



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

НЕЗРИНА КУРТАНОВИЋ

**Антагонисти естроген рецептора α : Рационални
дизајн нових супресаната рака дојке базиран на
3-D QSAR, COMBINEr и 3-D фармакофорним
студијама**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Крагујевац, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF SCIENCE

NEZRINA KURTANOVIĆ

**Antagonists of Estrogen Receptor α : Rational Design
of New Breast Cancer Suppressants Based on 3-D
QSAR, COMBINER, and 3-D Pharmacophore
Studies**

DOCTORAL DISSERTATION

Kragujevac, 2022.

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Незрина Куртановић
Датум и место рођења: 30.07.1990. године, Нови Пазар, Србија
Садашње запослење: Истраживач-сарадник, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Антагонисти естроген рецептора α: Рационални дизајн нових супресаната рака дојке базиран на 3-D QSAR, COMBINE_r и 3-D фармакофорним студијама
Број страница: 426; Додатни материјал: 710
Број слика: 90; Број шема: 10; Број слика Додатни материјал: 705
Број библиографских података: 410
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област (УДК): Хемија – Биохемија (577.1)
Ментор: др Милан Младеновић , ванредни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 5.09.2018. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: Веће за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу IV-01-18/12, 23.01.2019. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: Веће за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу IV-01-775/4, 10.10.2018. године
<ol style="list-style-type: none"> др Марина Митровић, ванредни професор, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија, председник комисије Професор Рино Рањо (Prof. Rino Ragno), редовни професор, Факултет за фармацију и медицину Sapienza Универзитет у Риму, Република Италија, ужа научна област: Медицинска хемија, члан комисије др Милан Младеновић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија, ментор
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: Број одлуке и датум прихватања Комисије за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: Наставно-научно веће Природно-математичког факултета у Крагујевцу 320/IX-2, 29.06.2022. године
Веће за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу IV-01-521/11, 13.07.2022. године
<ol style="list-style-type: none"> др Данијела А. Костић, редовни професор Природно-математичког факултета у Нишу, ужа научна област: Биохемија, председник комисије др Марина Митровић, редовни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија, члан комисије Професор Рино Рањо (Prof. Rino Ragno), редовни професор, Факултет за фармацију и медицину Sapienza Универзитет у Риму, Република Италија, ужа научна област: Медицинска хемија, члан комисије
Датум одбране дисертације:

МЕНТОР

др Милан Младеновић, ванредни професор,
Природно-математички факултет
Универзитет у Крагујевцу
ужа научна област: Биохемија

КОМИСИЈА

др Данијела Костић, председник Комисије
редовни професор
Природно-математички факултет
Универзитет у Нишу
ужа научна област: Органска хемија са биохемијом

др Марина Митровић, члан Комисије
редовни професор
Факултет медицинских наука
Универзитет у Крагујевцу
ужа научна област: Биохемија

Prof. Rino Ragno (професор Рино Рањо), члан Комисије
редовни професор
Факултет за фармацију и медицину
Sapienza Универзитет у Риму
Република Италија
ужа научна област: Медицинска хемија

ДАТУМ ОДБРАНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

ОЦЕНА:



Захвалница

Својим родитељима

Ова докторска дисертација урађена је у Лабораторији за биохемију и хемију природних производа и Крагујевачког центра за рачунарску биохемију Института за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Један део експеримената урађен је у Лабораторији за генетику Института за биологију и екологију истог факултета; на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду, у Лабораторији за онкологију Института за онкологију у Сремској Каменици, као и на Факултету за фармацију и медицину, Универзитета у Риму.

Ментор приложене докторске дисертације је др Милан Младеновић, ванредни професор који је предложио тему и руководио израдом ове докторске дисертације. Овом приликом му се захваљујем на пруженој прилици да започнем своју научну каријеру и да postanем део успешног истраживачког тима Лабораторије за биохемију и хемију природних производа и Крагујевачког центра за рачунарску биохемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

Захваљујем се члановима Комисије на темељном прегледању и на свим корисним саветима и сугестијама које су значајно допринеле квалитету ове дисертације. Посебну захвалност дугујем проф. Рину Рању (Prof. Rino Rano) и његовим сарадницима који су ми пружили велику помоћ својим искуствима у раду и стручношћу у области медицинске хемије.

Неизмерну захвалност дугујем својој колегиници и великом пријатељу Анђели Франицих. Желим да истакнем да сам почаствована и срећна што сам имала могућност да упознам тако дивну особу.

Највећу захвалност на поверењу, саветима, стрпљењу и разумевању, дугујем својој породици која је веровала у мене чак и онда када ја нисам, мом оцу, мом супругу, мојој мајци и мојој сестри, без чије љубави, вере, наде и снаге не бих била ту где јесам и не бих била ово што сам сада. На крају желим да истакнем да је најлепшу ноту при изради докторске дисертације дао мој цветић Зулејха.

Незрина Куртановић
Незрина Куртановић

“Пут од хиљаду миља почиње једним кораком”
“Све што нам је потребно је шанса”



Сажетак

Естроген рецептор α ($ER\alpha$) представља транскрипциони регулатор чија је физиолошка активност индукована 17β -естрадиолом и који иницира транскрипциону машинерију зависну од RNA полимеразе II, након чега може доћи до развоја канцера дојке директним или индиректним геномским путем. Да би се дизајнирали и синтетисали иновативни лиганди $ER\alpha$ као супресанти рака дојке, тродимензионалне студије зависности структуре од активности (3-D QSAR) базиране на структури молекулске мете (SB), изведене помоћу 3-D QSAutogrid/R, Py-CoMFA или PHASE софтвера, затим студије упоређивања везивних енергија (COMBINEr), изведене помоћу Py-ComBinE софтвера, као и 3-D фармакофорне студије, изведене помоћу PHASE софтвера, спроведене су на основу експериментално одређених биоактивних конформација парцијалних агониста, мешовитих агониста/антагониста (SERMs) и потпуних антагониста (SERDs), ко-кристализованих у комплексу са природним или мутираним рецепторима.

Такође, процене способности репродукције биоактивних конформација на основу структура молекулских мета (SB) као и биоактивних конформација самих лиганата (LB), спроведене помоћу софтвера бесплатних за академску заједницу или комерцијалних решења, дале су упуте како да се изврши SB/LB поравнање нетестираних једињења. 3-D QSAR, COMBINEr и 3-D фармакофорни модели за лиганде $ER\alpha$, упарени са правилима за SB/LB поравнања, обзнањени су као корисни за дефинисање молекуларних детерминанти за антиканцерогену активност базирану на антагонизму $ER\alpha$ као и за предвиђање активности одговарајућих лиганата.

Овде развијени протоколи верификовани су кроз дизајн и предвиђање активности 12 нових SERMs кумаринског типа, проистеклих из 3-D QSAutogrid/R методологије, названих **3DQ-1a** до **3DQ-1e**, затим 6 нових кумаринских SERMs проистеклих из Py-CoMFA и Py-ComBinE методологија, означених као **CBE-1** до **CBE-6**, као и 12 нових деривата брефелдина А (**BFA**), као резултат апликације PHASE 3-D фармакофорних и 3-D QSAR студија, означених као **3DPQ-1** до **3DPQ-12**, који су развијени након виртуелног скенирања датасетова из National Cancer Institute и оптимизације **BFA**.

Сви нови *in silico*-дизајнирани $ER\alpha$ антагонисти синтетисани су и потврђени као селективни антагонисти $ER\alpha$, показујући активност у μM до nM опсегу. Једињења су потврђена као модулатори $ER\alpha$ и валидирана као антипролиферативни агенси на нивоу MCF-7 ћелијских линија канцера дојке, такође испољавајући μM до nM активност, у исто

време не показујући агонизам према ендометријалним ћелијским линијама, чиме су испољили фармаколошки профил супериорнији у односу на SERMs. Механизам деловања проучаван је на нивоу инхибиције Raf-1/MAPK/ERK и p53 путева сигналне трансдукције, спречавајући хормонски-посредовану експресију гена на нивоу директног и индиректног пута и стопајући пролиферацију MCF-7 ћелијских линија у G₀/G₁ фази.

In vivo експерименти у смислу *per os* администрације на женкама пацова из Wistar соја са индукованим канцером дојке, издвојили су деривате **3DQ-4a**, **3DQ-2a**, **3DQ-1a**, **3DQ-1b**, **3DQ-2b**, **3DQ-3b**, **СВЕ-4**, **СВЕ-5**, **СВЕ-3**, **3DPQ-12**, **3DPQ-3**, **3DPQ-9**, **3DPQ-4**, **3DPQ-2** и **3DPQ-1** као оне са изванредним потенцијалом супресије тумора уз испољавање оптималног фармакокинетичког профила и без значајних хистопатолошких последица. Приложени подаци указују да наведена једињења требају бити подвргнута клиничким студијама у лечењу канцера дојке.

Кључне речи: ER α , канцер дојке, 3-D QSAR, COMBINER, 3-D фармакофоре, молекулско доковање, тродимензионално упоређивање структура, нови антагонисти ER α , синтеза, *in vitro* антагонизам и антипролиферативна евалуација, *in vivo* антикацерогена евалуација

A large, stylized pink ribbon symbol is positioned in the center-right of the page. The ribbon is thick and has a slight 3D effect with shadows. It is set against a background of faint, light-colored floral patterns and a large, thin pink outline of a stylized letter 'S' or 'C' shape.

Summary

The estrogen receptor α (ER α) represents a 17 β -estradiol inducible transcriptional regulator that initiates the RNA polymerase II-dependent transcriptional machinery, pointed for breast cancer (BC) development *via* either genomic direct or genomic indirect (*i.e.* tethered) pathway. To design and synthesize innovative ligands against ER α , structure-based (SB) three-dimensional quantitative structure-activity relationships (3-D QSAR) studies, conducted either employing 3-D QSAutogrid/R, Py-CoMFA, or PHASE software, SB Comparative Binding Energy (COMBINEr) studies, performed with the aid of Py-ComBinE software, as well as SB 3-D Pharmacophore studies, developed using PHASE software, have been undertaken using experimentally determined bioactive conformations of partial agonists, mixed agonists/antagonists (SERMs), and full antagonists (SERDs) co-crystallized within either wild-type or mutated ER α receptors.

SB and ligand-based (LB) alignments assessments, performed with the aid of free-for-academia or commercial software, ruled out the guidelines for SB/LB alignment of untested compounds. 3-D QSAR, COMBINEr, and 3-D Pharmacophore models for ER α ligands, coupled with SB/LB alignment, were revealed to be useful tools to dissect the chemical determinants for ER α -based anticancer activity as well as to predict their potency.

The herein-developed protocols were verified through the design and potency prediction of new 12 coumarin-based SERMs originating from the 3-D QSAutogrid/R methodology, namely **3DQ-1a** to **3DQ-1e**, new 6 coumarin-based SERMs originating from the Py-CoMFA and Py-ComBinE methodologies, namely **CBE-1** to **CBE-6**, as well as 12 new Brefeldin A (**BFA**)-derivatives, originating from the PHASE 3-D Pharmacophore studies and 3-D QSAR studies, **3DPQ-1** to **3DPQ-12**, emerging after the virtual screening of National Cancer Institute datasets and lead optimization of **BFA**.

All new *in silico*-designed ER α antagonists were synthesized and confirmed as selective ER α antagonists, showing potencies ranging from single-digit nanomolar to picomolar. The hits were confirmed as selective estrogen receptor modulators and validated as antiproliferative agents using MCF-7 breast cancer cell lines exerting picomolar to low nanomolar potency, at the same time showing no agonistic activity within endometrial cell lines thus exerting a superior profile than SERMs. Their mechanism of action was inspected and revealed to be through the inhibition of the Raf-1/MAPK/ERK and p53 signal transduction pathways, preventing hormone-mediated gene expression on either genomic direct or genomic indirect level, and stopping the MCF-7 cells proliferation at G₀/G₁ phase.

In vivo experiments, by means of the *per os* administration to female Wistar rats with pre-induced breast cancer, distinguished the following derivatives, **3DQ-4a**, **3DQ-2a**, **3DQ-1a**, **3DQ-1b**, **3DQ-2b**, **3DQ-3b**, **CBE-4**, **CBE-5**, **CBE-3**, **3DPQ-12**, **3DPQ-3**, **3DPQ-9**, **3DPQ-4**, **3DPQ-2**, and **3DPQ-1**, showing remarkable potency as tumor suppressors endowing with optimal pharmacokinetic profiles and no significant histopathological profiles. The presented data indicate the new compounds as potential candidates to be submitted to clinical trials for breast cancer therapy.

Keywords: $ER\alpha$, breast cancer, 3-D QSAR, COMBINER, and 3-D Pharmacophores, structure-based alignment assessment, ligand-based alignment assessment, new $ER\alpha$ antagonists, synthesis, *in vitro* antagonism, and antiproliferative evaluation, *in vivo* anticancer evaluation

ПОСТУЛАТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

УВОД	1
ДОЈКА	5
МОРФОЛОГИЈА ДОЈКЕ	5
ЕСТРОГЕНИ ХОРМОНИ	9
СТРУКТУРА И ФИЗИОЛОШКИ ЗНАЧАЈ ЕСТРОГЕНИХ ХОРМОНА	9
БИОСИНТЕЗА ЕСТРОГЕНИХ ХОРМОНА	11
БИОСИНТЕЗА ЕСТРОГЕНИХ ХОРМОНА У ДОЈЦИ	22
УТИЦАЈ ЕСТРОГЕНИХ ХОРМОНА НА ДОЈКУ ТОКОМ ПУБЕРТЕТА, МЕНСТРУАЛНОГ И РЕПРОДУКТИВНОГ ПЕРИОДА	25
УТИЦАЈ ЕСТРОГЕНИХ ХОРМОНА НА ДОЈКУ У МЕНОПАУЗИ	26
ФИЗИОЛОШКА АКТИВНОСТ ЕСТРОГЕНИХ ХОРМОНА НА НИВОУ ФАМИЛИЈЕ НУКЛЕАРНИХ РЕЦЕПТОРА	26
НУКЛЕАРНИ РЕЦЕПТОРИ	26
СТРУКТУРА И ФУНКЦИЈА НУКЛЕАРНИХ РЕЦЕПТОРА	26
СТРУКТУРА И ФАРМАКОЛОГИЈА ЕСТРОГЕН РЕЦЕПТОРА α	33
СТРУКТУРА И ФАРМАКОЛОГИЈА А/В ДОМЕНА $ER\alpha$	37
СТРУКТУРА И ФАРМАКОЛОГИЈА С ДОМЕНА $ER\alpha$	37
СТРУКТУРА И ФАРМАКОЛОГИЈА D ДОМЕНА $ER\alpha$	39
СТРУКТУРА И ФАРМАКОЛОГИЈА E ДОМЕНА $ER\alpha$	40
СТРУКТУРА И ФАРМАКОЛОГИЈА F ДОМЕНА $ER\alpha$	44
ПУТЕВИ БИОСИНТЕЗЕ КАНЦЕРА ДОЈКЕ	44
ГЕНОМСКИ ДИРЕКТНИ ПУТ	47
ГЕНОМСКИ ИНДИРЕКТНИ ПУТ	57
АЛТЕРНАТИВНИ ПУТ ГЕНОМСКОГ ИНДИРЕКТНОГ ПУТА	60
ЛЕКОВИ ПРОТИВ КАНЦЕРА ДОЈКЕ	63
ХЕМИЈСКА КЛАСИФИКАЦИЈА И ФАРМАКОЛОГИЈА SERMs	65
ТРИФЕНИЛЕТИЛЕНИ КАО SERMs	65
ТАМОКСИФЕН	65
SERMs СЛИЧНИ ТАМОКСИФЕНУ	67
БАЗЕДОКСИФЕНИ КАО SERMs	68
РАЛОКСИФЕН	68
АРЗОКСИФЕН	69
ИНДОЛИ И ТЕТРАХИДРОНАФТАЛЕНИ КАО SERMs	69
БАЗЕДОКСИФЕН	69
ХЕМИЈСКА КЛАСИФИКАЦИЈА И ФАРМАКОЛОГИЈА SERDs	70
ФУЛВЕСТРАНТ	70
GW5638	71
GDC-0810	72
AZD9496	72
КУМАРИНИ КАО МОДУЛАТОРИ $ER\alpha$	73
ДЕРИВАТИ БРЕФЕЛДИНА А КАО МОДУЛАТОРИ $ER\alpha$	75
QSAR СТУДИЈЕ ЕСТРОГЕНЕ И АНТИЕСТРОГЕНЕ АКТИВНОСТИ НА НИВОУ $ER\alpha$	75
3-D QSAR СТУДИЈЕ ЕСТРОГЕНЕ И АНТИЕСТРОГЕНЕ АКТИВНОСТИ НА НИВОУ	76

ER α

COMBINE СТУДИЈЕ ЕСТРОГЕНЕ И АНТИЕСТРОГЕНЕ АКТИВНОСТИ НА НИВОУ ERα	77
3-D ФАРМАКОФОРНЕ СТУДИЈЕ ЕСТРОГЕНЕ И АНТИЕСТРОГЕНЕ АКТИВНОСТИ НА НИВОУ ERα	77
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	83
КОЛЕКЦИОНИРАЊЕ И ПРИПРЕМА КРИСТАЛНИХ СТРУКТУРА ERα	85
КОМПИЛАЦИЈА ДАТАСЕТОВА	86
ГЕНЕРИСАЊЕ 3-D QSAR СТУДИЈА ЗАСНОВАНИХ НА ПОЉИМА МОЛЕКУЛСКИХ ИНТЕРАКЦИЈА УПОТРЕБОМ 3-D QSAUTOGRID/R МЕТОДОЛОГИЈЕ	93
ОПТИМИЗАЦИЈА ТРОДИМЕНЗИОНАЛНЕ ПРОСТОРНЕ РЕШЕТКЕ И ИЗРАЧУНАВАЊЕ ПОЉА МОЛЕКУЛСКИХ ИНТЕРАКЦИЈА (ЕНГ. MOLECULAR INTERACTION FIELDS, MIF)	94
СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА	94
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА 3-D QSAR МОДЕЛА	95
ГЕНЕРИСАЊЕ 3-D QSAR СТУДИЈА ЗАСНОВАНИХ НА ПОЉИМА МОЛЕКУЛСКИХ ИНТЕРАКЦИЈА УПОТРЕБОМ PY-COMFA МЕТОДОЛОГИЈЕ	97
СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА	98
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА 3-D QSAR МОДЕЛА	99
ГЕНЕРИСАЊЕ COMBINER МОДЕЛА УПОТРЕБОМ PY-COMBINE МЕТОДОЛОГИЈЕ	99
СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА	100
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА COMBINER МОДЕЛА	101
ГЕНЕРИСАЊЕ 3-D ФАРМАКОФОРНИХ МОДЕЛА УПОТРЕБОМ PHASE МЕТОДОЛОГИЈЕ	102
ГЕНЕРИСАЊЕ 3-D QSAR МОДЕЛА ЗАСНОВАНИХ НА ПОРАВНАЊУ АТОМА	102
ГЕНЕРИСАЊЕ ПРАВИЛА ЗА РЕПРОДУКЦИЈУ БИОАКТИВНИХ КОНФОРМАЦИЈА ЛИГАНАДА ERα	103
РЕПРОДУКЦИЈА БИОАКТИВНИХ КОНФОРМАЦИЈА ЛИГАНАДА БАЗИРАНА НА СТРУКТУРИ МОЛЕКУЛСКЕ МЕТЕ И СЌМИХ ЛИГАНАДА	105
РАНДОМИЗАЦИЈЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ КОНФОРМАЦИЈА ЛИГАНАДА ЗА SB ПОРАВНАЊЕ	107
ПОДЕШАВАЊА ПРОГРАМА AUTO DOCK	108
ПОДЕШАВАЊА ПРОГРАМА VINA	109
ПОДЕШАВАЊА ПРОГРАМА DOCK	109
ПОДЕШАВАЊА ПРОГРАМА SMINA	109
ПОДЕШАВАЊА ПРОГРАМА PLANTS	110
ПОДЕШАВАЊА ПРОГРАМА GLIDE	110
РАНДОМИЗАЦИЈЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ КОНФОРМАЦИЈА ЛИГАНАДА ЗА LB ПОРАВНАЊА	111
ПОДЕШАВАЊА ПРОГРАМА OBSCONFORMER/OPEN3DALING	111
ПОДЕШАВАЊА ПРОГРАМА BALLOON/SHAEP	111
ПОДЕШАВАЊА PY-CONFSEARCH АПЛИКАЦИЈЕ	112
ПОДЕШАВАЊА PY-ALIGN АПЛИКАЦИЈЕ	112
ПОДЕШАВАЊА ПРОГРАМА FLEXIBLE LIGAND ALIGNMENT	112
ГЕНЕРИСАЊЕ СТРУКТУРА МОДЕЛОВАНИХ И ДИЗАЈНИРАНИХ ЈЕДИЊЕЊА И ПРЕДВИЊАЊЕ ЊИХОВЕ АКТИВНОСТИ	112
ВИРТУЕЛНО СКЕНИРАЊЕ	112
ИНСТРУМЕНТИ	113
КОМЕРЦИЈАЛНА ЈЕДИЊЕЊА	114

