., Gao, H., Shi, G. H., Wang, J., Hong, L. L., Yu, H. B., Li, Y. S., Yang, F., Lin, H. W. Dysifragilones A–C, unusual sesquiterpene aminoquinones and inhibitors of NO production from the South China Sea sponge *Dysidea fragilis*. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *5*, 960–966.

<sup>82</sup> Jiao, W. H., Shi, G. H., Xu, T. T., Chen, G. D., Gu, B. B., Wang, Z., Peng, S., Wang, S. P., Li, J., Han, B. N., Zhang, W., Lin, H. W. Dysiherbols A–C and dysideanone E, cytotoxic and NF- $\kappa$ B inhibitory tetracyclic meroterpenes from a *Dysidea* sp. marine sponge. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 406–411.

<sup>83</sup> Utkina, N. K., Denisenko, V. A., Krasokhin, V. B. Sesquiterpenoid aminoquinones from the marine sponge *Dysidea* sp. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 788–791.

<sup>84</sup> Kim, C. K., Woo, J. K., Kim, S. H., Cho, E., Lee, Y. J., Lee, H. S., Sim, C. J., Oh, D. C., Oh, K. B., Shin, J. Meroterpenoids from a tropical *Dysidea* sp. sponge. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2814–2821.

<sup>85</sup> Shigemori, H., Madono, T., Sasaki, T., Mikami, Y., Kobayashi, J. Nakijiquinones A and B, new antifungal sesquiterpenoid quinones with an amino acid residue from an Okinawan marine sponge. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 8347–8354.

<sup>86</sup> Kobayashi, J., Madono, T., Shigemori, H. Nakijiquinones C and D, new sesquiterpenoid quinones with a hydroxy amino acid residue from a marine sponge inhibiting c-erbB-2 kinase. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10867–10874.

- <sup>87</sup> Takahashi, Y., Kubota, T., Ito, J., Mikami, Y., Fromont, J., Kobayashi, J. Nakijiquinones G–I, new sesquiterpenoid quinones from marine sponge. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7561–7564.
- <sup>88</sup> Takahashi, Y., Ushio, M., Kubota, T., Yamamoto, S., Fromont, J., Kobayashi, J. Nakijiquinones J–R, sesquiterpenoid quinones with an amine residue from okinawan marine sponges. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 467–471.
- <sup>89</sup> Schulz, D., Beese, P., Ohlendorf, B., Erhard, A., Zinecker, H., Dorador, C., Imhoff, J. F. Abenquines A–D: aminoquinone derivatives produced by *Streptomyces* sp. strain DB634. *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 763–768.
- <sup>90</sup> Houslay, M. D., Schafer, P., Zhang, K. Y. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1503–1519.
- <sup>91</sup> Nain-Perez, A., Barbosa, L. C. A., Maltha, C. R. A., Forlani, G. First total synthesis and phytotoxic activity of *Streptomyces* sp. metabolites abenquines. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 1811–1814.
- <sup>92</sup> Nain-Perez, A., Barbosa, L. C., Rodríguez-Hernández, D., Kramell, A. E., Heller, L., Csuk, R. Natural abenquines and synthetic analogues: preliminary exploration of their cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1141–1144.
- <sup>93</sup> Thimmegowda, N. R., Park, C., Shwetha, B., Sakchaisri, K., Liu, K., Hwang, J., Lee, S., Jeong, S. J., Soung, N. K., Jang, J. H., Ryoo, I. J., Ahn, J. S., Erikson, R. L., Kim, B. Y. Synthesis and antitumor activity of natural compound aloe emodin derivatives. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *85*, 638–644.
- <sup>94</sup> Valderrama, J. A., Delgado, V., Sepúlveda, S., Benites, J., Theoduloz, C., Buc Calderon, P., Muccioli, G. G. Synthesis and cytotoxic activity on human cancer cells of novel isoquinolinequinone-amino acid derivatives. *Molecules* **2016**, *21*, 1199.
- <sup>95</sup> Bhide, R. S., Cai, Z. W., Zhang, Y. Z., Qian, L., Wei, D., Barbosa, S., Lombardo, L. J., Borzilleri, R. M., Zheng, X., Wu, L. I., Barrish, J. C., Kim, S. H., Leavitt, K., Mathur, A., Leith, L., Chao, S., Wautlet, B., Mortillo, S., Jeyaseelan, R. Sr, Kukral, D., Hunt, J. T., Kamath, A., Fura, A., Vyas, V., Marathe, P., D'Arienzo, C., Derbin, G.,

Fargnoli, J. Discovery and preclinical studies of (R)-1-(4-(4-fluoro-2-methyl-1H-indol-5-yloxy)-5-methylpyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-yloxy)propan-2-ol (BMS-540215), an in vivo active potent VEGFR-2 inhibitor. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2143–2146.