СИНТЕТИЧКИ ПРОТОКОЛИ ЗА ПРИПРЕМУ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1a до 3DQ-1e	116
СИНТЕТИЧКИ ПРОТОКОЛИ ЗА ПРИПРЕМУ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1a	116
СИНТЕТИЧКИ ПРОТОКОЛИ ЗА ПРИПРЕМУ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-2a	121
СИНТЕТИЧКИ ПРОТОКОЛИ ЗА ПРИПРЕМУ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-3a	124
СИНТЕТИЧКИ ПРОТОКОЛИ ЗА ПРИПРЕМУ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-4a	127
СИНТЕТИЧКИ ПРОТОКОЛИ ЗА ПРИПРЕМУ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1b, 3DQ-2b и 3DQ-3b	131
СИНТЕТИЧКИ ПРОТОКОЛИ ЗА ПРИПРЕМУ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1c и 3DQ-2c	138
СИНТЕТИЧКИ ПРОТОКОЛИ ЗА ПРИПРЕМУ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1d и 3DQ-2d	144
СИНТЕТИЧКИ ПРОТОКОЛИ ЗА ПРИПРЕМУ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1e	149
СИНТЕТИЧКИ ПРОТОКОЛИ ЗА ПРИПРЕМУ ЈЕДИЊЕЊА СВЕ-1 до СВЕ-6	156
СИНТЕТИЧКИ ПРОТОКОЛИ ЗА ПРИПРЕМУ ЈЕДИЊЕЊА 3DPQ-1 до 3DPQ-12	168
АНТАГОНИСТИЧКИ ПОТЕНЦИЈАЛ И РЕЛАТИВНИ АФИНИТЕТИ ВЕЗИВАЊА СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА У ОДНОСУ НА ER α И ER β	193
АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА ПРОТИВ ER α (+)- И ER α (-)-ЗАВИСНИХ ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА КАРЦИНОМА ДОЈКЕ ОДНОСНО ПРОТИВ ER α (+)-ЗАВИСНИХ ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА КАРЦИНОМА ЕНДОМЕТРИЈУМА	194
СМАЊИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ER α НАКОН ТРЕТМАНА MCF-7 ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА СИНТЕТИСАНИМ ЈЕДИЊЕЊИМА	195
ЦЕЛУЛАРНИ ЕСЕЈ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ФУНКЦИОНАЛНОГ АНТАГОНИЗМА ER α	196
УТИЦАЈ ИСПИТИВАНИХ ЛИГАНАДА ER α НА СИГНАЛНУ ТРАНСДУКЦИЈУ MCF-7 ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА	197
WESTERN BLOT АНАЛИЗЕ	197
ТРАНСКРИПЦИОНА АКТИВНОСТ ГЕНА	198
УТИЦАЈ ИСПИТИВАНИХ АНТАГОНИСТА ER α НА СИГНАЛИЗАЦИЈУ УНУТАР MCF-7 ЋЕЛИЈА	198
АНТИТЕЛА, ЛЕКОВИ И WESTERN АНАЛИЗА	198
qPCR	199
ChIP, qChIP И СЕКВЕНЦИЈАЛНИ ChIP	200
ЕФЕКТИ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА НА ЦИТОТОКСИЧНОСТ И РАСПОДЕЛУ ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА УНУТАР ER α (+)-ЗАВИСНИХ ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА РАКА ДОЈКЕ	200
ОДРЕЂИВАЊЕ ЛИПОФИЛНОСТИ	201
АНТИКАЦЕРОГЕНА АКТИВНОСТ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА <i>in vivo</i>	201
ОДРЕЂИВАЊЕ СЕРУМСКИХ БИОХЕМИЈСКИХ МАРКЕРА	202
ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИОКСИДАТИВНИХ МАРКЕРА У ХОМОГЕНАТУ ЈЕТРЕ	203
ОДРЕЂИВАЊЕ АФИНИТЕТА СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА ДА СЕ ВЕЗУЈУ ЗА ПРОТЕИНЕ ПЛАЗМЕ	203
ОДРЕЂИВАЊЕ УНУТРАШЊЕГ КЛИРЕНСА ХЕПАТОЦИТА	203
ФАРМАКОКИНЕТИЧКЕ СТУДИЈЕ НА ПАЦОВИМА	205
ХИСТОПАТОЛОШКЕ СТУДИЈЕ	206
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	207
<i>ДИЗАЈН ИНОВАТИВНИХ АНТАГОНИСТА ЕСТРОГЕН РЕЦЕПТОРА α БАЗИРАН НА 3-D QSAR СТУДИЈАМА ГЕНЕРИСАНИМ НА ОСНОВУ ПОРАВНАЊА ПОЉА МОЛЕКУЛСКИХ ИНТЕРАКЦИЈА, СИНТЕЗА НОВОДИЗАЈНИРАНИХ ЈЕДИЊЕЊА И АНТИКАЦЕРОГЕНА АКТИВНОСТ ПРОТИВ РАКА ДОЈКЕ <i>in vitro</i> И <i>in vivo</i></i>	208

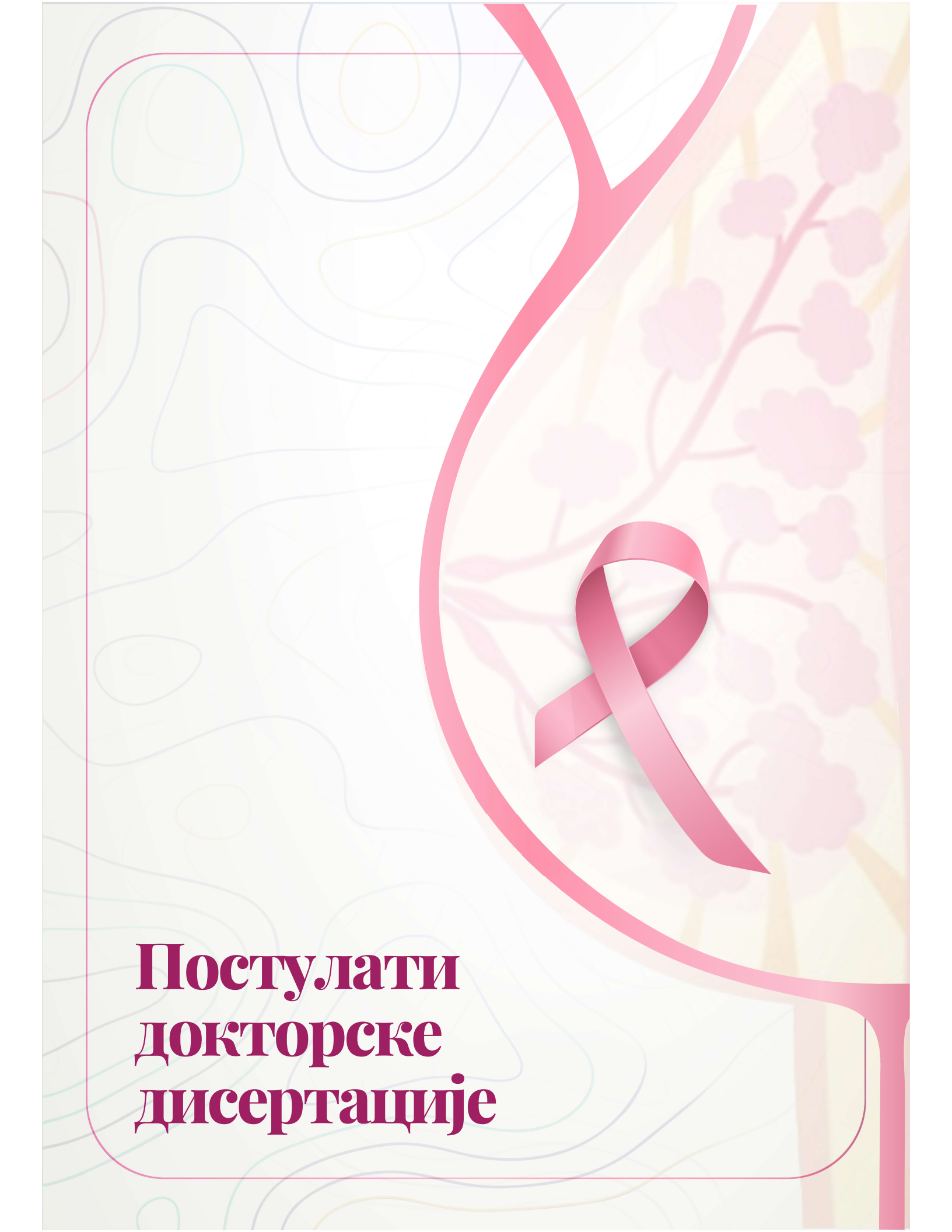
ГЕНЕРИСАЊЕ 3-D-QSAR МОДЕЛА И ЊИХОВА ИНТЕРПРЕТАЦИЈА	210
РЕДЕФИНИСАЊЕ РАЗУМЕВАЊА ИНТЕРАКЦИЈА УНУТАР LBD НА ОСНОВУ 3-D QSAR МАПА	214
ER α LBD R1: ФОРМИРАЊЕ ВОДНИЧНИХ ВЕЗА И ЕЛЕКТРОСТАТИЧКИХ ИНТЕРАКЦИЈА	216
ER α LBD R2: ФОРМИРАЊЕ ВОДНИЧНИХ ВЕЗА И ЕЛЕКТРОСТАТИЧКИХ ИНТЕРАКЦИЈА	217
ER α LBD R2: ХИДРОФОБНЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ	221
ER α LBD R3: СВЕОБУХВАТНИ ЗНАЧАЈ R3	224
Доњи ДЕО РЕГИОНА R3 УНУТАР ЛИГАНД-ВЕЗИВНОГ ДОМЕНА ER α : ХИДРОФОБНЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ	225
Доњи ДЕО РЕГИОНА R3 УНУТАР ЛИГАНД-ВЕЗИВНОГ ДОМЕНА ER α : ВОДНИЧНЕ ВЕЗЕ И ЕЛЕКТРОСТАТИЧКЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ	227
Горњи ДЕО РЕГИОНА R3 УНУТАР ЛИГАНД-ВЕЗИВНОГ ДОМЕНА ER α : ХИДРОФОБНЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ	228
Горњи ДЕО РЕГИОНА R3 УНУТАР ЛИГАНД-ВЕЗИВНОГ ДОМЕНА ER α : ВОДНИЧНЕ ВЕЗЕ И ЕЛЕКТРОСТАТИЧКЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ	229
АНАЛИЗА МОЛЕКУЛСКИХ ДЕТЕРМИНАНТИ АНТАГОНИСТА ERα НАКОН ИНТЕРПРЕТАЦИЈЕ 3-D QSAR МОДЕЛА ГЕНЕРИСАНИХ 3-D QSAUTOGRID/R МЕТОДОЛОГИЈОМ	230
ПРОЦЕНА СПОСОБНОСТИ РАЗЛИЧИТИХ АЛГОРИТАМА И ФУНКЦИЈА ПОГОДАКА ЗА РЕПРОДУКЦИЈУ КРИСТАЛНИХ СТРУКТУРА ПАРЦИЈАЛНИХ АГОНИСТА И АНТАГОНИСТА ERα КОРИСТЕЊИ СОФТВЕРЕ БЕСПЛАТНЕ ЗА АКАДЕМСКУ ЗАЈЕДНИЦУ	232
ПРОЦЕНА ПОРАВЊАЊА БАЗИРАНОГ НА СТРУКТУРИ МОЛЕКУЛСКЕ МЕТЕ	233
ПРОЦЕНА ПОРАВЊАЊА БАЗИРАНОГ НА СТРУКТУРИ ЛИГАНАДА	237
ПРОЦЕНА СПОСОБНОСТИ ПРЕДВИЂАЊА БИОАКТИВНОСТИ ПОМОЋУ 3-D QSAR МОДЕЛА ГЕНЕРИСАНОГ ИЗ N ПРОБЕ	237
ПРАВИЛА ЗА РАЦИОНАЛНИ ДИЗАЈН НОВИХ АНТАГОНИСТА ERα НА ОСНОВУ 3-D QSAR МОДЕЛА ПРОИСТЕКЛИХ ИЗ 3-D QSAUTOGRID/R МЕТОДОЛОГИЈЕ	242
ПОСТУПЦИ ХЕМИЈСКЕ СИНТЕЗЕ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1a ДО 3DQ-1e	247
СИНТЕЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1a И 3DQ-1a [*] .	248
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА СПЕКТРАЛНИХ ПОДАТАКА ЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1a И 3DQ-1a [*] .	250
СИНТЕЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-2a И 3DQ-2a [*]	252
Интерпретација спектралних података за једињења 3DQ-2a И 3DQ-2a [*]	253
СИНТЕЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-3a И 3DQ-3a [*]	254
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА СПЕКТРАЛНИХ ПОДАТАКА ЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-3a И 3DQ-3a [*]	255
СИНТЕЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-4a	256
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА СПЕКТРАЛНИХ ПОДАТАКА ЗА ЈЕДИЊЕЊЕ 3DQ-4a	258
СИНТЕЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1b, 3DQ-2b И 3DQ-3b	259
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА СПЕКТРАЛНИХ ПОДАТАКА ЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1b ДО 3DQ-3b	260
СИНТЕЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1c И 3DQ-2c	265
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА СПЕКТРАЛНИХ ПОДАТАКА ЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1c И 3DQ-2c	266
СИНТЕЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1d И 3DQ-2d	270
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА СПЕКТРАЛНИХ ПОДАТАКА ЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1d И 3DQ-2d	271
СИНТЕЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1e И 3DQ-1e [*]	274
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА СПЕКТРАЛНИХ ПОДАТАКА ЗА ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1e И 3DQ-1e [*]	276
АНТАГОНИСТИЧКА АКТИВНОСТИ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1a ДО 3DQ- 1e, РЕЛАТИВНИ АФИНИТЕТИ ВЕЗИВАЊА ПРЕМА ERα И ERβ И АНАЛИЗА БИОАКТИВНИХ КОНФОРМАЦИЈА	280

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1a ДО 3DQ-1e ПРОТИВ ERα(+)- И ERα(-)-ЗАВИСНИХ ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА РАКА ДОЈКЕ	288
АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1a ДО 3DQ-1e ПРОТИВ ERα(+)-ЗАВИСНИХ ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА КАНЦЕРА ЕНДОМЕТРИЈУМА	291
УТИЦАЈ СИНТЕТИСАНИХ АНТАГОНИСТА ERα 3DQ-1a ДО 3DQ-1e НА ПРОЦЕСЕ СИГНАЛНЕ ТРАНСДУКЦИЈЕ УНУТАР MCF-7 ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА	293
УТИЦАЈ ИСПИТИВАНИХ АНТАГОНИСТА ERα 3DQ-1a ДО 3DQ-1e НА ГЕНОМСКИ ДИРЕКТНИ И ГЕНОМСКИ ИНДИРЕКТНИ ПУТ УНУТАР MCF-7 ЋЕЛИЈА	295
ЕФЕКТИ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1a ДО 3DQ-1e НА ЦИТОТОКСИЧНОСТ И ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС MCF-7 ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА	297
<i>In vivo</i> СКРИНИНГ ЈЕДИЊЕЊА 3DQ-1a ДО 3DQ-1e ПРОТИВ РАКА ДОЈКЕ	300
<i>ДИЗАЈН ИНОВАТИВНИХ АНТАГОНИСТА ЕСТРОГЕН РЕЦЕПТОРА α БАЗИРАН НА PУ-СОМФА И PУ-СОМВИНЕ 3-D QSAR СТУДИЈАМА, СИНТЕЗА НОВОДИЗАЈНИРАНИХ ЈЕДИЊЕЊА И АНТИКАНЦЕРОГЕНА АКТИВНОСТ ПРОТИВ РАКА ДОЈКЕ <i>in vitro</i> И <i>in vivo</i></i>	305
ГЕНЕРИСАЊЕ PУ-СОМФА 3-D-QSAR МОДЕЛА И ЊИХОВА ИНТЕРПРЕТАЦИЈА РЕДЕФИНИСАЊЕ РАЗУМЕВАЊА ИНТЕРАКЦИЈА УНУТАР LBD НА ОСНОВУ 3-D QSAR PУ-СОМФА МАПА	307
ERα LBD R1: ФОРМИРАЊЕ ВОДОНИЧНИХ ВЕЗА И ЕЛЕКТРОСТАТИЧКИХ ИНТЕРАКЦИЈА	309
ERα LBD R2: ФОРМИРАЊЕ ВОДОНИЧНИХ ВЕЗА И ЕЛЕКТРОСТАТИЧКИХ ИНТЕРАКЦИЈА	309
ERα LBD R2: ХИДРОФОБНЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ	311
ДоЊИ ДЕО РЕГИОНА R3 УНУТАР ЛИГАНД-ВЕЗИВНОГ ДОМЕНА ERα: ХИДРОФОБНЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ	313
ДоЊИ ДЕО РЕГИОНА R3 УНУТАР ЛИГАНД-ВЕЗИВНОГ ДОМЕНА ERα: ВОДОНИЧНЕ ВЕЗЕ И ЕЛЕКТРОСТАТИЧКЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ	315
ГорЊИ ДЕО РЕГИОНА R3 УНУТАР ЛИГАНД-ВЕЗИВНОГ ДОМЕНА ERα: ХИДРОФОБНЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ	315
ГорЊИ ДЕО РЕГИОНА R3 УНУТАР ЛИГАНД-ВЕЗИВНОГ ДОМЕНА ERα: ВОДОНИЧНЕ ВЕЗЕ И ЕЛЕКТРОСТАТИЧКЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ	316
ГЕНЕРИСАЊЕ PУ-СОМВИНЕ 3-D-QSAR МОДЕЛА И ЊИХОВА ИНТЕРПРЕТАЦИЈА РЕДЕФИНИСАЊЕ РАЗУМЕВАЊА ИНТЕРАКЦИЈА УНУТАР LBD НА ОСНОВУ PУ-СОМВИНЕ МАПА	317
СТРУКТУРНИ ДОПРИНОС Н3 GLU353 И Н6 ARG394 НА АКТИВНОСТ МОДУЛАТОРА ERα	320
СТРУКТУРНИ ДОПРИНОС Н11 His524 НА АКТИВНОСТ МОДУЛАТОРА ERα	320
СТРУКТУРНИ ДОПРИНОС Н6 LEU391, PHE404-Н7, Н6 MET421, Н6-ILE424-Н7 И Н6-LEU428-Н7 НА АКТИВНОСТ МОДУЛАТОРА ERα	322
СТРУКТУРНИ ДОПРИНОС Н3 LEU346, Н3 THR347 И Н3 TRP383 НА АКТИВНОСТ МОДУЛАТОРА ERα	322
СТРУКТУРНИ ДОПРИНОС Н3 ASP351 НА АКТИВНОСТ МОДУЛАТОРА ERα	324
АНАЛИЗА МОЛЕКУЛСКИХ ДЕТЕРМИНАНТИ АНТАГОНИСТА ERα НАКОН АНАЛИЗЕ 3-D QSAR МОДЕЛА ГЕНЕРИСАНИХ PУ-СОМФА И PУ-СОМВИНЕ МЕТОДОЛОГИЈАМА	325
ПРОЦЕНА СПОСОБНОСТИ РАЗЛИЧИТИХ АЛГОРИТАМА И ФУНКЦИЈА ПОГОДАКА ЗА РЕПРОДУКЦИЈУ КРИСТАЛНИХ СТРУКТУРА ПАРЦИЈАЛНИХ АГОНИСТА И АНТАГОНИСТА ERα КОРИСТЕЊИ ПОРТАЛ WWW.3D-QSAR.COM	325