<sup>96</sup> (a) Huynh, H., Ngo, V. C., Fargnoli, J., Ayers, M., Soo, K. C., Koong, H. N., Thng, C. H., Ong, H. S., Chung, A., Chow, P., Pollock, P., Byron, S., Tran, E. Brivanib alaninate, a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases, induces growth inhibition in mouse models of human hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6146–6153.

(b) Desai, J. R., Ochoa, S., Prins, P. A., He, A. R. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: an update. *J. Gastrointest. Oncol.* **2017**, *8*, 243–255.

(c) Siu, L. L., Shapiro, J. D., Jonker, D. J., Karapetis, C. S., Zalcberg, J. R., Simes, J., Couture, F., Moore, M. J., Price, T. J., Siddiqui, J., Nott, L. M., Charpentier, D., Liauw, W., Sawyer, M. B., Jefford, M., Magoski, N. M., Haydon, A., Walters, I., Ringash, J., Tu, D., O'Callaghan, C. J. Phase III randomized, placebo-controlled study of cetuximab plus brivanib alaninate versus cetuximab plus placebo in patients with metastatic, chemotherapy-refractory, wild-type K-RAS colorectal carcinoma: the NCIC Clinical Trials Group and AGITG CO.20 Trial. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 2477–2484.

<sup>97</sup> Diaz-Padilla, I., Siu, L. L. Brivanib alaninate for cancer. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2011**, *20*, 577–586.

<sup>98</sup> Cai, Z. W., Zhang, Y., Borzilleri, R. M., Qian, L., Barbosa, S., Wei, D., Zheng, X., Wu, L., Fan, J., Shi, Z., Wautlet, B. S., Mortillo, S., Jeyaseelan, R. Sr., Kukral, D. W., Kamath, A., Marathe, P., D'Arienzo, C., Derbin, G., Barrish, J. C., Robl, J. A., Hunt, J. T., Lombardo, L. J., Fargnoli, J., Bhide, R. S. Discovery of brivanib alaninate ((S)-((R)-1-(4-(4-fluoro-2-methyl-1H-indol-5-yloxy)-5-methylpyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-yloxy)propan-2-yl)2-aminopropanoate), a novel prodrug of dual vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 kinase inhibitor (BMS-540215). *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1976–1980.

<sup>99</sup> Marathe, P. H., Kamath, A. V., Zhang, Y., D'Arienzo, C., Bhide, R., Fargnoli, J. Preclinical pharmacokinetics and in vitro metabolism of brivanib (BMS-540215), a

potent VEGFR2 inhibitor and its alanine ester prodrug brivanib alaninate. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2009**, *65*, 55–66.

<sup>100</sup> Gong, J., Gan, J., Caceres-Cortes, J., Christopher, L. J., Arora, V., Masson, E., Williams, D., Pursley, J., Allentoff, A., Lago, M., Tran, S. B., Iyer, R. A. Metabolism and disposition of [<sup>14</sup>C]brivanib alaninate after oral administration to rats, monkeys, and humans. *Drug Metab. Dispos.* **2011**, *39*, 891–903.

<sup>101</sup> (a) Gingrich, D. E., Reddy, D. R., Iqbal, M. A., Singh, J., Aimone, L. D., Angeles, T. S., Albom, M., Yang, S., Ator, M. A., Meyer, S. L., Robinson, C., Ruggeri, B. A., Dionne, C. A., Vaught, J. L., Mallamo, J. P., Hudkins, R. L. A new class of potent vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: structure-activity relationships for a series of 9-alkoxymethyl-12-(3-hydroxypropyl)indeno[2,1-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5-ones and the identification of CEP-5214 and its dimethylglycine ester prodrug clinical candidate CEP-7055. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5375–5388.

(b) Ruggeri, B., Singh, J., Gingrich, D., Angeles, T., Albom, M., Yang, S., Chang, H., Robinson, C., Hunter, K., Dobrzanski, P., Jones-Bolin, S., Pritchard, S., Aimone, L., Klein-Szanto, A., Herbert, J. M., Bono, F., Schaeffer, P., Casellas, P., Bourie, B., Pili, R., Isaacs, J., Ator, M., Hudkins, R., Vaught, J., Mallamo, J., Dionne, C. CEP-7055: a novel, orally active pan inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5978–5991.

<sup>102</sup> Jones-Bolin, S., Zhao, H., Hunter, K., Klein-Szanto, A., Ruggeri, B. The effects of the oral, pan-VEGF-R kinase inhibitor CEP-7055 and chemotherapy in orthotopic models of glioblastoma and colon carcinoma in mice. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1744–1753.

<sup>103</sup> (a) Cundy, K. C., Branch, R., Chernov-Rogan, T., Dias, T., Estrada, T., Hold, K., Koller, K., Liu, X., Mann, A., Panuwat, M., Raillard, S. P., Upadhyay, S., Wu, Q. Q., Xiang, J. N., Yan, H., Zerangue, N., Zhou, C. X., Barrett, R. W., Gallop, M. A. XP13512 [(+/-)-1-[(alpha-isobutanoyloxyethoxy)carbonyl] aminomethyl]-1-cyclohexane acetic acid], a novel gabapentin prodrug: I. Design, synthesis, enzymatic

---

conversion to gabapentin, and transport by intestinal solute transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *311*, 315–323.

(b) Lal, R., Sukbuntherng, J., Tai, E. H., Upadhyay, S., Yao, F., Warren, M. S., Luo, W., Bu, L., Nguyen, S., Zamora, J., Peng, G., Dias, T., Bao, Y., Ludwikow, M., Phan, T., Scheuerman, R. A., Yan, H., Gao, M., Wu, Q. Q., Annamalai, T., Raillard, S. P., Koller, K., Gallop, M. A., Cundy, K. C. Arbaclofen placarbil, a novel R-baclofen prodrug: improved absorption, distribution, metabolism, and elimination properties compared with R-baclofen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *330*, 911–921.

<sup>104</sup> Tsuda, M., Terada, T., Irie, M., Katsura, T., Niida, A., Tomita, K., Fujii, N., Inui, K. Transport characteristics of a novel peptide transporter 1 substrate, antihypertensive drug midodrine, and its amino acid derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *318*, 455–460.

<sup>105</sup> Cruz, D. N. Midodrine: a selective alpha-adrenergic agonist for orthostatic hypotension and dialysis hypotension. *Expert Opin. Pharmacother.* **2000**, *1*, 835–840.

<sup>106</sup> Goodman, D. W. Lisdexamfetamine dimesylate (vyvanse), a prodrug stimulant for attention-deficit/hyperactivity disorder. *P&T* **2010**, *35*, 273–287.

<sup>107</sup> Pennick, M. Absorption of lisdexamfetamine dimesylate and its enzymatic conversion to d-amphetamine. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2010**, *6*, 317–327.

<sup>108</sup> Elia, J., Easley, C., Kirkpatrick, P. Lisdexamfetamine dimesylate. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 343–344.

<sup>109</sup> Hemenway, J. N., Jarho, P., Henri, J. T., Nair, S. K., VanderVelde, D., Georg, G. I., Stella, V. J. Preparation and physicochemical characterization of a novel water-soluble prodrug of carbamazepine. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 1810–1825.

<sup>110</sup> Chrzanowski, K., Bielawska, A., Pałka J. Proline analogue of melphalan as a prodrug susceptible to the action of prolidase in breast cancer MDA-MB 231 cells. *Farmaco.* **2003**, *58*, 1113–1119.