ПРОЦЕНА ПОРАВЊАЊА БАЗИРАНОГ НА СТРУКТУРИ МОЛЕКУЛСКЕ МЕТЕ	326
ПРОЦЕНА ПОРАВЊАЊА БАЗИРАНОГ НА СТРУКТУРИ ЛИГАНАДА	331
ПРОЦЕНА СПОСОБНОСТИ ПРЕДВИЂАЊА БИОАКТИВНОСТИ ПОМОЋУ 3-D QSAR МОДЕЛА ГЕНЕРИСАНИХ ИЗ Н ПРОБЕ И STE.НВ ПОЉА	331
ПРОЦЕНА СПОСОБНОСТИ ПРЕДВИЂАЊА БИОАКТИВНОСТИ ПОМОЋУ 3-D QSAR МОДЕЛА ГЕНЕРИСАНОГ ИЗ Н ПРОБЕ	336
ПРОЦЕНА СПОСОБНОСТИ ПРЕДВИЂАЊА БИОАКТИВНОСТИ ПОМОЋУ 3-D QSAR МОДЕЛА ГЕНЕРИСАНОГ ИЗ STE.НВ ПОЉА	337
ПРАВИЛА ЗА РАЦИОНАЛНИ ДИЗАЈН НОВИХ АНТАГОНИСТА ERα НА ОСНОВУ 3-D QSAR МОДЕЛА ПРОИСТЕКЛИХ ИЗ PY-COMFA И PY-COMBINE МЕТОДОЛОГИЈА	337
ПОСТУПЦИ ХЕМИЈСКЕ СИНТЕЗЕ ЈЕДИЊЕЊА СВЕ-1 ДО СВЕ-6	339
СИНТЕЗА ЈЕДИЊЕЊА СВЕ-1 ДО СВЕ-6	341
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА СПЕКТРАЛНИХ ПОДАТАКА ЗА ЈЕДИЊЕЊА СВЕ-1 ДО СВЕ-6	342
АНТАГОНИСТИЧКА АКТИВНОСТИ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА СВЕ-1 ДО СВЕ-6, РЕЛАТИВНИ АФИНИТЕТИ ВЕЗИВАЊА ПРЕМА ERα И ERβ И АНАЛИЗА БИОАКТИВНИХ КОНФОРМАЦИЈА	347
АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА СВЕ-1 ДО СВЕ-6 ПРОТИВ ERα(+)- И ERα(-)-ЗАВИСНИХ ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА РАКА ДОЈКЕ	353
АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА СВЕ-1 ДО СВЕ-6 ПРОТИВ ERα(+)-ЗАВИСНИХ ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА КАНЦЕРА ЕНДОМЕТРИЈУМА	355
УТИЦАЈ СИНТЕТИСАНИХ АНТАГОНИСТА ERα СВЕ-1 ДО СВЕ-6 НА ПРОЦЕСЕ СИГНАЛНЕ ТРАНСДУКЦИЈЕ УНУТАР MCF-7 ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА	357
УТИЦАЈ ИСПИТИВАНИХ АНТАГОНИСТА ERα СВЕ-1 ДО СВЕ-6 НА ГЕНОМСКИ ДИРЕКТНИ И ГЕНОМСКИ ИНДИРЕКТНИ ПУТ УНУТАР MCF-7 ЋЕЛИЈА	359
ЕФЕКТИ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА СВЕ-1 ДО СВЕ-6 НА ЦИТОТОКСИЧНОСТ И ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС MCF-7 ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА	361
<i>In vivo</i> СКРИНИНГ ЈЕДИЊЕЊА СВЕ-1 ДО СВЕ-6 ПРОТИВ РАКА ДОЈКЕ	362
<i>ДИЗАЈН ИНОВАТИВНИХ АНТАГОНИСТА ЕСТРОГЕН РЕЦЕПТОРА α БАЗИРАН НА 3-D ФАРМАКОФОРНИМ СТУДИЈАМА, СИНТЕЗА НОВОДИЗАЈНИРАНИХ ЈЕДИЊЕЊА И АНТИКАНЦЕРОГЕНА АКТИВНОСТ ПРОТИВ РАКА ДОЈКЕ <i>in vitro</i> И <i>in vivo</i></i>	367
ГЕНЕРИСАЊЕ 3-D ФАРМАКОФОРНИХ ХИПОТЕЗА И 3-D QSAR МОДЕЛА И ЊИХОВА ИНТЕРПРЕТАЦИЈА	369
ПОРЕКЛО/ЗНАЧАЈ D ₁ ФАРМАКОФОРНЕ ОСОБИНЕ И СА ЊОМ ПОВЕЗАНИХ PLS-КОЕФИЦИЈЕНАТА	372
ПОРЕКЛО/ЗНАЧАЈ D ₂ ФАРМАКОФОРНЕ ОСОБИНЕ И СА ЊОМ ПОВЕЗАНИХ PLS-КОЕФИЦИЈЕНАТА	372
ПОРЕКЛО/ЗНАЧАЈ H ₁ /R ₁ ФАРМАКОФОРНЕ ОСОБИНЕ И СА ЊОМ ПОВЕЗАНИХ PLS-КОЕФИЦИЈЕНАТА	375
ПОРЕКЛО/ЗНАЧАЈ H ₂ /R ₂ ФАРМАКОФОРНЕ ОСОБИНЕ И СА ЊОМ ПОВЕЗАНИХ PLS-КОЕФИЦИЈЕНАТА	377
ПОРЕКЛО/ЗНАЧАЈ H ₃ /R ₃ ФАРМАКОФОРНЕ ОСОБИНЕ И СА ЊОМ ПОВЕЗАНИХ PLS-КОЕФИЦИЈЕНАТА	377
ПОРЕКЛО/ЗНАЧАЈ A ФАРМАКОФОРНЕ ОСОБИНЕ И СА ЊОМ ПОВЕЗАНИХ PLS-КОЕФИЦИЈЕНАТА	379
ПОРЕКЛО/ЗНАЧАЈ P ФАРМАКОФОРНЕ ОСОБИНЕ И СА ЊОМ ПОВЕЗАНИХ PLS-КОЕФИЦИЈЕНАТА	380
ПРОЦЕНА СПОСОБНОСТИ РАЗЛИЧИТИХ АЛГОРИТАМА И ФУНКЦИЈА ПОГОДАКА	

ЗА РЕПРОДУКЦИЈУ КРИСТАЛНИХ СТРУКТУРА ПАРЦИЈАЛНИХ АГОНИСТА И АНТАГОНИСТА ERα КОРИСТЕЊИ КОМЕРЦИЈАЛНЕ СОФТВЕРЕ	381
ПРОЦЕНА ПОРАВЊАЊА БАЗИРАНОГ НА СТРУКТУРИ МОЛЕКУЛСКЕ МЕТЕ	381
ПРОЦЕНА ПОРАВЊАЊА БАЗИРАНОГ НА СТРУКТУРИ ЛИГАНАДА	382
ПРОЦЕНА ПРЕДИКТИВНЕ СПОСОБНОСТИ 3-D РНУР/3-D QSAR МОДЕЛ АНСАМБЛА	384
ВИРТУЕЛНО СКЕНИРАЊЕ, АНТИКАНЦЕРОГЕНА АКТИВНОСТ И АНАЛИЗА БИОАКТИВНЕ КОНФОРМАЦИЈЕ БРЕФЕЛДИНА А КАО ПОГОТКА ЗА НИТ-ТО-LEAD ОПТИМИЗАЦИЈУ ПРЕМА ИНОВАТИВНИМ ЈЕДИЊЕЊИМА СА SERM ФАРМАКОЛОГИЈОМ	388
ПРАВИЛА ЗА РАЦИОНАЛНИ ДИЗАЈН НОВИХ ДЕРИВАТА БРЕФЕЛДИНА А КАО АНТАГОНИСТА ERα	392
СИНТЕЗА ДЕРИВАТА БРЕФЕЛДИНА А 3DPQ-1 ДО 3DPQ-12	395
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА СПЕКТРАЛНИХ ПОДАТАКА СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА 3DPQ-1 ДО 3DPQ-12	398
АНТАГОНИСТИЧКА АКТИВНОСТИ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА 3DPQ-1 ДО 3DPQ-12, РЕЛАТИВНИ АФИНИТЕТИ ВЕЗИВАЊА ПРЕМА ERα И ERβ И АНАЛИЗА БИОАКТИВНИХ КОНФОРМАЦИЈА	408
АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА 3DPQ-1 ДО 3DPQ-12 ПРОТИВ ERα(+)- И ERα(-)-ЗАВИСНИХ ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА РАКА ДОЈКЕ	413
АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА 3DPQ-1 ДО 3DPQ-12 ПРОТИВ ERα(+)-ЗАВИСНИХ ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА КАНЦЕРА ЕНДОМЕТРИЈУМА	417
УТИЦАЈ СИНТЕТИСАНИХ АНТАГОНИСТА ERα 3DPQ-1 ДО 3DPQ-12 НА ПРОЦЕСЕ СИГНАЛНЕ ТРАНСДУКЦИЈЕ УНУТАР MCF-7 ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА	417
ЕФЕКТИ СИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА 3DPQ-1 ДО 3DPQ-12 НА ЦИТОТОКСИЧНОСТ И ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС MCF-7 ЋЕЛИЈСКИХ ЛИНИЈА	419
<i>In vivo</i> СКРИНИНГ ЈЕДИЊЕЊА 3DPQ-1 ДО 3DPQ-12 ПРОТИВ РАКА ДОЈКЕ	421
ЗАКЉУЧАК	426
ЛИТЕРАТУРА	
ДОДАТНИ МАТЕРИЈАЛИ	
ПУБЛИКОВАНИ РЕЗУЛТАТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ	
БИОГРАФИЈА СА БИБЛИОГРАФИЈОМ	

САДРЖАЈ



**Постулати
докторске
дисертације**

Докторска дисертација

„Антагонисти естроген рецептора α : Рационални дизајн нових супресаната рака дојке базиран на 3-D QSAR, COMBINER и 3-D фармакофорним студијама”

базирана је на следећим постулатима:

- ❖ Генерисање оптимизованих и робусних 3-D QSAR, COMBINER и 3-D фармакофорних модела против физиолошке активности естроген рецептора α зарад разумевања фармакологије парцијалних агониста, мешовитих агониста/антагониста и потпуних антагониста у односу на естроген рецептор α
- ❖ Проналажење оптималних алгоритама и функција погодака за репродукцију постојећих експериментално одређених биоактивних конформација лиганата естроген рецептора α и генерисање биоактивних конформација нетестираних лиганата естроген рецептора α
- ❖ Рационални дизајн нових антагониста естроген рецептора α базиран на 3-D QSAR, COMBINER и 3-D фармакофорним студијама
- ❖ Генерисање биоактивних конформација новодизајнираних антагониста естроген рецептора α
- ❖ Предвиђање биолошке активности новодизајнираних антагониста естроген рецептора α помоћу генерисаних 3-D QSAR, COMBINER и 3-D фармакофорних модела
- ❖ Синтеза новодизајнираних антагониста естроген рецептора α
- ❖ Биохемијска евалуација новодизајнираних антагониста естроген рецептора α *in vitro*
- ❖ Биохемијска евалуација новодизајнираних антагониста естроген рецептора α *in vivo*
- ❖ Селекција водећих једињења за предклиничка и клиничка испитивања

УВОД

1

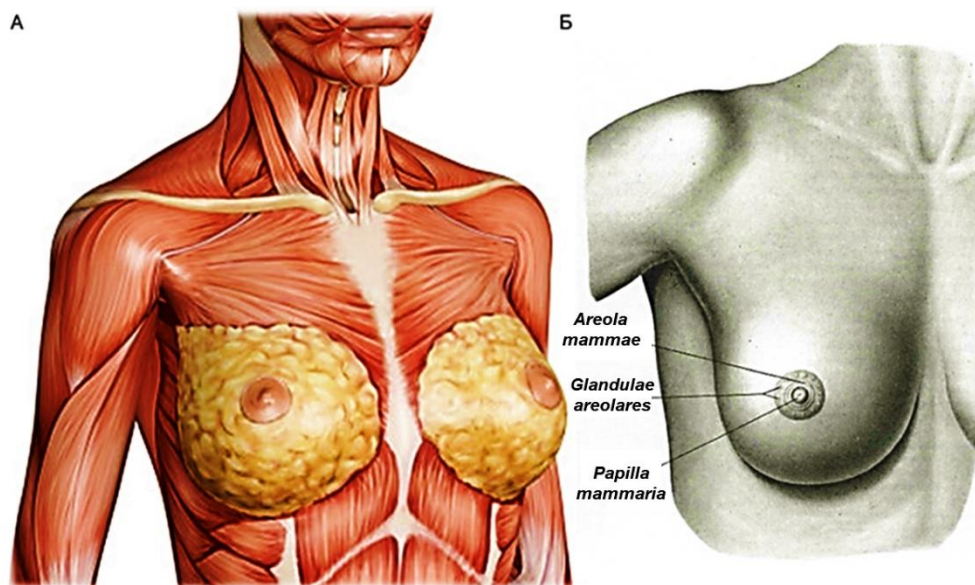
Дојка је често седиште бројних патолошких процеса од којих је **КАРЦИНОМ** најважнији, јер представља **ВОДЕЋИ УЗРОК СМРТНОСТИ** код жена од малигних болести!!!

Увод

Дојка

Морфологија дојке

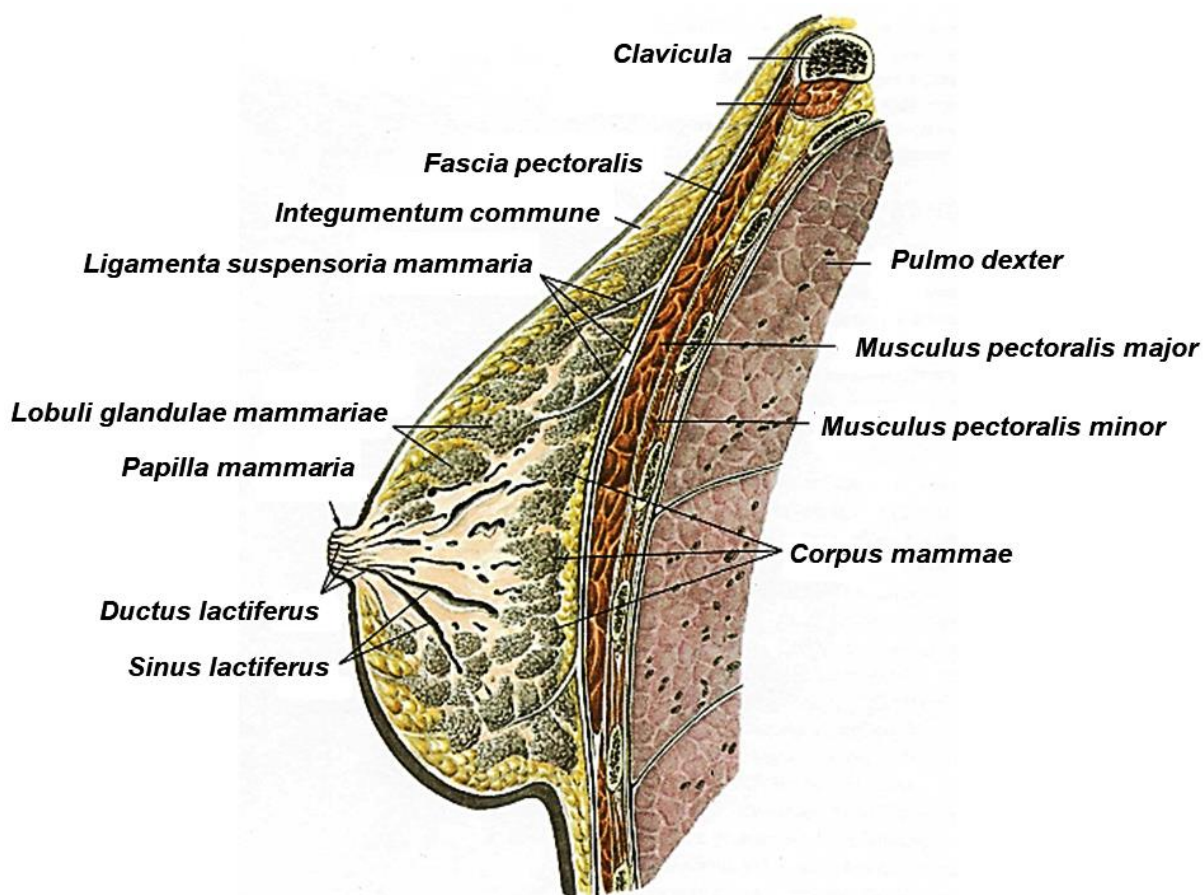
Дојка је апокрина знојна жлезда [1]. Смештена је на предњој страни грудног коша, између трећег и седмог ребра, на средини грудне кости и пазуха; основа дојке налази се на фасцији великог грудног мишића са којом је повезана растреситим везивним ткивом, што је чини изразито покретном [2] (Слика 1.1). Дојка код полно зреле жене је полу-лоптастог или купастог облика (Слика 1.2) [3,4]. Први сегмент анатомије дојке чини кожа која је танка, глатка, садржи знојне и лојне жлезде и фоликуле длака. Кожа у пределу дојке је ваљкастог облика, неравне површине са неколико изводних млечних канала. Основа дојке завршава се брадавицом (лат. *Papilla mammaria*) која се налази на кожи дојке и чија је висина износи 10-12 mm. Кружно, тамније пигментовано поље око брадавице, чији је промер 2-5 cm назива се брадавични колут (лат. *Areola mammae*) [4]. Кроз брадавицу се прожимају мишићна влакна кружно и зракасто. Контракцијом мишићних влакана, брадавица се подиже и постаје испупчена и чврста. Унутар малих отвора који се налазе на брадавицама налазе се млечни каналићи. На ареоли се налазе Montgomery-јеве квржице са измењеним лојним жлездама, чије се лучење током дојења појачава. До пражњења млечних жлезда током дојења долази контракцијом глатких мишићних влакана који су распоређени око изводних канала [3,4].



Слика 1.1. Анатомска локализација дојке (А); Основне анатомске карактеристике дојке (Б).

Увод

Познавање физиологије дојке захтева разумевање њене анатомије, односно поткожног ткива и паренхима, као система жлезданог епитела систематизованог у тубулоалвеоларне формације (ацинусе) и одводне дуктусе дојке [3,4] (Слика 1.2). Кожа дојке обложена је стромом, односно фиброзним и поткожним масним-везивним ткивом (Слика 1.2). Поткожно ткиво прожето је танким везивним преградама [4,5]. Везивно ткиво које изграђује преграде развучено је између коже и фасције великог грудног мишића (лат. *Musculus pectoralis major*) (Слика 1.2) [6]. Дојке могу променити свој облик и положај прскањем преграда које одржавају њихову чврстину [6]. Везивно ткиво, заједно са суспензорним лигаментима дојке (лат. *Ligamenta suspensoria mammaria*), подржава усправан положај дојке (Слика 1.2). Левкасти продужетак ткива дојке који је усмерен према пазушној јами назива се Spens-ов реп, односно аксиларни наставак или аксиларни реп (лат. *Processus lateralis mammae*) и богат је лимфним чворовима.



Слика 1.2. Детаљна анатомија дојке.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Мишићна подлога дојке на грудном кошу је велики, широки и пљоснати грудни мишић (лат. *Musculus pectoralis major*), усмерен ка горњем врху хумеруса [4,6]. Испод површине великог грудног мишића налази се мали грудни мишић (лат. *Musculus pectoralis minor*) који је прекривен дубоком фасцијом, чиме се формира предњи зид пазушне јаме [4,6]. Стернални мишић (лат. *Musculus sternalis*) мање је изучаван а у краниокаудалној мамографској пројекцији може да имитира малигну промену [4,6].

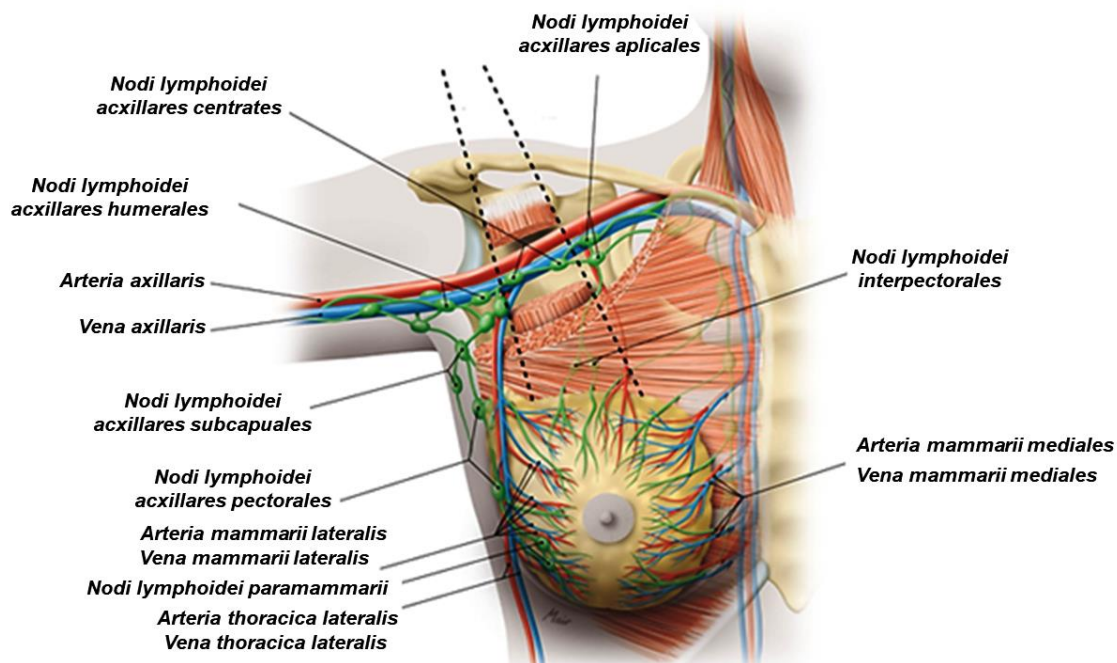
У средишту дојке налази се млечна жлезда (лат. *Glandula mammaria*) која се састоји од неколико режњева (лат. *Lobi glandulae mammariae*). Режњеви се одвајају чврстим везивним преградама (лат. *Septa interlobaria*) и усмерени су према брадавици. Структуру појединачног режња чини већи број режњића (лат. *Lobuli glandulae mammariae*), међусобно раздвојених везивним ткивом. Сваки од режњића садржи мале изводне млечне каналиће сачињене од проширеног дела (лат. *Alveola*) и цевастих делова (лат. *Tubuli*). Зидови малих изводних каналића формирани су од стране жлезданих ћелија. Груписањем млечних изводних каналића настаје велики изводни млечни канал (лат. *Ductus lactiferus*) који је усмерен је ка врху брадавице, где се и отвара млечним синусом (лат. *Sinus lactiferus*) ширине 2-8 mm и дужине 4-9 mm, који се може ширити и сужавати (Слика 1.2) [7,8].

Сама дојка прожета је артеријским крвним судовима који потичу од интерне торакалне артерије (лат. *Arteria thoracica interna*) и латералне торакалне артерије (лат. *Arteria thoracica lateralis*) (Слика 1.3) [7], односно венским крвним судовима који формирају површинско или дубоко венско клупко. Простор око брадавице (лат. *Plexus venosus mamillae s. ciculus venosus Halleri*) чини венац сачињен од површних вена. Крв се до аксиларне вене (лат. *Vena axillaris*), а делом и до интерне торакалне вене (лат. *Vena thoracica interna*) допрема преко анатомског венца [7]. Такође, дојка је прожета и лимфним судовима (Слика 1.3) [6,9,10] којима се допрема лимфа из брадавице и брадавичног колута, режњева млечне жлезде и млечних канала до пазушних лимфних чворова [4,10], али којима се шире и метастазе карцинома дојке до регионалних лимфних жлезда [11]. Нервна влакна дојке су површна и дубока. Кожа дојке је инервисана са три нервна стабла која се завршавају конвергацијом према ареоли и брадавици. Нервна влакна која полазе од симпатикуса у млечну жлезду чине дубока нерва влакна [6].

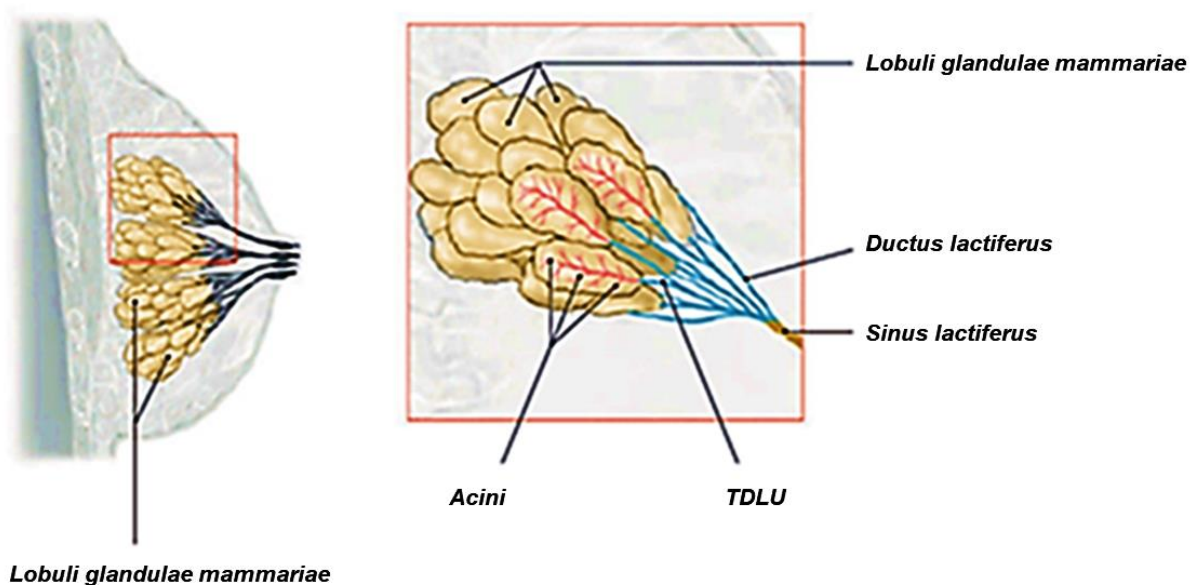
Основна микроанатомска јединица и функционална структура дојке је терминално дуктална лобуларна јединица (енг. terminally ductal lobular unit, TDLU) (Слика 1.4), која се налази унутар лобуса (лат. *Lobi glandulae mammariae*) и коју чине

Увод

терминални дуктус и растресито специфично везивно ткиво, те која представља морфолошку структуру у којој се најчешће формирају бенигне и малигне промене (Слика 1.4) на дојци, попут фиброаденома, склерозирајуће аденозе, апокрине метаплазије, апокрине цисте, епителне цисте, односно лобуларног и дукталног карцинома *in situ* [12].



Слика 1.3. Крвни судови и лимфни систем дојке (Извор: <https://www.flickr.com/photos/sobotta/4643860853>).

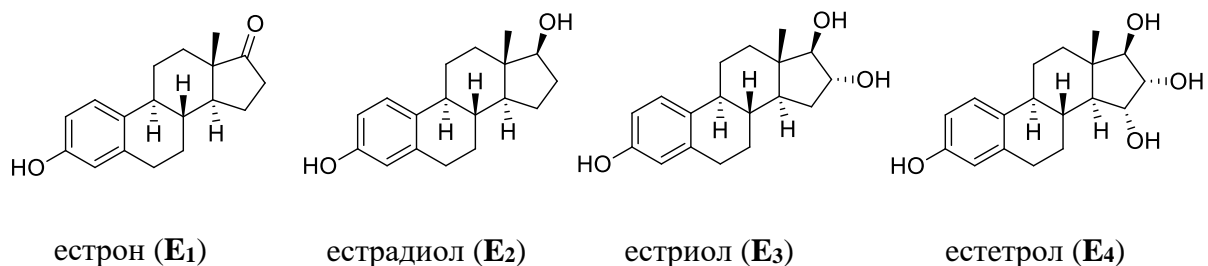


Слика 1.4. Приказ полазишта најчешћих патолошких промена дојке (Извор: https://trantor.is/read/dcpLY2Q-3_Eh0qSD/Text/Chapter007.xhtml#s036).

Естрогени хормони

Структура и физиолошки значај естрогених хормона

Познати морфоген 17 β -естрадиол (**E₂**) (Слика 1.5) биосинтетише се у дојци и представља регулатора транскрипције гена активираних помоћу два естрогена рецептора (енг. Estrogen Receptors, ERs), изоформе α (ER α), односно изоформе β (ER β), од којих ER α има пресудну улогу у нормалној и пато-физиологији дојке [13]. Биосинтезу ER α , односно ER β , кодирају гени *ESR1* и *ESR2*, респективно (Слика 1.6) [14]. *ESR1* јесте велики геномски сегмент који се састоји од тристотине хиљада база (~300 kb) и лоциран је на q24-q27 хромозома 6 [15-18]. *ESR1* садржи осам ексона који кодирају протеин тежине 66 kDa који се састоји од 595 аминокиселина [15-18]. Слично томе, *ESR2* који је мапиран на q22-24 хромозома 14, представља велики сегмент од 254 kb са такође осам кодирајућих ексона [19]. Транскрипцијом *ESR2* формира се протеин чију примарну структуру чини 530 аминокиселина са молекулском масом од 60 kDa [20]. Период идентичности у секвенци ER α и ER β износи 49,05% [15]. Своју физиолошку улогу естрогени рецептори остварују као чланови класе II суперфамилије нуклеарних рецептора (енг. Nuclear Receptor, NR) [13], односно суперфамилије стероид-тироидретиноидних рецептора. Њихов агонист, **E₂**, као преобладајући естрогени хормон (од Грчког $\epsilon\rho\rho\mu\acute{\iota}$ - покренути, пробудити), примарно се биосинтетише у фоликулама женских јајника, али такође и у другим ендокриним и неендокриним ткивима, попут дојке [21].



Слика 1.5. Структура и тривијална номенклатура естрогених хормона.

ER α јесте изоформа која преовлађује и која је медијатор физиолошке активности **E₂** кроз плодност, током развоја млечних жлезда, односно током хормонске регулације метаболизма глукозе, кардиоваскуларног система и хипоталамус-хипофиза система, те током одржавања минералне густине костију [22]. Као кључни фактор у развоју карцинома дојке (енг. Breast cancer, BC), повећана биосинтеза и хормонална активност **E₂** иницирају серију молекуларних процеса

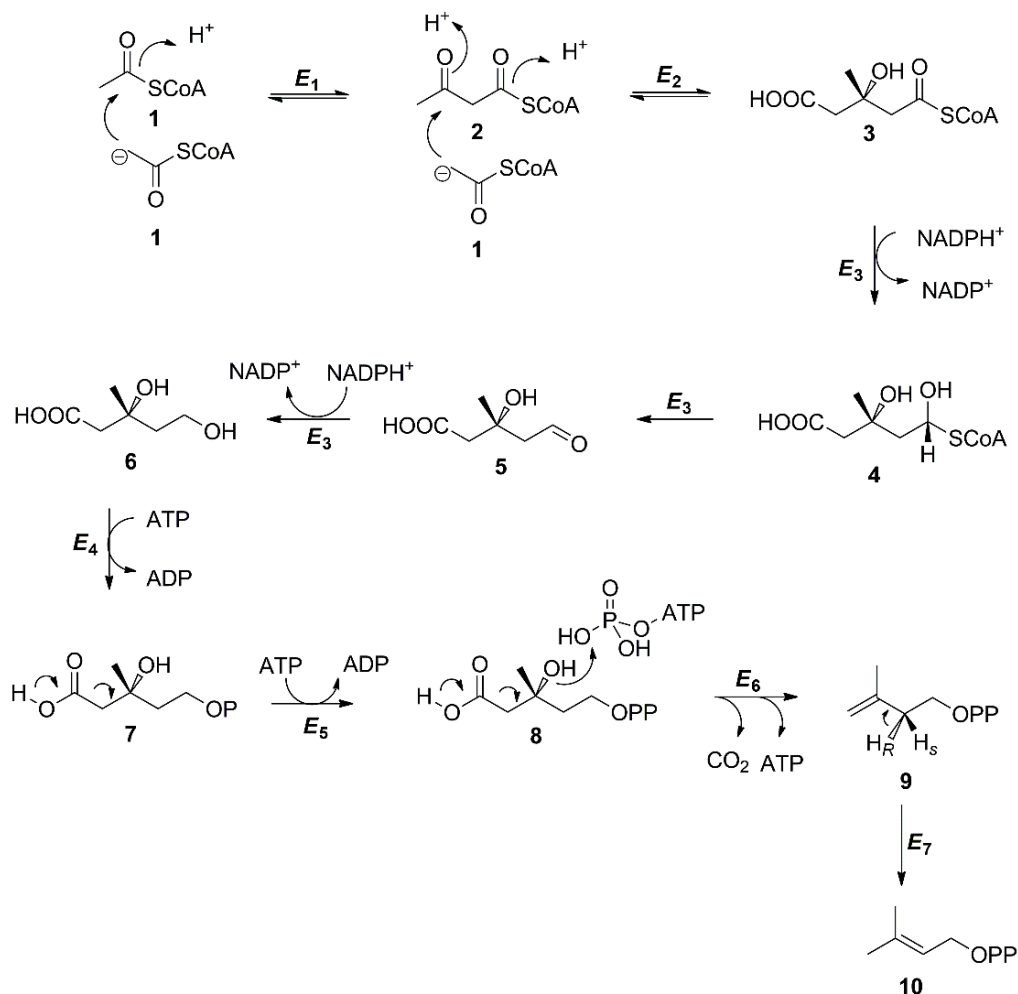
Докторска дисертација Незрине Куртановић

Биосинтеза естрогених хормона

Током плодног периода жене (односно између пубертета и менопаузе), E_2 се примарно биосинтетише се у Графовом фоликулу оваријума, мада тело лутеума и постелица током трудноће такође секретују велике количине E_2 . Биосинтеза естрогена код мушкараца врши се у тестисима, а количине су занемарљиве [24]. Током биосинтезе, E_2 је у метаболичкој равнотежи са естроном (E_1 , Слика 1.5), док су естриол (E_3 , Слика 1.5) и естетрол (E_4 , Слика 1.5) физиолошки неактивни [25,26]. Биосинтеза E_2 такође је хормонски завистан процес, а прекурсор биосинтезе јесте холестерол [27]. Наравно, сама биосинтеза холестерола одвија се у цитоплазми и ендоплазматичном ретикулуму.

Биосинтетски пут започиње транслокацијом три молекула ацетил-СоА (**1**) из митохондрије у цитосол, где се затим два молекула ацетил-СоА подвргавају Claisen-овој кондензацији у реакцији коју катализује тиолаза (E_1), да би настао ацетоацетил-СоА (**2**), док се трећи инкорпорира стереоспецифичном алдолном кондензацијом да би настао естар разгранатог низа β -хидрокси- β -метилгулатрил-СоА (енг. β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA, HMG-CoA) (**3**), у реакцији коју катализује β -хидрокси- β -метилгулатрил-СоА синтаза (енг. β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA synthase, HMGCS) (E_2) (Шема 1.1). Пре реакције алдолне концензације, трећи молекул ацетил-СоА бива ковалентно везан за HMGCS преко тиолне групе, да би се ковалентна веза хидролизовала и формирала слободна карбоксилна група HMG-CoA. Све наредне реакције одвијају се у ендоплазматичном ретикулуму. HMG-CoA се конвертује до мевалоната (енг. mevalonic acid, MVA), каталитичким деловањем HMG-CoA редуктазе (енг. HMG-CoA reductase, HMGCR) (E_3). Конверзија HMG-CoA у MVA подразумева двостепену редукцију тиоестарске групе до примарног алкохола: најпре се тиоестар уз помоћ NADPH као донора еквивалента редукције редукује до полутиоацетала мевалидичне киселине (**4**), да би се потом полуацетална хидроксилна група редуковала до мевалидичне киселине (**5**), уз елиминацију СоА; други молекул NADPH редукује алдехидну функционалну групу и настаје MVA (**6**). Редукција HMG-CoA до MVA есенцијално је иреверсна и одређује ред биохемијске реакције. Затим се MVA као интермедијер са шест угљеникових атома трансформише у изопренске јединице са пет угљеникових атома у серији реакција које започињу фосфорилацијом примарне алкохолне групе MVA.

Увод



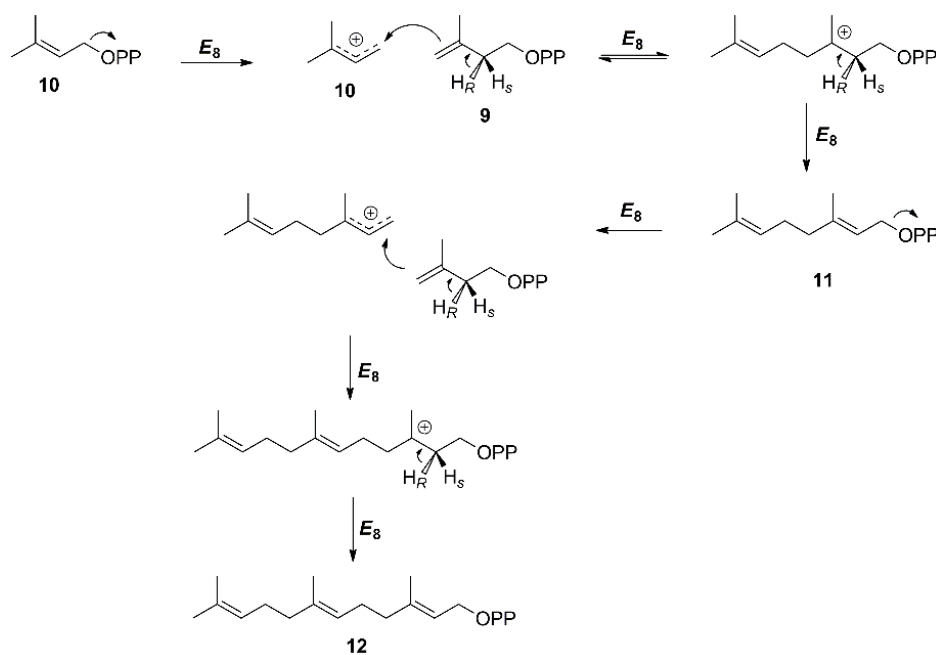
Шема 1.1. Биосинтеза естрогених хормона до DMAPP. Природни производи: ацетил-СоА (1), ацетоацетил-СоА (2), β-хидрокси-β-метилгулатрил-СоА (енг. β-hydroxy-β-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA) (3), полутиоацетал мевалидичне киселине (4), мевалидична киселина (5), мевалонат (енг. mevalonic acid, MVA) (6), 5-фосфомалонат (7), 5-пирофосфатмевалонат (8), изопентил пирофосфат (енг. isopentenyl PP, IPP) (9), диметилалил пирофосфат (енг. dimethylallyl PP, DMAPP) (10). Ензими: тиолаза (*E*₁), β-хидрокси-β-метилгулатрил-СоА синтаза (енг. β-hydroxy-β-methylglutaryl-CoA synthase, HMGCS) (*E*₂), HMG-CoA редуктазе (енг. HMG-CoA reductase, HMGCR) (*E*₃), мевалонат-5-фосфоестераза (*E*₄), 5-фосфомалонат киназа (*E*₅), 5-пирофосфосфомевалонат декарбоксилаза (*E*₆), IPP изомераза (*E*₇).

Тако, реакцијом коју катализује мевалонат-5-фосфоестераза (*E*₄) биосинтетише се 5-фосфомалонат (7), док 5-фосфомалонат киназа (*E*₅) катализује биосинтезу 5-пирофосфатмевалоната (8). Реакцијом коју катализује 5-пирофосфосфомевалонат декарбоксилаза (*E*₆) најпре се биосинтетише интермедијер 3-фосфо-5-пирофосфосфомевалонат настао фосфорилацијом терцијарне хидроксилне групе, да би се потом таква хидрокислна група понашала као добро одлазећа група и била елиминисана из система уз вициналну декарбоксилацију, након којих настаје изопентил пирофосфат (енг. isopentenyl PP, IPP) (9). Настали IPP потом подлеже

Докторска дисертација Незрине Куртановић

реакцији IPP изомеразе (E_7) до биосинтезе диметилалил пирофосфата (енг. dimethylallyl PP, DMAPP) (10). У поменутој реакцији, изомераса уклања про- R протон (енг. pro- R proton, H_R) у стереоспецифичној реакцији са положаја C_2 IPP, те инкорпорира протон из молекула воде на положај C_4 . Иако је изомеризација готово реверзибилна, равнотежа реакције померена је ка формирању DMAPP. Оваква конверзија креира реактивни електрофил који самим тим постаје добар алкилујући агенс. DMAPP поседује дифосфат као добро одлазећу групу и у SN_1 процесу може дати алилни карбокатион стабилизован делокализацијом. Супротно томе, IPP ће се са својом терминалном двоструком везом пре понашати као нуклеофил, нарочито према електрофилном DMAPP. Различита реактивност два интермедијера основа је за даљу биосинтезу холестерола.

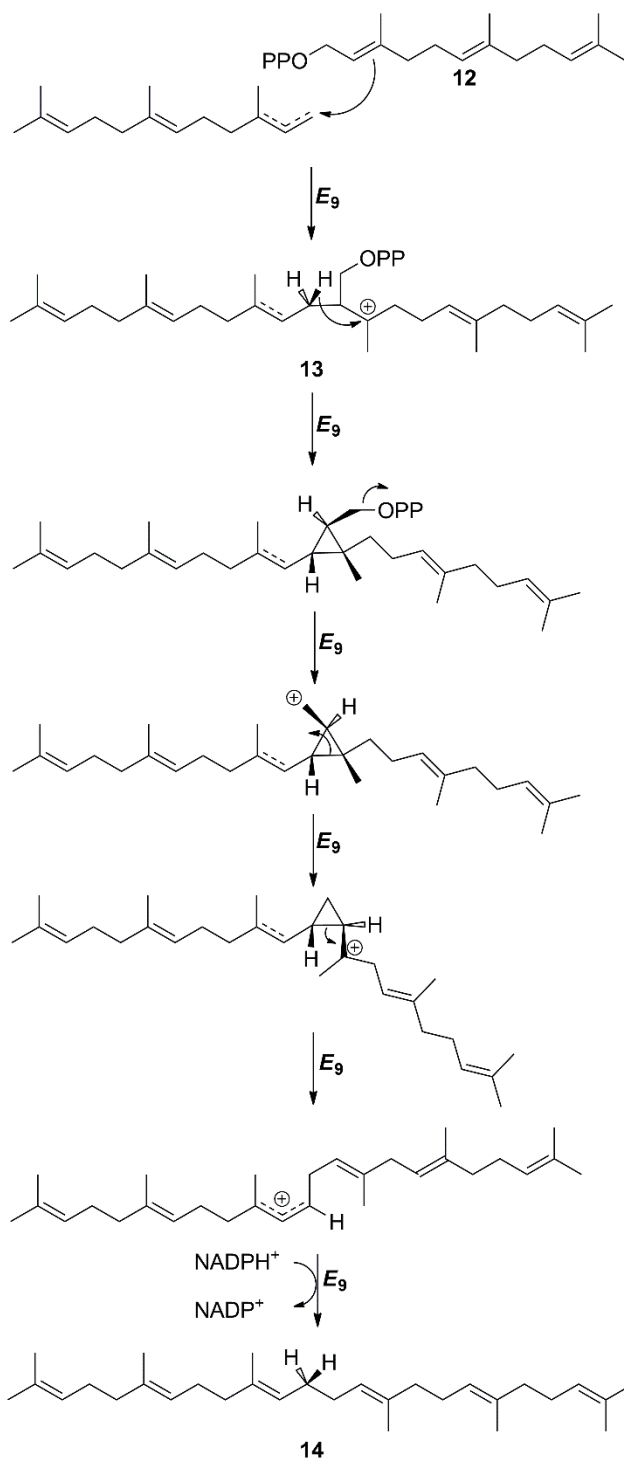
Купловање DMAPP и IPP катализовано пренил трансферазом (E_8) резултује биосинтезом геранил пирофосфата (енг. geranyl PP, GPP) (11), са новом двоструком везом *trans*-стереохемије (Шема 1.2). Реакција купловања подразумева јонизацију DMAPP до алил катјона, адицију на двоструку везу IPP и губитак протона. Кондензација GPP са још једним молекулом IPP резултује биосинтезом фарнезил пирофосфата (енг. farnesyl diphosphate (FPP) (11). Поново, иницијална јонизација GPP и губитак C_2 протона IPP стереохемијски су аналогни.