- 
- <sup>111</sup> Wu, Z., Shah, A., Patel, N., Yuan, X. Development of methotrexate proline prodrug to overcome resistance by MDA-MB-231 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5108–5112.
- <sup>112</sup> Machado, M. G. M., Yamasaki, P. R., dos Santos, J. L., Chin, C. M. Targeted prodrug design for the treatment of malignant melanoma. *J. Dermatol. Res. Ther.* **2016**, *2*, 019.
- <sup>113</sup> Hoang, T., Kim, K., Jaslowski, A., Koch, P., Beatty, P., McGovern, J., Quisumbing, M., Shapiro, G., Witte, R., Schiller, J. H. Phase II study of second-line gemcitabine in sensitive or refractory small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2003**, *42*, 97–102.
- <sup>114</sup> Albain, K. S., Nag, S. M, Calderillo-Ruiz, G., Jordaan, J. P., Llombart, A. C., Pluzanska, A., Rolski, J., Melemed, A. S., Reyes-Vidal, J. M., Sekhon, J. S., Simms, L., O'Shaughnessy, J. Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 3950–3957.
- <sup>115</sup> Ozols, R. F. Gemcitabine and carboplatin in second-line ovarian cancer. *Semin. Oncol.* **2005**, *32*, 4–8.
- <sup>116</sup> Shelley, M. D., Cleves, A., Wilt, T. J., Mason, M. D. Gemcitabine chemotherapy for the treatment of metastatic bladder carcinoma. *BJU Int.* **2011**, *108*, 168–179.
- <sup>117</sup> Sigmond, J., Honeywell, R. J., Postma, T. J., Dirven, C. M., de Lange, S. M., van der Born, K., Laan, A. C., Baayen, J. C., Van Groeningen, C. J., Bergman, A. M., Giaccone, G., Peters, G. J. Gemcitabine uptake in glioblastoma multiforme: potential as a radiosensitizer. *Ann. Oncol.* **2009**, *20*, 182–187.
- <sup>118</sup> (a) Teague, A., Lim, K. H., Wang-Gillam, A. Advanced pancreatic adenocarcinoma: a review of current treatment strategies and developing therapies. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2015**, *7*, 68–84.
- (b) Viaud, J., Brac, C., Artru, P., Le Pabic, E., Leconte, B., Bodère, A., Pracht, M., Le Sourd, S., Edeline, J., Lièvre, A. Gemcitabine as second-line chemotherapy after



---

folfirinox failure in advanced pancreatic adenocarcinoma: a retrospective study. *Dig. Liver Dis.* **2017**, *49*, 692–696.

<sup>119</sup> Maire F. Prédiction de l'efficacité de la gemcitabine dans l'adénocarcinome pancréatique: vers une chimiothérapie à la carte. *Hépatogastro* **2012**, *19*, 781–785.

<sup>120</sup> Rauchwerger, D. R., Firby, P. S., Hedley, D. W., Moore, M. J. Equilibrative sensitive nucleoside transporter and its role in gemcitabine sensitivity. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6075–6079.

<sup>121</sup> Farrell, J. J., Elsaleh, H., Garcia, M., Lai, R., Ammar, A., Regine, W. F., Abrams, R., Benson, A. B., Macdonald, J., Cass, C. E., Dicker, A. P., Mackey, J. R. Human equilibrative nucleoside transporter 1 levels predict response to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 187–195.

<sup>122</sup> Moysan, E., Bastiat, G., Benoit, J. P. Gemcitabine versus modified gemcitabine: a review of several promising chemical modifications. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 430–444.

<sup>123</sup> Duxbury, M. S., Ito, H., Zinner, M. J., Ashley, S. W., Whang, E. E. RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. *Oncogene* **2004**, *23*, 1539–1548.

<sup>124</sup> (a) Song, X., Lorenzi, P. L., Landowski, C. P., Vig, B. S., Hilfinger, J. M., Amidon, G. L. Amino acid ester prodrugs of the anticancer agent gemcitabine: synthesis, bioconversion, metabolic bioevasion, and hPEPT1-mediated transport. *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 157–167.

(b) Tsume, Y., Incecayir, T., Song, X., Hilfinger, J. M., Amidon, G. L. The development of orally administrable gemcitabine prodrugs with D-enantiomer amino acids: enhanced membrane permeability and enzymatic stability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *86*, 514–523.

(c) Tsume, Y., Borrás Bermejo, B., Amidon, G. L. The dipeptide monoester prodrugs of floxuridine and gemcitabine—feasibility of orally administrable nucleoside analogs. *Pharmaceuticals (Basel)* **2014**, *7*, 169–191.