Шема 1.2. Биосинтеза естрогених хормона са корацима конверзије DMAPP до FPP. Природни производи: геранил пирофосфат (енг. geranyl PP, GPP) (11), фарнезил пирофосфата (енг. farnesyl diphosphate (FPP) (11). Ензими: пренил трансфераза (E_8).

Увод

Наредни корак у биосинтези не одвија се очекиваном адицијом IPP на FPP, већ два молекула FPP даље подлежу линеарном купловању по принципу реп-реп, катализованом сквален синтазом (E_9), да би настао сквален (**14**) као прави прекурсор холестерола (Шема 1.3).



Шема 1.3. Биосинтеза естрогених хормона са кораца конверзије FPP до сквалена. Природни производи: пресквален пирофосфат (енг. presqualene PP, PSPP) (**13**), сквален (**14**). Ензими: сквален синтаза (E_9).

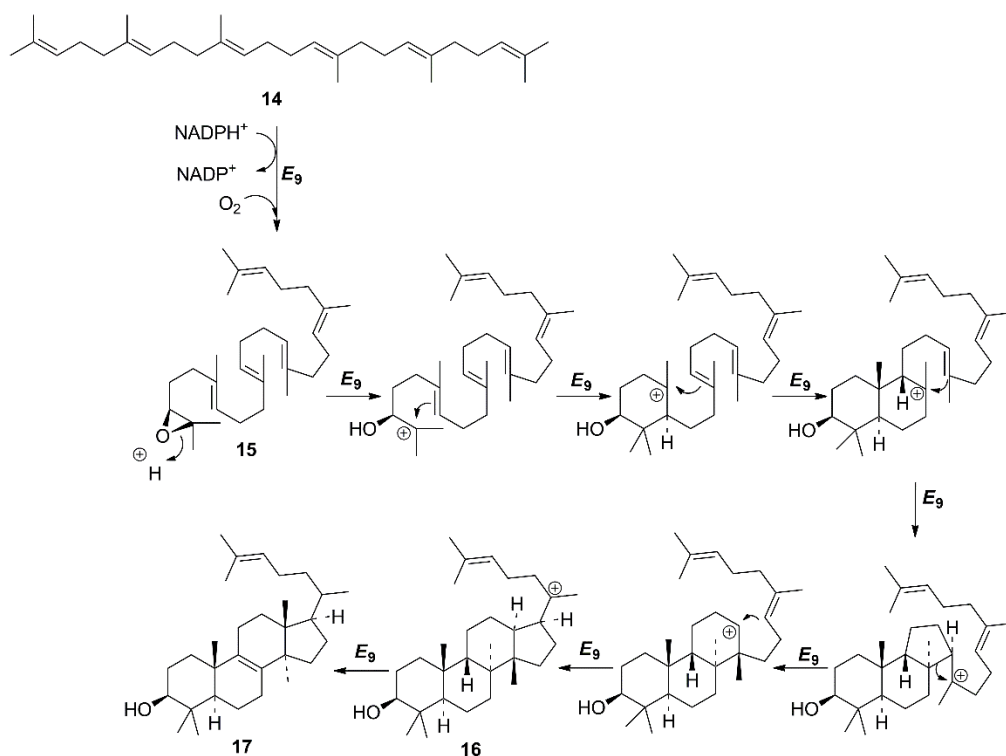
Докторска дисертација Незрине Куртановић

Током купловања, које се своди на уклањање две дифосфатне групе, протон са положаја C1 једног молекула FPP губи се зарад редукције положаја помоћу NADPH. Ова оксидо-редукција највероватније се изводи уз учешће пресквален пирофосфата (енг. presqualene PP, PSPP) (**13**) као интермедијера, који настаје као последица напада 2,3-двоструке везе FPP на фарнезил катјон, након чега резултујући терцијарни катјон отпушта свој протон и формира прстен циклопропана унутар PSPP. Очито, да би се биосинтетисао сквален, мора настати катјонски интермедијер циклопропана. Елиминација дифосфата из PSPP резултовала би формирањем неповољног примарног катјона који кроз Wagner–Meerwein-ово 1-3 премештање може бити трансформисан у терцијарни карбокатјон као предуслов за настанак нове C1-C1 везе сквалена. Раскидање оригиналне, али сада сувишне C1–C2 везе може резултовати алилним катјоном из кога сквален настаје редукцијом хидридним протоном из NADPH.

Циклизација сквалена ка холестеролу одвија се формирањем интермедијера 2,3-оксида (**15**), који настаје у реакцији катализованом од стране флавопротеина који захтева учешће O₂ и NADPH као кофактора (Шема 1.4). Настанак интермедијера иницира серију циклизационих реакција праћених Wagner–Meerwein-овим миграцијама метил група и хидрида да би настао фотостерил катјон (**15**), односно прва структура која садржи препознатљиво перхидроциклофенантренско језгро као основу холестерола.

Секвенца реакција започиње протоновањем епоксидне групе и формирањем терцијарног карбокатјона који може извршити електрофилну адицију на двоструку везу зарад формирања шесточланог прстена А и новог терцијарног карбокатјона. Овај процес одвија се још два пута генеришући терцијарни карбокатјон након Markovnikov-љеве адиције током формирања прстенова В и С, уз напомену да се прстен С иницијално формира као петочлани. Међутим, уз Wagner–Meerwein-ово 1,2-алкилно премештање, петочлани прстен постаје шесточлани, што доводи до извесног ублажавања напрезања унутар прстена, али уз конверзију терцијарног карбокатјона у секундарни. Даља електрофилна адиција резултује стварањем терцијарног протостерил катјона (**16**) и коначно ланостерола (**17**) као прекурсора холестерола, након оксидације прстена В и настанка двоструке везе.

Увод

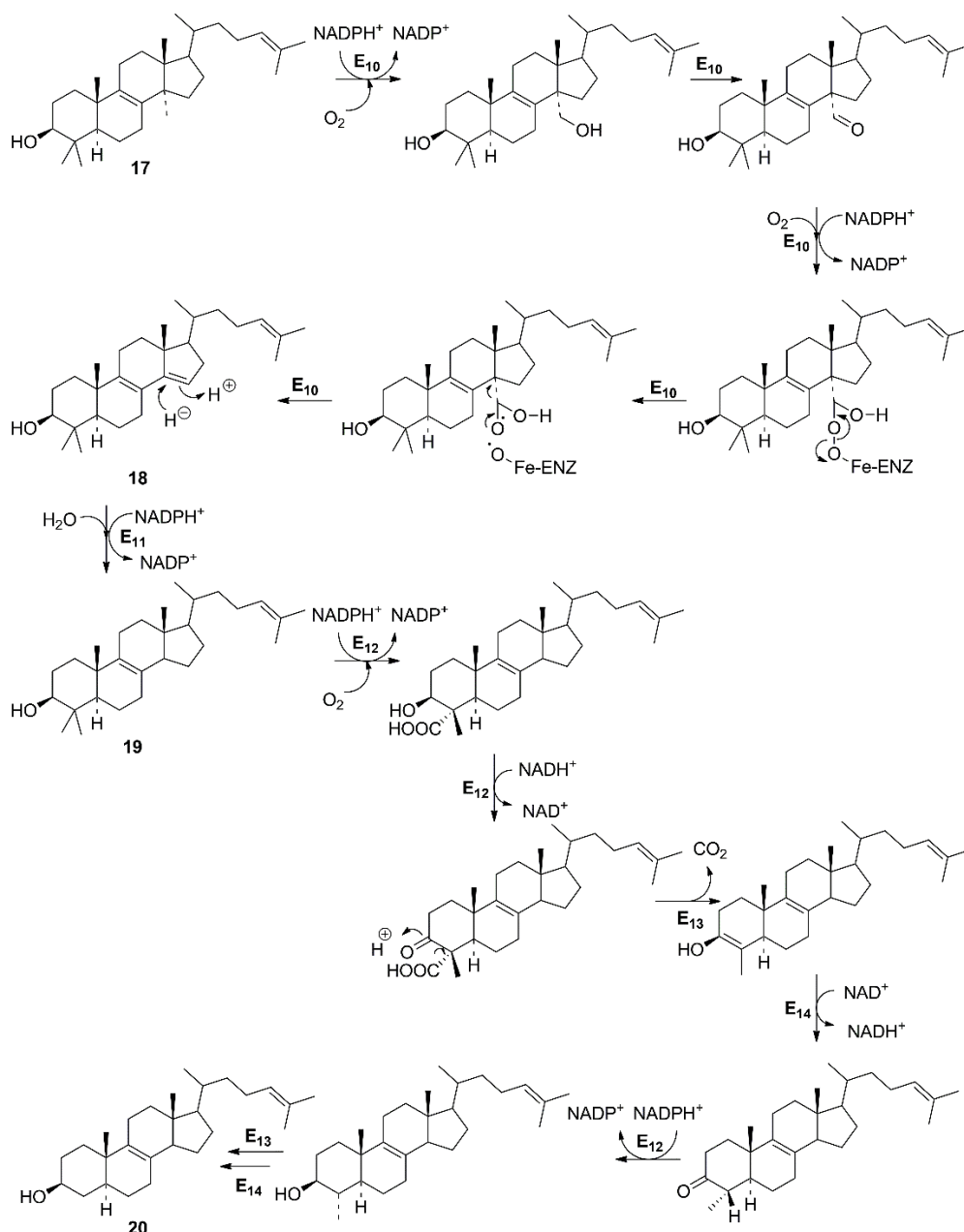


Шема 1.4. Биосинтеза естрогених хормона са кораца конверзије сквалена до протостерил катјона. Природни производи: сквален (14), фотостерил катјон (15), протостерил катјон (16), ланостерол (17). Ензими: сквален синтаза (E_9).

Биосинтеза холестерола из ланостерола даље подразумева губитак три метил групе, редукцију двоструке везе бочног низа и формирање $\Delta^{5,6}$ двоструке везе уместо $\Delta^{8,9}$ двоструке везе (Шема 1.5). Најпре, каталитичким деловањем ланостерол 14 α -деметилазе (E_{10}), која припада породици цитохром P450 монооксигеназа, долази до губитка метил групе на положају C14 уз формирање мравље киселине: процес се одвија биосинтезом 14 α -формил деривата (17a) и губитком формил групе уз настанак $\Delta^{8,14}$ диена, односно 4,4,-диметилхолеста-8(9),14,24-триен-3 β -ола (18), највероватније хомолитичким раскидањем пероксидног адукта. Потом долази до биосинтезе 14-диметил стерола, односно 4,4,-диметилхолеста-8,24-диен-3 β -ола (19), након NADPH-зависне редукције коју катализује 3 β -хидроксистерол Δ^{24} -редуктаза (енг. 3 β -hydroxysterol Δ^{24} -reductase (E_{11}), док новоуведени протон на положају C15 потиче из воде. Наредни важни кораци свде се на секвенцијални губитак C4 метил група до настанка зимостерола (енг. zymosterol) (20), где се оба угљеникова атома каталитичким деловањем комплекса C4 деметилације (енг. C4 demethylation complex), кога чине C4-стерол метилоксидаза (енг. C4-sterol methyoxidase) (E_{12}), C4-стерол декарбоксилаза (енг. C4-sterol decarboxylase) (E_{13}) и 3-кеторедуктаза (енг. 3-ketoreductase), уклањају

Докторска дисертација Незрине Куртановић

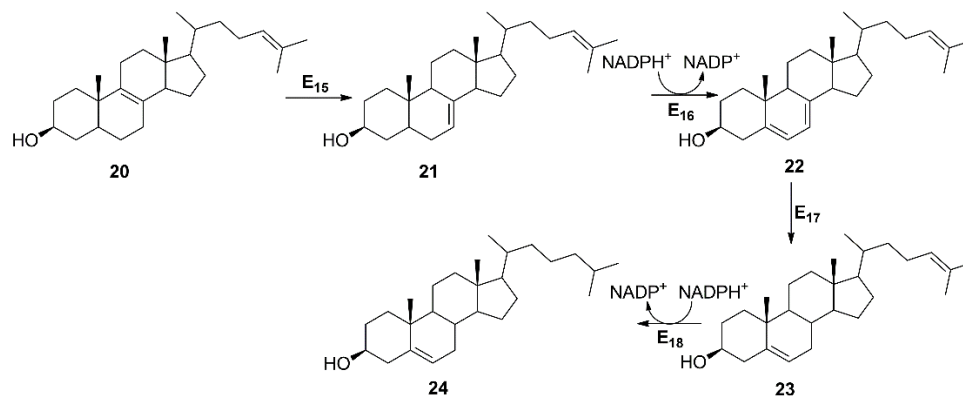
декарбоксилацијом. Деметилација се постиже оксидацијом 3-хидроксил групе до кетона, уз настанак β -кето киселине као интермедијера. Након тога, енолат поново постаје кетон, код кога преостала C4 група заузима повољну екваторијалну (4 α) оријентацију. Након елиминације прве метил групе, процес се sukcesивно понавља до настанка зимостерола.



Шема 1.5. Биосинтеза естрогених хормона са кораца конверзије ланостерола до зимостерола. Природни производи: 4,4,-диметилхолеста-8(9),14,24-триен-3 β -ол (18), 4,4,-диметилхолеста-8,24-диен-3 β -ол (19), зимостерол (20). Ензими: ланостерол 14 α -деметилаза (E₁₀), 3 β -хидроксистерол Δ^{24} -редуктаза (енг. 3 β -hydroxysterol Δ^{24} -reductase (E₁₁), C4-стерол метилоксидаза (енг. C4-sterol methyloxidase) (E₁₂), C4-стерол декарбоксилаза (енг. C4-sterol decarboxylase) (E₁₃), 3-кеторедуктаза (енг. 3-ketoreductase) (E₁₄).

Увод

Топологија зимостерола потом подлеже променама у смислу ефективне миграције Δ^8 двоструке везе на Δ^5 преко положаја Δ^7 , односно биосинтезе холеста-7,24-диен-3 β -ола (енг. *holesta-7,24-dien-3 β -ol*) (**21**), каталитичким деловањем 3 β -хидроксистерол Δ^8,Δ^7 -изомеразе (енг. *3 β -hydroxysterol Δ^8,Δ^7 -isomerase*) (E_{15}), те формирања $\Delta^{5,7}$ диена, односно 7-дехидроесмостерола (енг. *7-dehydroesmosterol*) (**22**), каталитичким деловањем латостерол 5-десатуразе (енг. *latosterol 5-desaturase*) (E_{16}) (Шема 1.6). Потом $\Delta^{5,7}$ диен постаје супстрат 3 β -хидроксистероид Δ^7 -редуктазе (енг. *3 β -hydroxysteroid Δ^7 -reductase*) (E_{17}) зарад биосинтезе десмостерола (**23**), након чије биосинтезе двострука веза на положају Δ^{24} бочног низа бива редукована NADPH-зависном 3 β -хидроксистероид Δ^{24} -редуктазом (енг. *3 β -hydroxysteroid Δ^{24} -reductase*) (E_{18}), до коначне биосинтезе холестерола (**24**), где се хидрид из коензима адире на C25, док H24 потиче из воде.



Шема 1.6. Биосинтеза естрогених хормона са корацима конверзије зимостерола до холестерола. Природни производи: зимостерол (20), холеста-7,24-диен-3 β -ола (енг. *holesta-7,24-dien-3 β -ol*) (21), 7-дехидроесмостерол (енг. *7-dehydroesmosterol*) (22), десмостерол (23), холестерол (24). Ензими: 3 β -хидроксистерол Δ^8,Δ^7 -изомераза (енг. *3 β -hydroxysterol Δ^8,Δ^7 -isomerase*) (E_{15}), латостерол 5-десатураза (енг. *latosterol 5-desaturase*) (E_{16}), 3 β -хидроксистероид Δ^7 -редуктаза (енг. *3 β -hydroxysteroid Δ^7 -reductase*) (E_{17}), 3 β -хидроксистероид Δ^{24} -редуктаза (енг. *3 β -hydroxysteroid Δ^{24} -reductase*) (E_{18}).

Утицај биосинтезе холестерола на свеукупну хомеостазу стероидних хормона, кроз описани анаболички пут (Шеме 1.1 до 1.6), круцијалан је, нарочито ако се молекул посматра као метаболички *pool* за биосинтезу естрогених хормона. Конверзија прекурсора холестерола до биолошки активних стероидних хормона назива се стероидогенеза. Јајник је главно место стероидогенезе, где диференцијација тека ћелија (ендокриних ћелија у оваријуму које формирају везивно ткиво које окружује фоликул) и ћелија гранулозе (ћелије фоликула, односно соматске ћелије пупчане врпце

Докторска дисертација Незрине Куртановић

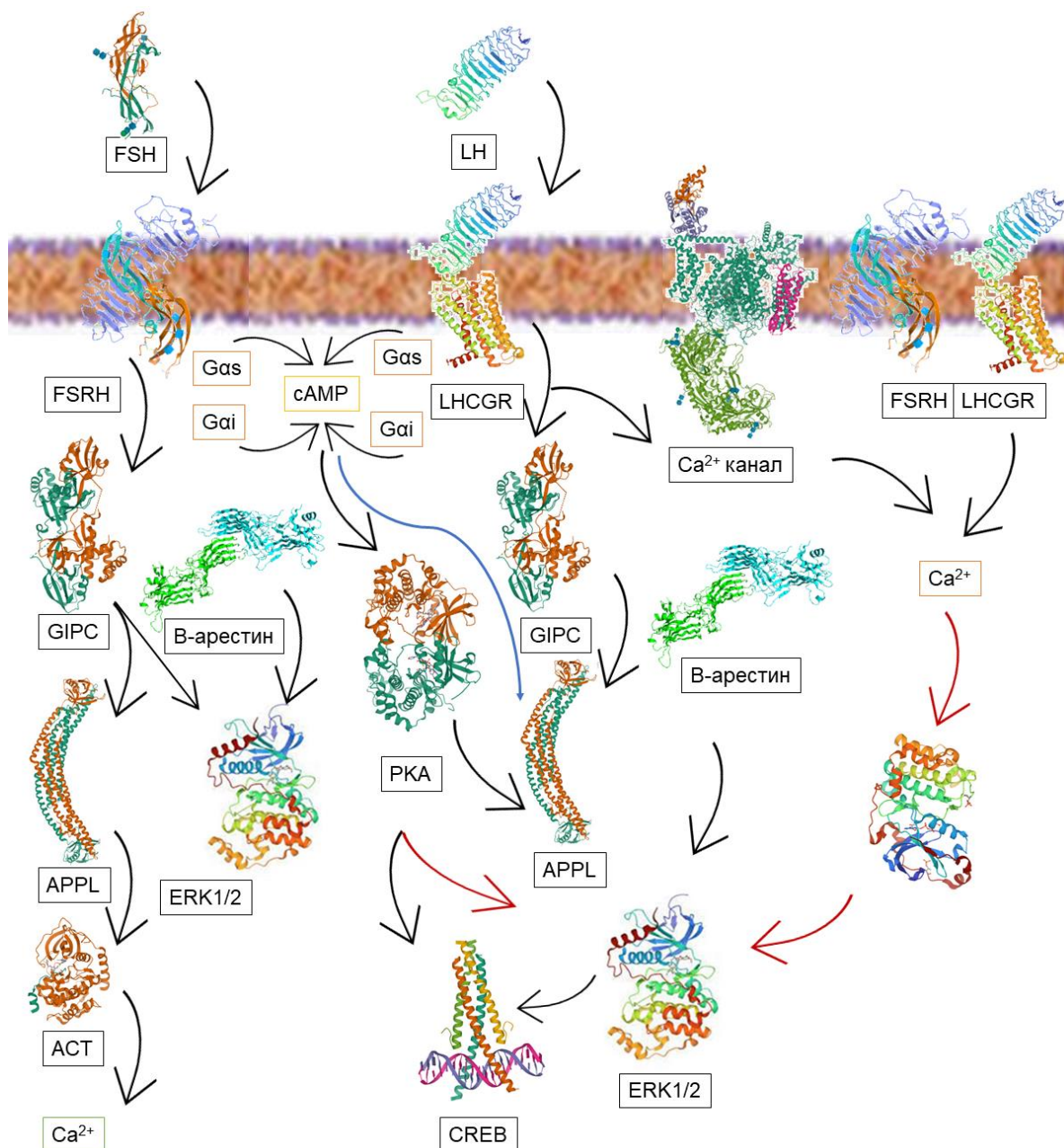
које су блиско повезане са женским полним ћелијама у развоју, или јајне ћелије у оваријуму) има виталну улогу у развоју и сазревању фоликула [28].

Ипак, неопходан услов за започињање саме биосинтезе естрогених хормона из холестерола јесте његова транслокација до унутрашње мембране митохондрије фоликула посредством стероидогеног акутног регулаторног протеина (енг. steroidogenic acute regulatory protein, StAR или STARD1). Експресија StAR контролише се механизмом који подразумева иницијалну интеракцију лутеинизирајућег хормона (енг. luteinizing hormone, LH) из хипофизе са рецептором лутеинизирајућег хормона/хориогонадотропина (енг. luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor, LHCGR), припадником фамилије рецептора везаних за G протеине (енг. protein-coupled receptors, GPCRs), односно гуанин нуклеотид-везујуће протеине (енг. guanine nucleotide-binding proteins, G proteins) (Слика 1.7) [29].

Високе концентрације LH утичу на то да тека ћелије повећавају своју тератогену активност и стимулишу каталитичку активност свих ензима који учествују у стероидогенези. Интеракција LH са LHCGR иницира сигналну трансдукцију која резултује активацијом G протеина као хетеродимера: G протеин остварује интеракцију са GTP, након чега долази до нарушавања терцијарне структуре хетеродимера и остваривања протеин-протеин интеракције α -субјединице G протеина ($G\alpha$) са аденилат циклазом, те потоње биосинтезе cAMP и активирања cAMP-зависне протеин киназе A (енг. protein kinase A, PKA). PKA је тетрамер са две алостерне субјединице и две каталитичке субјединице; након интеракције cAMP са алостерним центрима, каталитички центри PKA иницирају фосфорилацију протеина који остварују интеракције са транскрипционим фактором елемента одговора cAMP (енг. cAMP response element-binding transcription factor, CREB-TF), односно иницирају физиолошку активност секвенци DNA познатих као елементи одговора cAMP (енг. cAMP response elements, CRE), што доводи до активације транскрипције StAR и транслокације холестерола.

Такође, CREB-TF иницира транскрипцију и холестерол монооксигеназе (eng. cholesterol monooxygenase, CYP11A1) (**E19**), односно ензима који се често означава и као P450_{ssc} (где „ssc” представља акроним за раскидање бочног низа, енг. side-chain cleavage, ssc). Каталитичким деловањем P450_{ssc}, холестерол се на унутрашњој мембрани митохондрије конвертује до прегненолона (**25**) (Шема 1.7), који тако постаје прекурсор свих стероидних хормона и може да дифундује између суседних гранулоза и ћелија јајника [30].

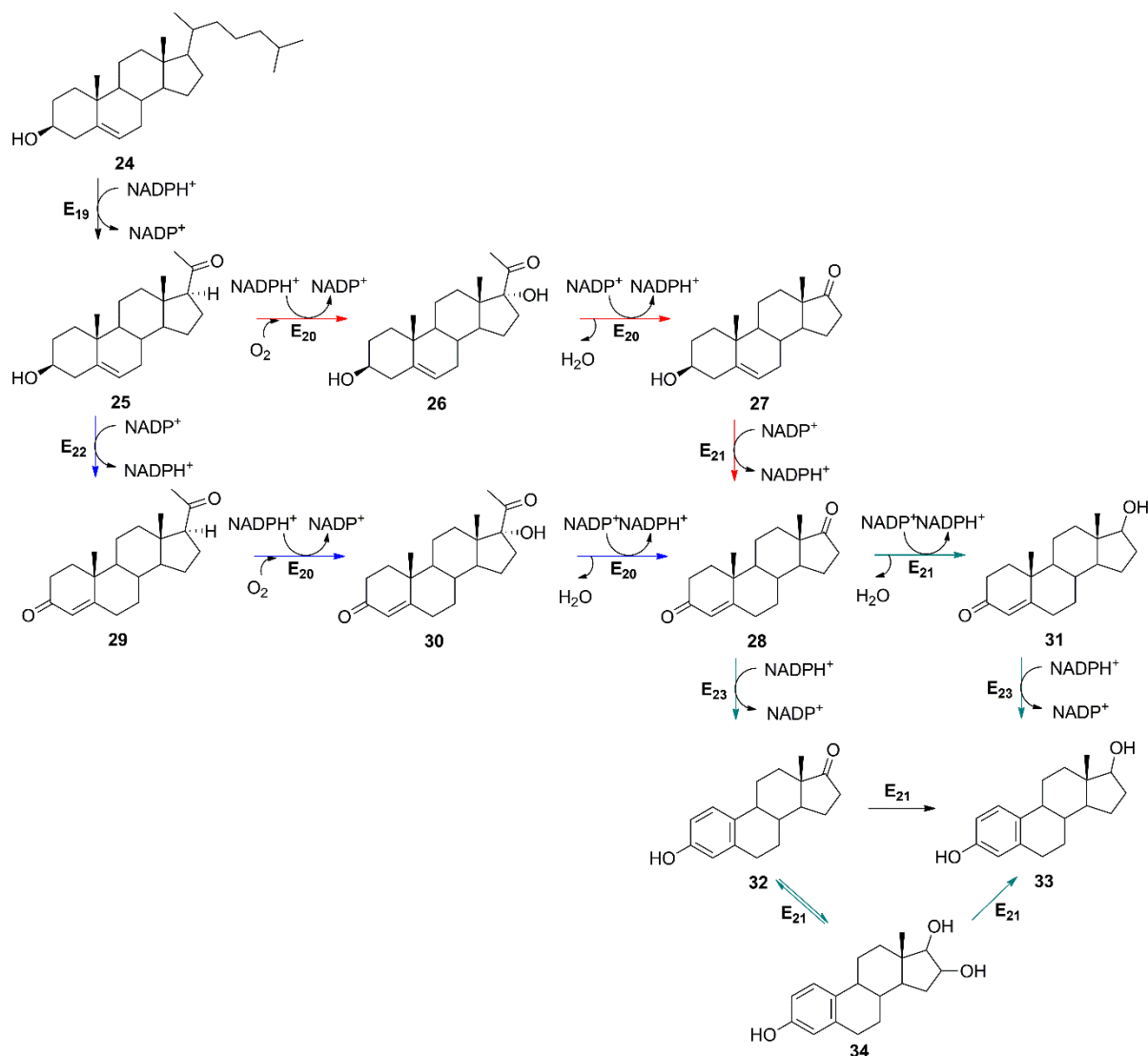
Увод



Слика 1.7. Сигнална трансдукција GPCR комплекса. Активирање FSHR и LHR G протеин-зависних и независних путева кроз рецептор-рецептор интеракције, рецептор–G сигналне протеинске интеракције и рецептор-адаптер протеинске интеракције (црне стрелице представљају дефинисане механизме процеса, црвене тренутно неразјашњене механизме активације пута и/или унакрсне-комуникације, плаве представљају механизме унутрашње контроле, односно инхибиције).

Надаље се синтеза сексуалних стероидних хормона врши преко два метаболичка пута означена као $\delta 5'$ и $\delta 4'$ [31]. Унутар тзв. $\delta 5'$ пута, прегненолон постаје супстрат стероидне 17- α -хидроксилазе-17,20-десмолазе (енг. 17- α -hydroxylase-17,20-desmolase, CYP17A1) (E_{20}) за биосинтезу 17- α -хидроксипрегненолона (**26**). Исти ензим

катализује конверзију 17- α -хидроксипрегненолона у дехидроепиандростерон (енг. dehydroepiandrosterone, DHEA) (**27**).



Шема 1.7. Биосинтеза естрогених хормона са корацима конверзије холестерола до естрона, естрадиола и естриола. Црвеним стрелицама означен је $\delta 5'$ пут, плавим $\delta 4'$ пут. Природни производи: холестерол (**24**), прегненолон (енг. pregnolone) (**25**), 17- α -хидроксипрегненолон (енг. 17- α -hydroxypregnenolone) (**26**), дехидроепиандростерон (енг. dehydroepiandrosterone, DHEA) (**27**), андростенедиол (**28**), прогестерон (**29**), 17- α -хидроксипрогестерон (**30**), тестостерон (**31**), E_1 (**32**), E_2 (**33**), естриол (E_3) (**34**). Ензими: холестерол монооксигеназа (енг. cholesterol monooxygenase, CYP11A1) (E_{19}), стероидна 17- α -хидроксилаза-17,20-десмолаза (енг. 17- α -hydroxylase-17,20-desmolase, CYP17A1) (E_{20}), 17 β -хидроксистероид дехидрогеназа (енг. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17 β -HSD) (E_{21}), 3 β -хидроксистероид дехидрогеназа (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3-HSD) (E_{22}), ароматаза (E_{23}).

DHEA потом бива супстрат за каталитичку активност 17 β -хидроксистероид дехидрогеназе (енг. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17 β -HSD) (E_{21}) до биосинтезе андростенедиола (**28**), чиме се формално завршава $\delta 5'$ пут. Биосинтетски пут означен

Увод

као $\delta 4'$ иницира се биосинтезом прогестерона (**29**) из прегненолона, каталитичким деловањем ензима 3β -хидроксистероид дехидрогеназе (3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3-HSD) (**E22**). Прогестерон се затим оксидује до $17\text{-}\alpha$ -хидроксипрогестерона (**30**) каталитичким деловањем CYP17A1, чиме поменути ензим постаје заједнички за оба пута, да би затим $17\text{-}\alpha$ -хидроксипрогестерон био подвргнут још једној оксидацији катализованој од стране CYP17A1 зарад биосинтезе андростенедиона. Сврха биосинтезе андростенедиона јесте да буде супстрат за биосинзу тестостерона (**31**), каталитичким деловањем 17β -HSD, ензима укљученог у оба анаболичка тока. Андростенедион и тестостерон јесу директни прекурсор естрогених хормона. Каталитичким деловањем ароматазе (**E23**) (односно CYP19A1) се у гранулоцитима андростенедион редукује до **E1** (**32**), док се аналогни метаболички процес одвија и на нивоу тестостерона до биосинтезе **E2** (**33**). Наравно, редукијом **E1** каталитичким деловањем 17β -HSD настаје **E2**, док се оба хормона метаболишу у јетри до естриола (**E3**) (**34**).

Биосинтеза естрогених хормона у дојци

Биосинтеза **E2** утиче на иницирање и развој канцера дојке као најчешћег инванзивног канцера код жена, где је приближно 75–80% свих случајева ER α -позитивно (ER α (+)), односно посредовано повећаном експресијом ER α и физиолошком активношћу овог рецептора као транскрипционог фактора (видети текст даље) [13,14,22,23]. Поред ране дијагнозе, прогресије, предвиђања исхода болести и оптимизације одговарајуће стратегије лечења, контролисање карцинома дојке зависи и од нивоа експресије ER α , имајући у виду да абнормална експресија ER α јесте истакнути патолошки фенотип [13,14,22,23]. Сходно томе, повећана изложеност естрогену, рана менарха, касна менопауза и дуготрајна терапија замене хормона (односно излагање стероидним хормонима, како ендогеним тако и егзогеним), у корелацији су са повећаном инциденцом рака дојке [13,14,22,23]; супротно томе, рана менопауза и дојење који делују заштитно [32]. Стога су опсежни напори у лечењу рака дојке у целом свету и даље фокусирани на ER α као наизглед недостижну молекулску мету током фармацеутских истраживања у смислу развоја лекова, упркос томе што су једињења са фармакологијом „селективних модулатора естроген рецептора” (енг. “selective estrogen receptor modulators”, SERMs) односно фармакологијом „селективних редуктора концентрације естроген рецептора” (енг. “selective estrogen receptor down-regulators, SERDs), развијени као две водеће врсте лекова против рака дојке (видети

Докторска дисертација Незрине Куртановић

текст даље [13,14,22,23].

Рак дојке је хетерогена болест, а транскриптомија је идентификовала бројне молекуларне подтипове који су повезани са различитим клиничким исходима. Поред ER α , ћелије рака дојке такође могу да експримирају прогестерон рецептор (енг. progesterone receptor, PR) и/или изоформу 2 хуманог епидермалног рецептора фактора раста (енг. human epidermal growth factor receptor 2, HER2) [13,14,22,23]. Међутим, канцер дојке може бити праћен и одсуством експресије ових рецептора, односно да буде окарактерисан као троструко негативан. Најчешћи случајеви карцинома дојке су ER α (+) и/или PR(+) и могу се сврстати у две главне молекуларне класификације: луминални А, који је HER2(-) и има ниску експресију нуклеарног протеина Ki-67 (енг. nuclear protein Ki-67, pKi-67), антигена маркера пролиферације као прогностичног и предиктивног индикатора за извршавање биопсије код пацијената са канцером, односно луминални Б, који може бити или HER2(+) или HER2(-), али има високу експресију pKi-67 [13,14,22,23]. Троструко негативан/базални рак дојке је чешћи код млађих жена, посебно код оних са мутацијама гена протеина осетљивости на рак дојке типа 1 (енг. breast cancer type 1 susceptibility protein, BRCA1), док је не-луминални HER2-позитивни подтип, иако не толико чест, ER α (-) и PR(-) и има тенденцију раста брже од луминалних подтипова.

Како је већ назначено, E₂ се предоминантно биосинтетише у јајницима код пременопаузалних жена, а са мањим интензитетом у периферним ткивима попут масног ткива, јетре, мишића и дојке, нарочито током менопаузе [32]. Ипак, након менопаузе, периферна ткива постају предоминантна места биосинтезе E₂. Обзиром на појачану експресију ER α током етиологије канцера дојке, треба разумети и путеве биосинтезе E₂ унутар дојке пре настанка обољења. Тако, сâм агонист може бити биосинтетисан било од стране већ формираних ћелија рака дојке или од стране стромалног ткива дојке из циркулишућих прекурсора стероидног типа: адреналних андрогена попут дехидроепиандростерона и андростенедиона. Са друге стране, дехидроепиандростерон сулфат (енг. dehydroepiandrosterone sulphate, DHEA-S), главни циркулишући андроген, односно естрон сулфат (E₁-S), главни циркулишући естроген код жена у пост-менопаузи, могу се катаболисати до DHEA и E₁, респективно, каталитичким деловањем стероидне сулфатазе (енг. steroid sulfatase, STS) (Шема 1.8) [33]. Пут E₁-STS сматра се главним за биосинтезу E₂ код ER α (+) пацијената [34]. DHEA и андростенедиол метаболишу се помоћу 3 β -HSD до А-диона и тестостерона

Докторска дисертација Незрине Куртановић

ароматазе, ензима потребног за терминалну биосинтезу андрогених хормона у естрогене хормоне [35,36]. Ароматаза такође катаболише А-дион из коре надбубрежне жлезде до E_1 , који се каталитичком активношћу 17β -HSD редукује до E_2 [50,47,65,66]. Концентрација ароматазе може да варира у хетерогеним популацијама ћелија, уз допринос ароматазе у нормалној дојци који се повећава са развојем тумора [37], те се самим тим повећава и локална биорасположивост естрогена.

Утицај естрогених хормона на дојку током пубертета, менструалног и репродуктивног периода

Након биосинтезе, естрогени хормони секретују се из оваријума у крв и транспортују се до циљног места путем крвотока, где бивају везани за секс-хормон везујући глобулин (енг. sex hormone binding globulin, SHBG) [38]. Количина хормона у слободном облику у крви је знатно мања у односу на количину хормона који се налазе у везаном облику. Стероидни хормони у слободном облику могу путем пасивне дифузије да допру до ћелије и да се везује за интрацелуларне рецепторе.

E_2 има важну улогу током пубертета, трудноће и лактације у развоју и расту млечних жлезда. С годинама се повећава и интензитет деобе ћелија дојке хормонским деловањем E_2 , а самим тим и учесталост грешака у репликацији протеина чија је експресија стимулисана са $ER\alpha$ као транскрипционим фактором [32]. Због тога може настати канцер дојке као патофизиолошко стање услед повећане пролиферације ћелија дојке. Како је већ напоменуто, бенигне и малигне промене у дојци најчешће се формирају на нивоу TDLU унутар лобулуса (Слика 1.4) која се налази унутар лобуса [6,10,12]. Наиме, на рођењу и у детињству, у дојци постоје само рудементални млечни каналићи. Током пубертета, у дојци се развија дуктални систем и везивно ткиво. За дуктални систем карактеристично је да се издужује и грана те да се на самим крајевима формирају пупољци, на чијим крајевима настају и солидни пупољци будућих лобулуса (Слика 1.4) [7]. Секретија естрогена и прогестерона јавља се као циклична варијација у менструалном циклусу. У фазама циклуса се дешава дилатација млечних канала, стварања нових терминалних пупољака и увећавања постојећих [39]. У фази дилатације долази до промена, дојке постају гушће услед хидратације где се стварају лобулуси [40]. Дојку у gravidитету такође карактеришу лобулуси који се увећавају и умножавају у прва три месеца. Поред тога, у петом месецу се повећавају и ацинуси у лобулусима, где дојка постаје жлезда тј. жлездани орган [7,41]. Највећа секреторна активност дојке је у време лактације.

Увод

Утицај естрогених хормона на дојку у менопаузи

Дојка мења своју морфологију и структуру у фази пост-менопаузе у којој долази до трајне атрофије и појаве млитавости на нивоу лобулуса са ацинусима [42]. Током менопаузе употреба хормонске терапије доводи до пролиферације ћелија у лобуларним јединицама терминалних дуктуса, чинећи основу за настанак канцера. Лоша прогноза болести настаје са смањењем или потпуним изостанком експресије ER α , те на тај начин раст ћелије не може бити регулисан нити заустављен ендокрином терапијом. На овај начин долази до настанка агресивнијег фенотипа канцера [28].

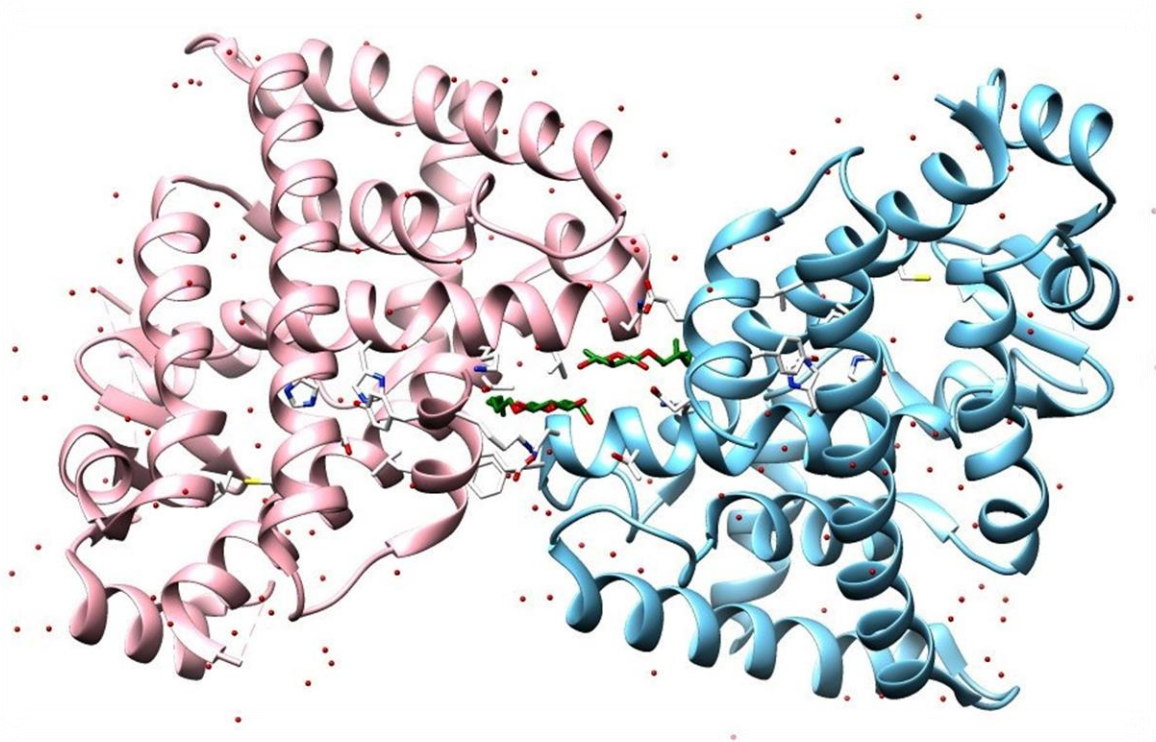
Физиолошка активност естрогених хормона на нивоу фамилије нуклеарних рецептора

Физиолошка активност естрогених хормона примарно подразумева улазак у циљне ћелије, интеракцију са цитосолним нуклеарним рецепторима и транслокацију хормон-рецептор комплекса у језгро, где се иницира експресија гена [15]. Поремећај у хомеостазу експресије гена иницираних естрогеним рецепторима узрокује низ целуларних догађаја који резултују развојем канцера [15]. На овај начин, интеракција E $_2$ са ER α доводи до развоја канцера дојке [15], на чему се и заснивају истраживања у оквиру ове докторске дисертације. Интеракција естрогених хормона са циљном ћелијом истовремено стимулише и експресију одговарајућих нуклеарних рецептора [15], о чему ће бити речи у даљем тексту.