- <sup>125</sup> De Rosa, S., Minale, L., Riccio, R., Sodano, G. The absolute configuration of avarol, a rearranged sesquiterpenoid hydroquinone from a marine sponge. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1976**, 1408–1414.
- <sup>126</sup> Müller, W. E., Diehl-Seifert, B., Sobel, C., Bechtold, A., Kljajić, Z., Dorn, A. Sponge secondary metabolites: biochemical and ultrastructural localization of the antimitotic agent avarol in *Dysidea avara*. *J. Histochem. Cytochem.* **1986**, *34*, 1687–1690.
- <sup>127</sup> [http://liboupat2.free.fr/aquafaun/medi\\_atl/Eponges/dysidea.html](http://liboupat2.free.fr/aquafaun/medi_atl/Eponges/dysidea.html) , poslednja poseta 20.4. 2017.
- <sup>128</sup> Seibert, G., Raether, W., Dogović, N., Gašić, M. J., Zahn, R. K., Müller, W. E. G. Antibacterial and antifungal activity of avarone and avarol. *Zbl. Bakt. Hyg. A* **1985**, *260*, 379–386.
- <sup>129</sup> (a) Müller, W. E. G., Zahn, R. K., Gašić, M. J., Dogović, N., Maidhof, A., Becker, C., Diehl-Seifert, B., Eich, E. Avarol, a cytostatically active compound from the marine sponge *Dysidea avara*. *Comp. Biochem. Physiol.* **1985**, *80C*, 47–52.
- (b) Müller, W. E., Maidhof, A., Zahn, R. K., Schröder, H. C., Gasić, M. J., Heidemann, D., Bernd, A., Kurelec, B., Eich, E., Seibert, G. Potent antileukemic activity of the novel cytostatic agent avarone and its analogues *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 4822–4826.
- (c) Müller, W. E. G., Sladić, D., Zahn, R. K., Bässler, K. H., Dogović, N., Gerner, H., Gašić, M. J., Schröder, H. C. Avarol-induced DNA strand breakage *in vitro* and in Friend erythroleukemia cells. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 6565–6571.
- (d) Cozzolino, R., De Giulio, A., De Rosa, S., Strazzullo, G., Gašić, M. J., Sladić, D., Zlatović, M. J. Biological activities of avarol derivatives, 1. Amino derivatives. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 699–702.
- <sup>130</sup> Božić, T., Sladić, D., Zlatović, M., Novaković, I., Trifunović, S., Gašić, M. J. Regioselectivity of conjugate additions to monoalkyl-1,4-benzoquinones. *J. Serb. Chem. Soc.* **2002**, *67*, 547–551.

- 
- <sup>131</sup> Brotzel, F., Mayr, H. Nucleophilicities of amino acids and peptides. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3814–3820.
- <sup>132</sup> McIlwain, D. R., Berger, T., Mak, T. W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a008656.
- <sup>133</sup> Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., McLaughlin, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* **1982**, *45*, 31–34.
- <sup>134</sup> Novaković, I., Anđelković, U., Zlatović, M., Gašić, M. J., Sladić, D. Bioconjugate of lysozyme and the antibacterial marine sesquiterpene quinone avarone and its derivatives, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 57–65.
- <sup>135</sup> Heck, T., Faccio, G., Richter, M., Thöny-Meyer, L. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 461–475.
- <sup>136</sup> [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4f/Mechanism\\_of\\_Lysozyme\\_action.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4f/Mechanism_of_Lysozyme_action.png)
- <sup>137</sup> (a) <http://upendratts.blogspot.rs/2012/04/lysozyme.html>, poslednja poseta 15. 4. 2017.  
(b) van den Berg, B., Chung, E. W., Robinson, C. V., Mateo, P. L., Dobson, C. M. The oxidative refolding of hen lysozyme and its catalysis by protein disulfide isomerase. *EMBO J.* **1999**, *18*, 4794–4803.
- <sup>138</sup> Greve, H. J., Kim, J. Modifications of lysozyme by substituted benzoquinones. Undergraduate Departmental Honors Thesis, University of Tennessee at Chattanooga, Chattanooga, TN, **2015**.
- <sup>139</sup> (a) Novaković, I., Vujčić, Z., Božić, T., Božić, N., Milosavić, N., Sladić, D., Chemical modification of beta-lactoglobulin by quinones. *J. Serb. Chem. Soc.* **2003**, *68*, 243–248.  
(b) Sladić, D., Novaković, I., Vujčić, Z., Božić, T., Božić, N., Milić, D., Šolaja, B., Gašić, M. J. Protein covalent modification by biologically active quinones. *J. Serb. Chem. Soc.* **2004**, *69*, 901–907.