Нуклеарни рецептори

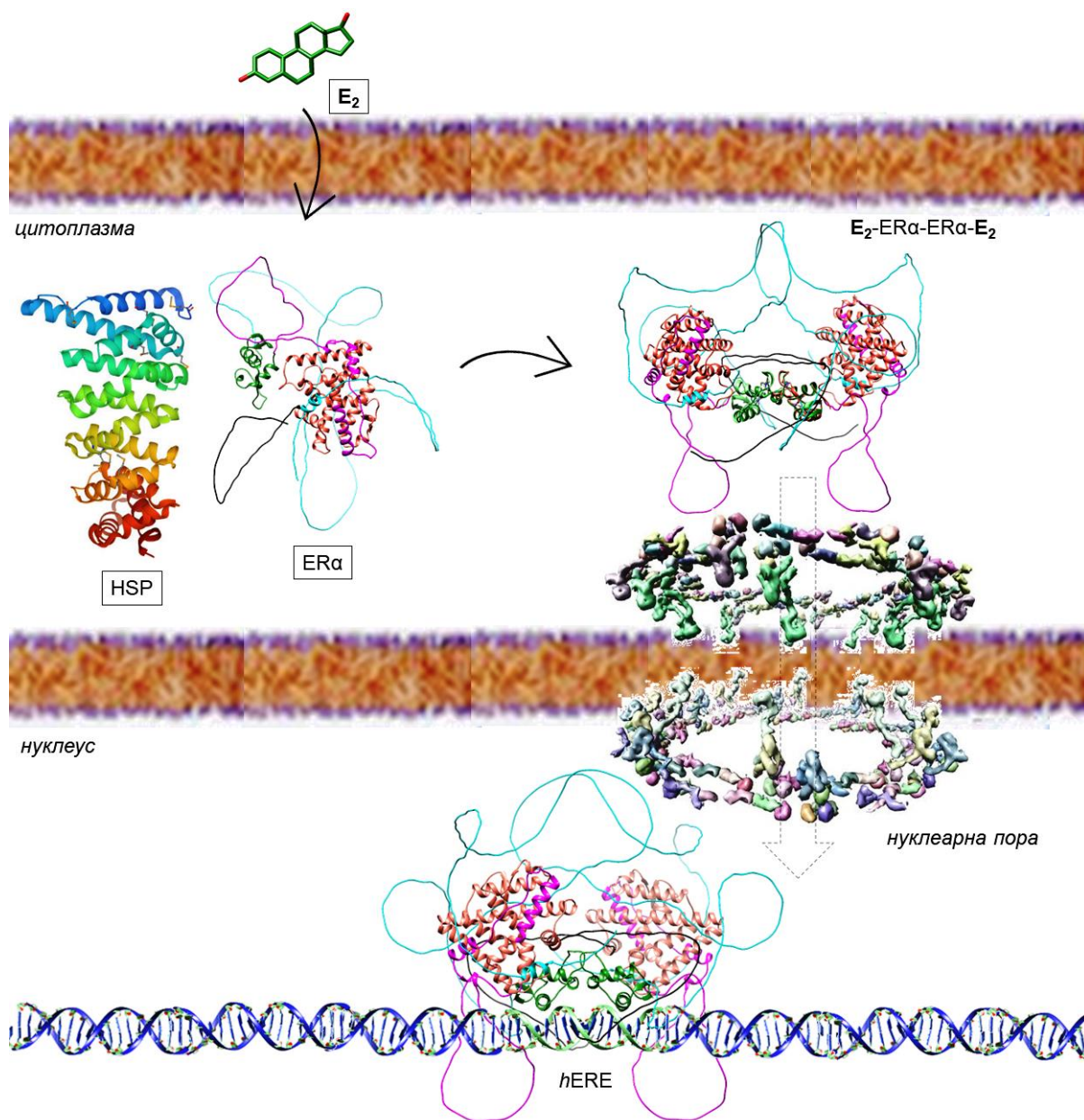
Структура и функција нуклеарних рецептора

NRs представљају супер-фамилију протеина (Слика 1.8) чија се експресија одвија у цитоплазми или језгру и чија се фармакологија иницира након интеракције са липосолубилним хормонима [13,21,43]. Нуклеарни рецептори лоцирани у цитосолу припадају типу I нуклеарних рецептора (NR I), док су они експримирани у језгру припадници NR II. У терцијарној структури, NR I и NR II су хомо- или хетеродимери (Слика 1.9) [44,45,46]. Постоје и протеини сврстани у класу NR III који представљају изоформе NR I, односно припадници класе NR IV са некарактеристичном особином да физиолошку активност остварују као мономери. Заједно, све класе формирају седам под-фамилија означених са NR0-NR6 (Слика 1.8).



Слика 1.9. Кристална структура хуманог PPAR- β/δ нуклеарног рецептора, припадника класе NR I, снимљена у резолуцији од 2,30 Å, као репрезентативног примера терцијарне структуре NRs [46].

Сходно својој локализацији, интеракција сваког од типова NR са одговарајућим лигандом има другачије импликације на последичне целуларне догађаје. За разлику од већине интерцелуларних сигналних молекула (одн. гласника, енгл. messengers), лиганди нуклеарних рецептора током миграције из екстрацелуларне течности у цитоплазму пролазе кроз плазма мембрану (када остварују интеракције са NR I) или кроз мембрану језгра (када остварују интеракције са NR II) несметано, те остварују директне интеракције са NRs (Слике 1.10 и 1.12) [47-58]. У случају активације NR I и NR III, хормон-NR I/NR III интеракција иницира каскаду целуларних догађаја који подразумевају дисоцијацију рецептора од протеина топлотног шока (енгл. heat shock proteins, HSP), конформационе промене на нивоу терцијарне структуре рецептора у смислу хомодимеризације истог, транслокацију (тј. активан транспорт) из цитоплазме кроз нуклеарну пору у плазма мембрани једра до ћелијског нуклеуса, коначно остваривање директних интеракције димера са специфичним секвенцама DNA које се називају елементи хормонског одговора (енгл. hormone response elements, HREs), те транскрипциони одговор (Слика 1.11) [47-58].



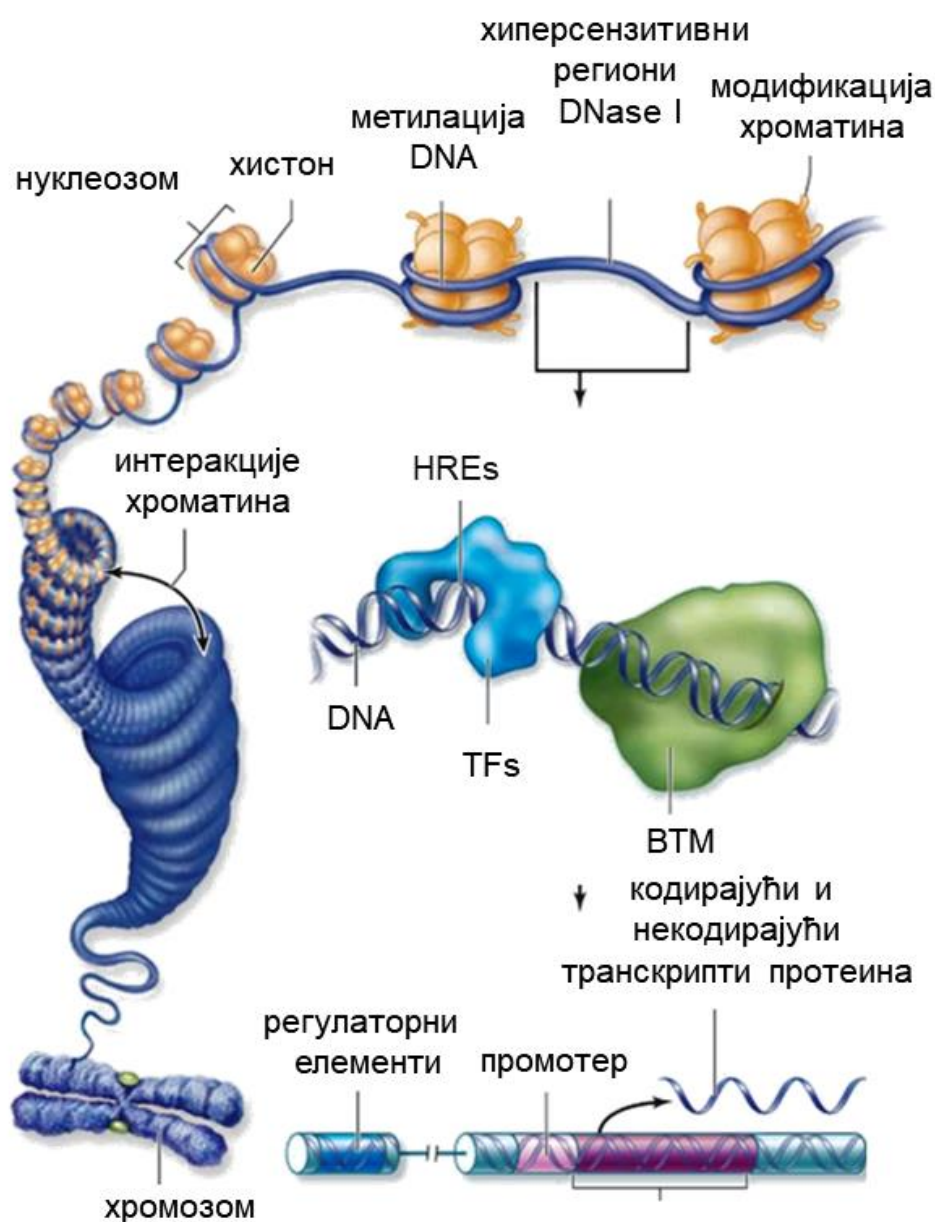
Слика 1.10. Фармакологија класе I и класе III нуклеарних рецептора. NR I и NR III су у одсуству лиганда локализовани у цитосолу.

Због иницирања транскрипционог одговора (односно директне интеракције са DNA), NRs се називају и транскрипционим факторима (енг. transcription factors, TFs) (Слика 1.11) [47-58]. NR I и NR III везују се за HREs чија је примарна структура сачињена од две полу-секвенце раздвојене сегментом DNA различите дужине, при чему друга полу-секвенца има примарну структуру инверзну у односу на прву. Оно што је карактеристика класе NR I јесте да остварују интеракције са инверзном полу-секвенцом, док NR III остварују интеракцију са директном секвенцом HRE уместо

Увод

инверзне [47-58]. ER α , као молекулска мета ове докторске дисертације, припадник је класе NR III и има класификациону ознаку NR3A1 (Слика 1.8Б) [47-58].

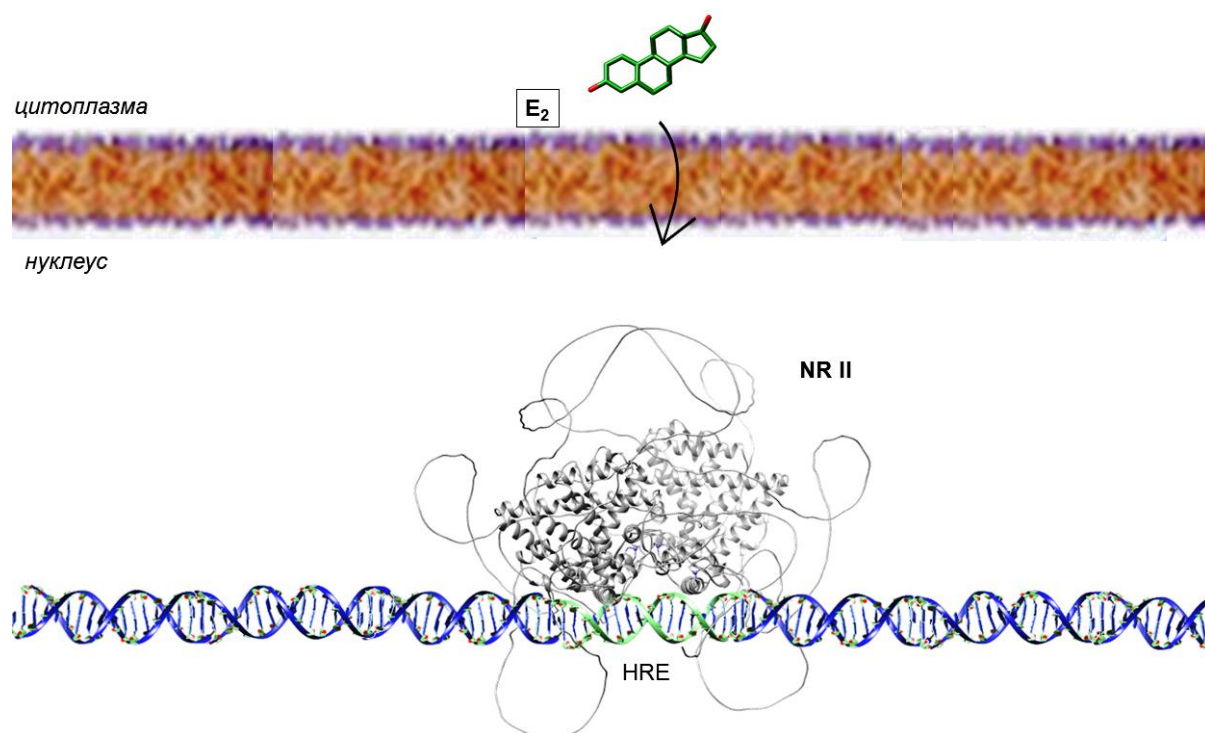
Као TFs, нуклеарни рецептори директно регулишу транскрипцију гена који контролишу, затим ћелијску пролиферацију, развој, метаболизам и репродукцију, чиме иницирају спектар обољења од карцинома до метаболичких болести [47-58]. Додатни протеини попут RNA полимеразе (eng. RNA polymerase, RNAP) и базалне транскрипционе машинерије (енг. basal transcription machinery, BTM) тада бивају регрутовани у процес транскрипције генског дела DNA до mRNA, што резултује транслацијом до протеина који мењају физиолошку улогу ћелије [47-58].



Слика 1.11. Интеракција NR I и NR III као транскрипционих фактора са HRE.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Протеини из класе NR II такође се понашају као TFs, са том разликом да су физиолошки активни без обзира на то да ли је дошло до интеракције са лигандом или не, јер су у нуклеусу као хетеродимери лоцирани у комплексу са HRE [47-58]. У одсуству лиганда, NR II су такође комплексирани и са протеинима ко-репресорима. Везивање лиганда за NR II доводи до дисоцијације NR II-ко-репресор комплекса и регрутовања протеина ко-активатора (мада је механизам регулације процеса ко-репресорима и ко-активаторима присутан и код NR II) и транскрипционе машинерије коју контролишу RNAPs. Нуклеарни рецептори типа IV могу да остваре интеракцију са HRE и као мономери и као димери, али само једна суб-јединица може да оствари интеракцију са једном половином HRE секвенце. За своју физиолошку улогу захтевају ендогени лиганд. Ипак, унутар NR IV постоји и посебна класа тзв. „рецептора сирочади” (енг. orphan receptors) који немају дефинисан ендогени лиганд. Један од начина регулације оваквих рецептора јесу пост-транслаторне модификације, мада се ови регулациони механизми одвијају и када дође до интеракције нуклеарног рецептора са ендогеним лигандом (видети даљи текст) [47-58].



Слика 1.12. Фармакологија класе II нуклеарних рецептора.

Увод

Интеракције NRs са HREs одвијају се захваљујући конзервираној топологији која подразумева постојање *N*-терминалног домена трансактивације, који се другачије назива и активациона функција 1 (енг. activation function 1, AF-1), затим *C* региона, односно DNA везујућег домена (енг. DNA binding domain, DBD), *D* региона или тзв. зглобног домена, *E* региона или лиганд везивног домена (енг. ligand binding domain, LBD), те *F* и *E* региона који заједно формирају AF-2 функцију, односно транскрипциону активациону функцију 2 унутар домена *C*-терминуса) [47-58].

Дужине секвенци *N*-терминалних региона NRs променљиве су и остварују своју физиолошку активност независно од интеракције LBD са лигандима. DBD се по правилу налази приближно у средини примарне структуре рецептора и често садржи и тзв. *C*-терминале екстензије (енг. C-terminal extensions, CTEs) [59] односно домене који имају за улогу да стабилизују протеин-DNA комплекс проширујући NRs-DNA интерфејс даље од оног предефинисаног да оствари интеракције са HREs. На DBD се наставља *D* регион, чија је примарна структура такође варијабилна и који служи као интерконектор са LBD. LBD, као активни центар за интеракцију лиганда унутар димера, представља примарну молекулску мету у топологији за развој лекова и домен за који се везују и ко-активатори [60]. Управо се на нивоу LBD врши хомо- или хетеродимеризација нуклеарних рецептора [61]. Такође, унутар LBD налази се и активациона функција 2 (енг. activation function 1, AF-2) за већину нуклеарних рецептора и чије промене у терцијарној структури доводе до интеракције транскрипционих активатора са HREs након активирања рецептора од стране лиганда. Лиганди нуклеарних рецептора по природи су липофилни и сходно томе остварују интеракцију са заштићеном хидрофобном шупљином дубоко унутар LBD домену, што доводи до алостерних промена су терцијарној структури на површини рецептора (одн. хомо- или хетеродимеризације) на кључним местима интеракције NR-HRE. Селективност нуклеарних рецептора за специфичне HRE углавном је условљена терцијаном структуром DBD, односно просторним позиционирањем α -хеликса након хомо- и хетеродимеризације у циљу остваривања интеракције са HRE [59,62] Терцијарна структура LBD обично садржи 12 α -хеликса (енг. α -helices, H) који су распоређени око централног хидрофобног цепа, од којих H3, H7 и H10 формирају хидрофобни цеп [63-65]. Најзначајнији је H12, повезан са AF-2, чије се индуковано прилагођавање одвија у односу на структуру лиганда [65].

Докторска дисертација Незрине Куртановић

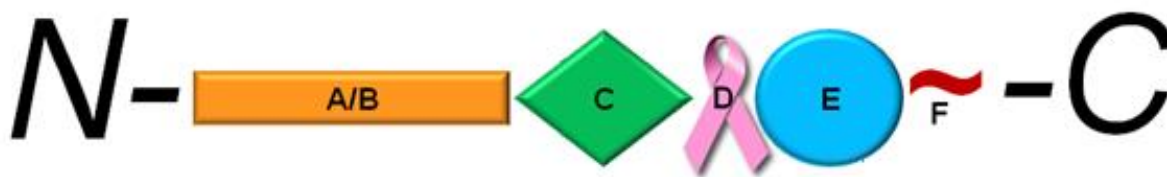
Структура и фармакологија естроген рецептора α

Разумевање фармакологије до сада развијених лекова против физиолошке активности ER α , а који се могу сврстати у под-класе парцијалних агониста, мешовитих агониста/антагониста, односно једињења са SERM фармакологијом, те потпуних и антагониста, односно једињења са SERD фармакологијом (видети текст даље), захтева изузетно познавање структуре и функције ER α [66-68]. Тополошки, а према извору UniProt базе података (<https://www.uniprot.org/>, идентификациони број P03372, <https://www.uniprot.org/uniprot/P03372>), примарна структура ER α (Слика 1.13) подељена је на следеће домене (Слика 1.14) [66-68]: *N*-терминус или *N*-терминални конститутивни домен (енг. *N*-terminal constitutive domain, NTD) заједно са AF-1, односно тзв. А/В регионом (аминокиселине 1-184), затим DBD, унутар кога се налазе С регион или DBD (аминокиселине 185-250) који остварује интеракције са *h*ERE, зглобни D регион (аминокиселине 251-355) са СТЕ секвенцом на положајима 251-288, LBD (тј. AF-2 или Е регион, аминокиселине 356-549) који је флексибилан да оствари интеракције са агонистима, парцијалним агонистима, мешовитим антагонистима и потпуним антагонистима, те *C*-терминус (енг. *C*-Terminal Constitutive Domain, CTD), односно F регион (аминокиселине 550-595).

10	20	30	40	50
MTMTLHTKAS	GMALLHQIQG	NELEPLNRPQ	LKIPLERPLG	EVYLDSSKPA
60	70	80	90	100
VYNYPEGAAY	EFNAAAAANA	QVYQGTLPLY	GPGSEAAAFG	SNGLGGFPPL
110	120	130	140	150
NSVSPSPLML	LHPPQLSPF	LQPHGQVPY	YLENEPSGYT	VREAGPPAFY
160	170	180	190	200
RPNSDNRRQG	GRERLASTND	KGSMAMESAK	ETRYCAVCND	YASGYHYGVW
210	220	230	240	250
SCEGCKAFFK	RSIQGHNDYM	CPATNQCTID	KNRRKSCQAC	RLRKCYEVGM
260	270	280	290	300
MKGGIRKDRR	GGRMLKHKRQ	RDDGEGRGEV	GSAGDMRAAN	LWPSPLMIKR
310	320	330	340	350
SKKNSLALSL	TADQMVSALL	DAEPPILYSE	YDPTRPFSEA	SMMGLLTNLA
360	370	380	390	400
DRELVHMINW	AKRVPGFVDL	TLHDQVHLL	CAWLEILMIG	LVWRSMEHPG
410	420	430	440	450
KLLFAPNLLL	DRNQGKVEG	MVEIFDMLLA	TSSRFRMMNL	QGEEFVCLKS
460	470	480	490	500
IILLNSGVYT	FLSSTLKSLE	EKDHIHRVLD	KITDTLIHLM	AKAGLTLQQQ
510	520	530	540	550
HQRLAQLLLI	LSHIRHMSNK	GMEHLYSMKC	KNVVPLYDLL	LEMLDAHRLH
560	570	580	590	
APTSRGGASV	EETDQSHLAT	AGSTSSHSLQ	KYYITGEAEG	FPATV

Слика 1.13. Примарна структура ER α (извор <https://www.uniprot.org/uniprot/P03372>).