- 
- <sup>140</sup> <http://nptel.ac.in/courses/102103044/5>, poslednja poseta 13. 4. 2017.
- <sup>141</sup> Sirajuddin, M., Ali, S., Badshah, A. Drug–DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J. Photochem. Photobiol., B.* **2013**, *124*, 1–19.
- <sup>142</sup> <https://www.hoelzel-biotech.com/en/infothek/nucleic-acid-detection/>, poslednja poseta 20. 4. 2017.
- <sup>143</sup> Rajendrakumar, C. S., Suryanarayana, T., Reddy, A. R. DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS Lett.* **1997**, *410*, 201–205.
- <sup>144</sup> Spillane, C. B., Smith, J. A., Morgan, J. L., Keene, F. R. DNA affinity binding studies using a fluorescent dye displacement technique: the dichotomy of the binding site. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 819–824.
- <sup>145</sup> Wang, H., Laughton, C. A. Evaluation of molecular modelling methods to predict the sequence-selectivity of DNA minor groove binding ligands. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 10722–10728.
- <sup>146</sup> Zhu, Z., Yang, C., Zhou, X., Qina, J. Label-free aptamer-based sensors for L-argininamide by using nucleic acid minor groove binding dyes. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3192–3194.
- <sup>147</sup> Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., Ahmad, A. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling Behav.* **2012**, *7*, 1456–1466.
- <sup>148</sup> Ionita, G., Sahini, V. Em., Semenescu, G., Ionita, P. Kinetics of oxidation of amino acids by some free stable hydrazyl radicals. *Acta Chim. Slov.* **2000**, *47*, 111–119.
- <sup>149</sup> (a) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.

---

(b) Ohno, M., Abe, T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J. Immunol. Methods* **1991**, *145*, 199–203.

<sup>150</sup> Vujčić, Z. Eksperimentalna biohemija–praktikum, Rantec, Beograd, str. 82, **2002**.

<sup>151</sup> Wei, D., Wilson, W. D., Neidle, S. Small-molecule binding to the DNA minor groove is mediated by a conserved water cluster. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1369–1377.

<sup>152</sup> <http://www.rcsb.org/pdb>, poslednja poseta 23. 4. 2017.

<sup>153</sup> (a) Sanner, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graphics Modell.* **1999**, *17*, 57–61.

(b) Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.

<sup>154</sup> Maestro, version 10.4, Schrödinger, LLC, New York, **2015**

<sup>155</sup> Epik, version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, **2015**

<sup>156</sup> Jaguar, version 9.0, Schrödinger, LLC, New York, **2015**

<sup>157</sup> Trott, O., Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461.

<sup>158</sup> Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, release 4.5, San Diego, CA, **2015**

## BIOGRAFIJA

Jovana Vilipić je rođena 1. jula 1984. godine u Velikoj Kladuši, Bosna i Hercegovina. Gimnaziju je završila u Sremskoj Mitrovici. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu je upisala kao redovan student 2003. godine na studijskoj grupi diplomirani hemičar–biohemija. Diplomirala je 2008. godine pod rukovodstvom prof. dr Mirjane Popsavin sa temom “Sinteza novog acikličnog tiazolnog C-nukleozida”. Postdiplomske studije je upisala 2009. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od juna 2010. godine je zaposlena kao istraživač-pripravnik pri Inovacionom centru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od 2013. godine radi u zvanju istraživač-saradnik u istoj ustanovi.

Tokom osnovnih studija je bila stipendista Ministarstva nauke. Do sada je učestvovala u izvođenju dva naučno-istraživačka projekta finansirana od strane Ministarstva prosvete i tehnološkog razvoja. Objavila je tri naučna rada u međunarodnim časopisima.

Član je Srpskog hemijskog društva i Biohemijskog društva Srbije.

## IZJAVA O AUTORSTVU

Ime i prezime autora Jovana P. Vilipić

Broj indeksa DB 17/2009

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Dobijanje aminokiselinskih derivata avarona i *tert*-butilhinona  
i ispitivanje njihove biološke aktivnosti

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, 1. 8. 2017.

J. Vilipić

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jovana P. Vilipić

Broj indeksa DB 17/2009

Studijski program Doktor biohemijskih nauka

Naslov rada Dobijanje aminokiselinskih derivata avarona i tert-butilhinona i ispitivanje njihove biološke aktivnosti

Ментор prof. dr Dušan Sladić, dr Irena Novaković

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stanicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, 1. 8. 2017.

J. Vilipić



## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Dobijanje aminokiselinskih derivata avarona i *tert*-butilhinona

I ispitivanje njihove biološke aktivnosti

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

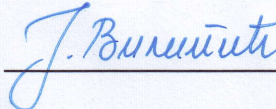
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerade (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave.)

Potpis autora

U Beogradu, 1. 8. 2017.



1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu delova.

3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istim ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.