Увод

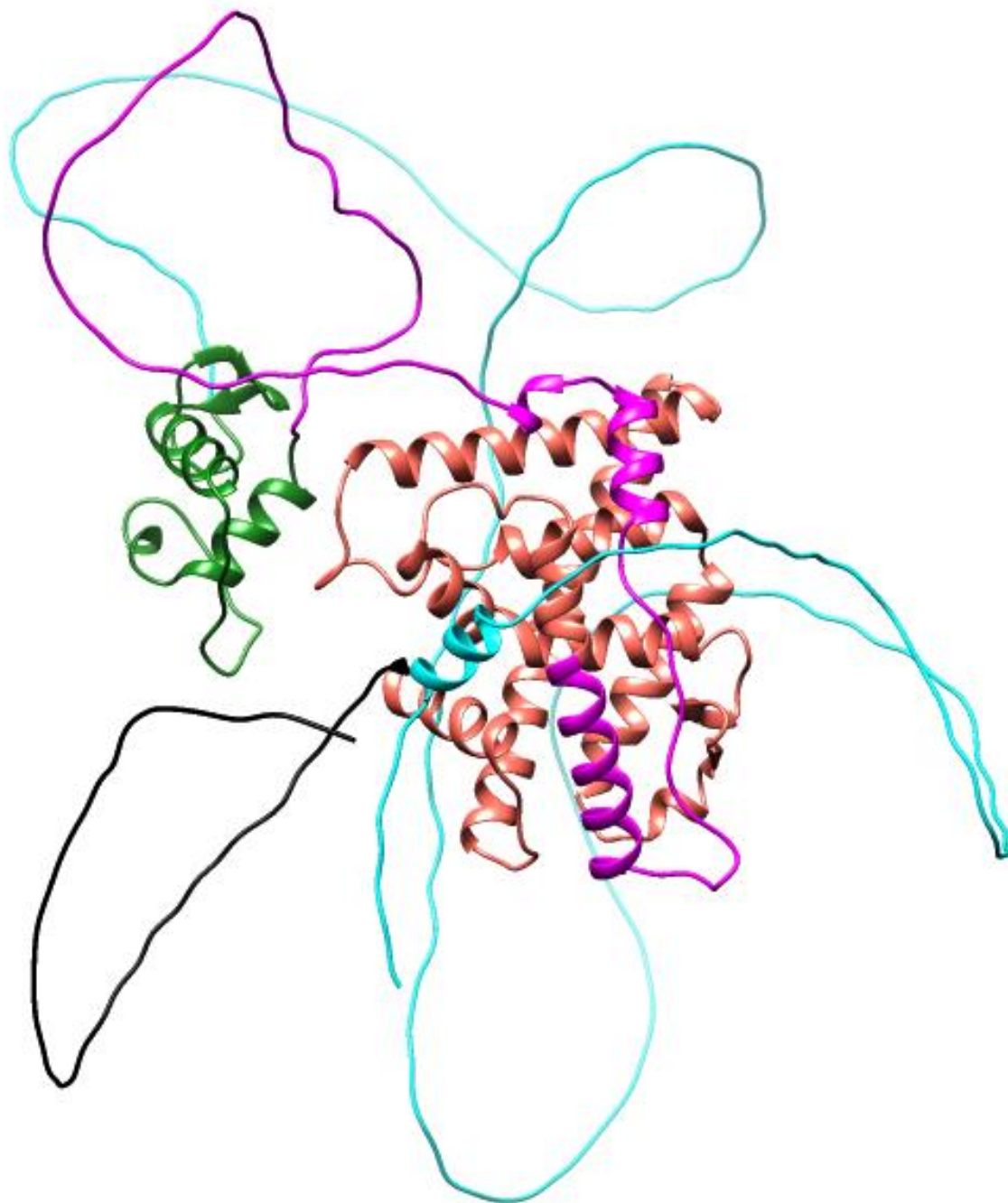


Слика 1.14. Топографија ER у виду A/B региона, односно N-терминалног домена трансактивације који се другачије назива и AF-1 функција, затим C региона, односно DNA везујућег домена (енг. DNA Binding Domain, DBD), D региона или тзв. зглобног домена, E региона или лиганд везивног домена (енг. Ligand Binding Domain, LBD); F региона са P-Box и D-Box DBD сегментима (F и E регион заједно формирају AF-2 функцију, односно транскрипциону активациону функцију 2 унутар домена C-терминуса).

Ипак, према изворима протеинске базе података (енг. Protein Data Bank (www.rcsb.org), још увек није депонована комплетна експериментална структура ER α , која би садржала све домене унутар топологије. У том смислу учињени су напори да се применом вештачке интелигенције (енг. artificial intelligence, AI), односно помоћу вештачких неуронских мрежа (енг. artificial neural networks, ANN) и алгоритама дубоког учења (енг. deep learning) имплементираних у софтверу AlphaFold [69,70] компаније Deep Mind (<https://www.deepmind.com/>), генерише комплетна тродимензионална структура мономера ER α депонована унутар AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P03372>), почев од примарне структуре рецептора депоноване унутар UniProt базе података са идентификационим бројем P03372 (<https://www.uniprot.org/uniprot/P03372>).

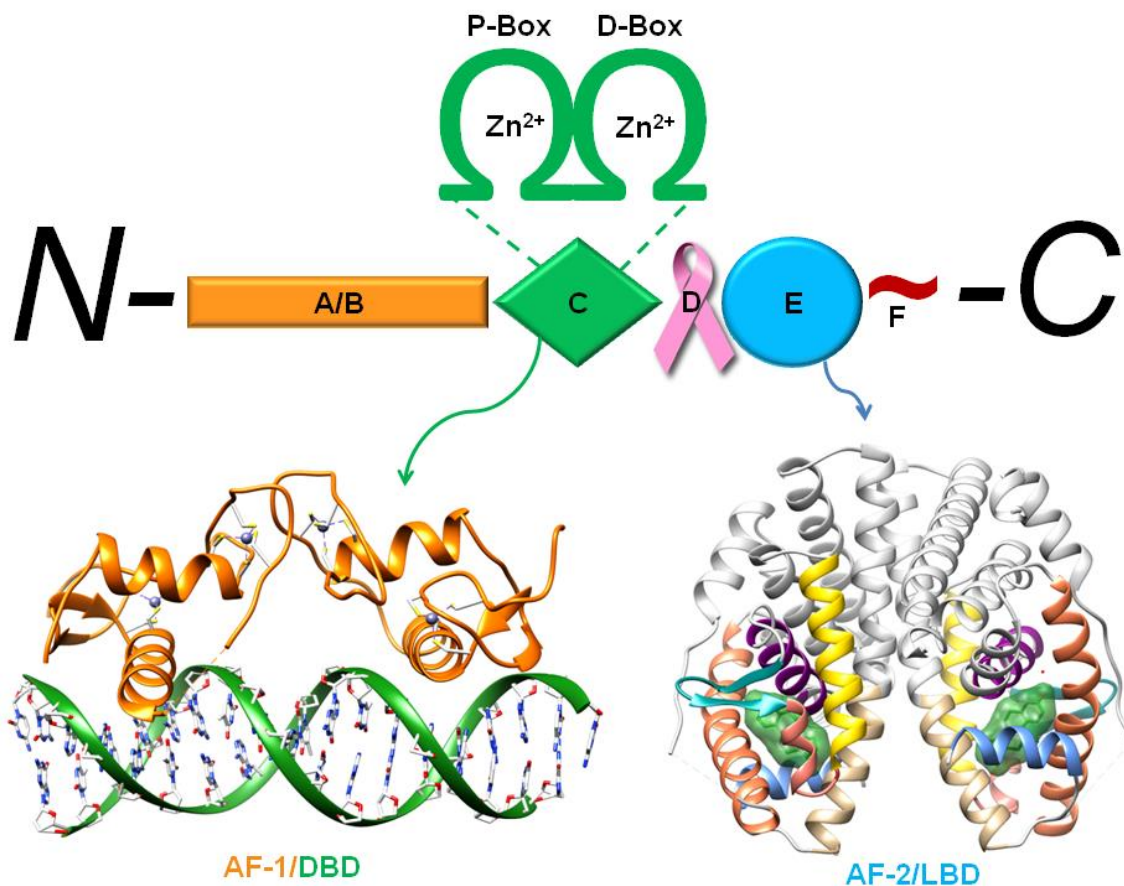
Међутим, доступне су кристалне структуре DBD, ко-кристализоване са специфичном хуманом секвенцом елемента естрогенског одговора (енг. *human* Estrogen Response Element, *hERE*) сачињеном од палиндромског хексануклеотида 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3' [66-68,71] као и LBD ко-кристализованог са E₂ као агонистом (Слика 1.15) [72]. Очекивано, интеракција агониста са рецептором доводи до хомодимеризације истог, те активирања *hERE* потпомогнутог специфичним ко-активаторима и иницирања транскрипционе машинерије (видети даљи текст) [24]. Такође, доступне су и кристалне структуре ER α у комплексу са различитим парцијалним агонистима и једињењима са SERMs и SERDs фармакологијом (Табеле 2.1-2.3 и Додатни материјали I, III и IV: Табела ДМ1) [72-94], које су допринеле свеобухватном разумевању фармакологије ER α [95] и биле основа израду ове докторске дисертације у смислу генерисања фармакодинамичких модела који су искоришћени за детаљну анализу LBD у комплексу са описаним лигандима те стицања

увида у фармакологију парцијалног агонизма али антагонизма транскрипције, било унутар тзв. директног геномског пута или индиректног геномског пута (енг. tethered), обзиром на чињеницу да оба пута започињу димеризацијом ER α (видети даљи текст) [66-68].



Слика 1.15. Терцијарна структура ER α генерисана помоћу софтвера AlphaFold [69,70]: AF-1 функција (аминокиселине 1-184) приказана је тиркизно плавом бојом, DBD (аминокиселине 185-250) приказан је зеленом бојом, D регион (аминокиселине 251-355) приказан је розе бојом, LBD (аминокиселине 356-549) приказан је пинк бојом, F регион (аминокиселине 550-595) приказан је црном бојом.

Увод



Слика 1.16. Општа топологија и топографија ER α . Горњи део слике приказује тополошки приказ структурних домена ER α у виду A/B региона, односно N-терминалног домена трансактивације који се другачије назива и AF-1 функција, затим C региона, односно DNA везујући домен (енг. DNA binding domain, DBD), D региона или тзв. зглобног домена, E региона или лиганд везивног домена (енг. ligand binding domain, LBD); F регион са P-Box и D-Box DBD сегментима (F и E регион заједно формирају AF-2 функцију, односно транскрипциону активациону функцију 2 унутар домена C-терминуса). Доњи део слике приказује кристалну структуру DBD и LBD домена ER α , респективно. У доњем левом делу представљена је кристална структура ER α DBD домена у комплексу са хуманим елементом естрогеног одговора (*hERE*) (PDB ID: **1HCQ**, у резолуцији од 2,4 Å [71]): ER α DBD домен је означен наранџастом бојом, док је *hERE* означен зеленом бојом. Доњи десни део слике приказује кристалну структуру ER α LBD домена E региона у комплексу са 17 β -естрадиолом (PDB ID: **1ERE**, у резолуцији од 3,1 Å [72]): α -хеликси унутар лиганд-везујућег домена приказани су различитим бојама, док су преостали ланци приказани у светло сивој боји; H3 хеликс (аминокиселине 332-354) представљен је коралном бојом, H6 хеликс (аминокиселине 383-394) обојен је љубичасто, H7 хеликс (аминокиселине 429-438) означен је жутом бојом, H11 хеликс (аминокиселине 517-528) представљен је светло браон бојом, H12 хеликс (аминокиселине 531-547) приказан је светло-плавом бојом, структура насумице увијања (аминокиселине 418-428) назначена је ружичасто-наранџастом бојом, антипаралелни β -набори S1 и S2 (аминокиселине 402-410) приказани су у светло плавој боји; 17 β -естрадиол је приказан зеленом бојом, прекривен прозирном зеленом сфером. Ради прегледности, атоми водоника су изостављени.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Структура и фармакологија А/В домена ER α

А/В домени позиционирани на *N*-терминусу деле свега 17% сличности у секвенци између ERs. Унутар ER α гена, ексон 1 енкодира А/В регион. Сâм AF-1 (аминокиселине 1-184) најваријабилнији је у секвенци и између изоформи ER α , при варијабилност резултује експресијом две изофоме ER α , ER α -36 и ER α -46, у чијим примарним структура А/В региона недостају аминокиселине 1-172 док Е регион ER α -46 садржи само аминокиселине 355-457 [68]. AF-1 представља лиганд-независну трансактивациону функцију која након пост-транслаторне модификације различитих остатака серина, са митоген-активираним протеин киназом (енг. mitogen-activated protein kinase, MAPK), гликоген синтазом киназом (енг. glycogen synthase kinase 3, GSK-3) или циклином А/циклин зависном киназом (енг. cyclin A/cyclin dependent kinase 2 [cdk2]), постаје медијатор сигнала за димеризацију рецептора и његову транслокацију до нуклеуса где остварује интеракцију било са *h*ERE (унутар директног геномског пута) или са протеином активатором 1 (енг. activation protein 1, AP-1) и/или протеином специфичности 1 (енг. specificity protein 1, Sp1) (унутар индиректног геномског пута) [66-68].

AF-1 регион ER α остварује своју физиолошку улогу независно од AF-2 али је ипак неефективан у модулацији транскрипције када се AF-2 не активира [97-100]. Стога је функција AF-1 зависна од структурног интегритета хормон-везивног домена, природе лиганда као агониста и целуларног контекста [97-100]. Функционална интеграција AF-1 и AF-2 неопходна је да би се испољила пуна физиолошка активност рецептора [101-103].

Упркос важности, биохемијске и структурне карактеристике које имплицирају механизам деловања AF-1 нису до детаља познате услед неконзистенције у топологији овог домена која доводи до формирања великог броја интер-конверзујућих конформација рецептора [104,105], односно до великог броја различитих конформација AF-1 чији је настанак контролисан алостерном кооперацијом између различитих домена, интеракцијом са различитим протеинима (рецимо са протеином који се везује за тзв. „ТАТА кутију”, видети даљи текст) и пост-транслаторним модификацијама (нарочито форфорилацијом на Ser118) [106].

Структура и фармакологија С домена ER α

Високо конзервирани (97%) централни С регион представља DNA-везивни

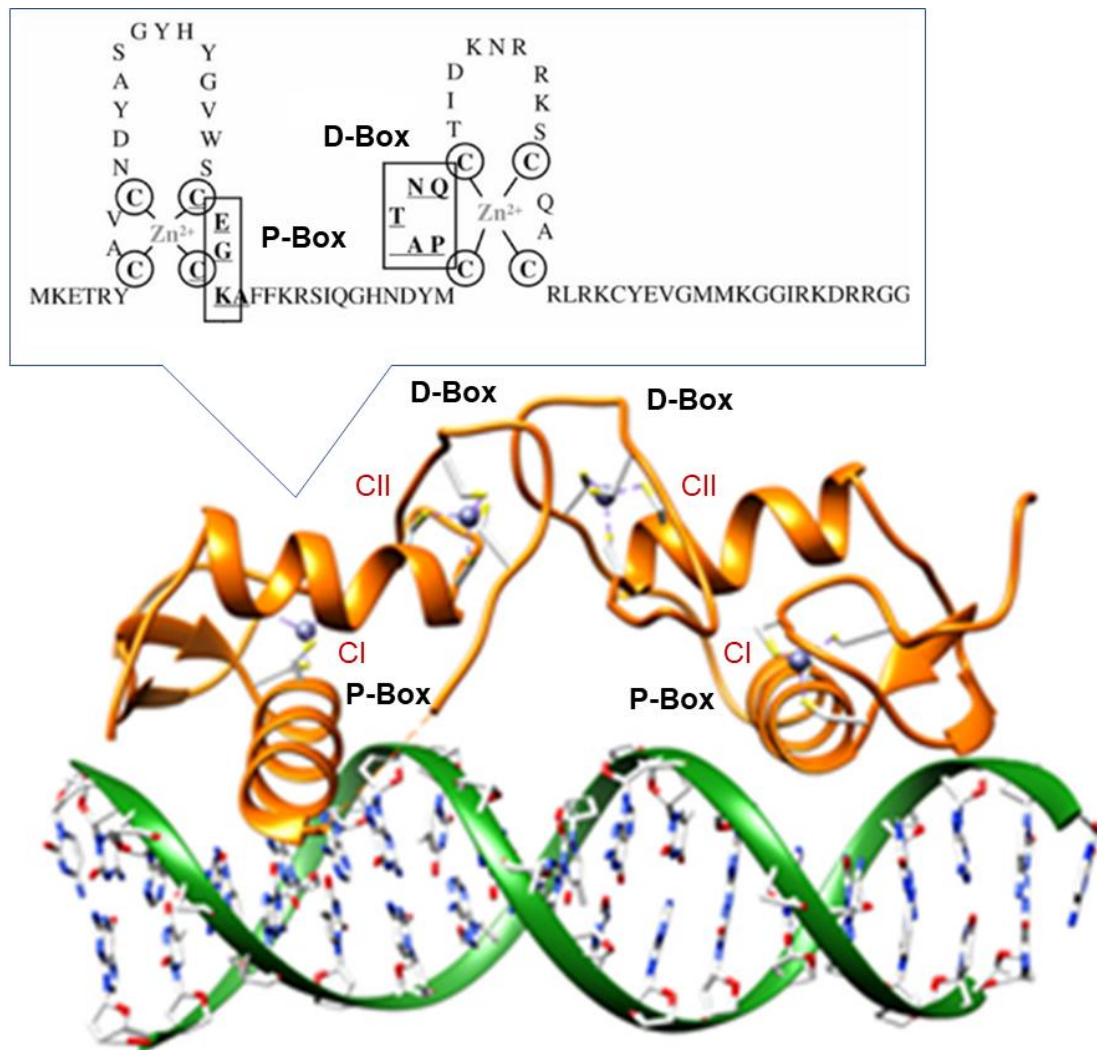
Увод

домен (енг. DNA-binding domain, DBD, аминокиселине 185-250), који се састоји од под-структура означених као CI и CII, односно тзв. два асиметрична Zn прста (енг. zink fingers) у којима метални јон остварује интеракције тетраедарском координацијом за сегментом од приближно 30 аминокиселина: у примарној структури CI и CII постоји по 8 остатака цистеина који формирају координативне везе са два јона Zn^{2+} . С регион, односно DBD, енкодиран је ексонима 2 и 3, односно интроном лоцираним између два прста [15]. Ексон 4 енкодира део С региона, целокупни D регион и део Е региона. Унутар CI под-регије налази се тзв. „Р кутија” (енг. „Р box”), односно сегмент насумице увијања који директно учествује у формирању интерфејса димеризације, односно у димеризацији са „Р кутијом” другог мономера, док је CII носилац α -хеликса који се означава као „D кутија” (енг. „D box”) и која остварује интеракције са *hERE* (Слика 1.16) [15]. Између CI и CII налази се H1 као елемент секундарне структуре који формира основу за специфичне интеракције $ER\alpha$ са главним завојем *hERE*. Са друге стране, H2 не остварује интеракције са *hERE* али је значајан за формирање терцијарне структуре DBD [15].

Централно позиционирани DBD $ER\alpha$ садржи два Zn-везивна мотива од којих сваки садржи по један α -хеликс који се биосинтетише унутар *N*-терминуса DBD након везивања јона цинка [71]. Два хеликса оријентисана су перпендикуларно један у односу на други и преклапају се негде на средини низа [71]. DBD остварују интеракције са остацима форсфорил група на оба краја великог завоја *hERE* [71]. Сваки DBD димера $ER\alpha$ остварује аналогне контакте са једним од обрнутих мотива, што резултује ротационо симетричном структуром [71]. Два мономера DBD остварују интеракције са суседним великим завојима са исте стране двоструке спирале *hERE*. Аминокиселине које се налазе у региону Р-кутије, Glu203, Gly204 и Ala207, кључне су за специфичност према *hERE* и за дискриминацију међу *hERE* секвенцама [97-100]. Аминокиселине унутар D-кутије, укључене су у дискриминацију полу-размака кроз протеин-протеин интеракцију два мономера $ER\alpha$ [97-100].

У каснијем делу текста биће детаљније представљено да $ER\alpha$ остварује интеракције са циљним сегментима DNA окруженим хроматинима путем два добро дефинисана пута: путем *hERE*-зависног односно *hERE*-независног пута. EREs представљају пермутације 5'-GGTCA_nnnTGACC-3' DNA палиндрома, где „n” представља неспецифични тринуклеотидни размак, лоциран на различитим растојањима од старта транскрипције и/или унутар локуса гена [107,108]. Регулација експресије гена интеракцијом E_2 - $ER\alpha$ комплекса са EREs позната је као $ER\alpha$ -зависни

сигнални пут [109]. Са друге стране, транскрипциона модулација циљних гена кроз интеракцију E2-ER α комплекса са транскрипционим факторима, најчешће са AP-1 или Sp1, везаним за њихове сродне регулаторне елементе на DNA, означава се као hERE-независни сигнални пут [110-113].



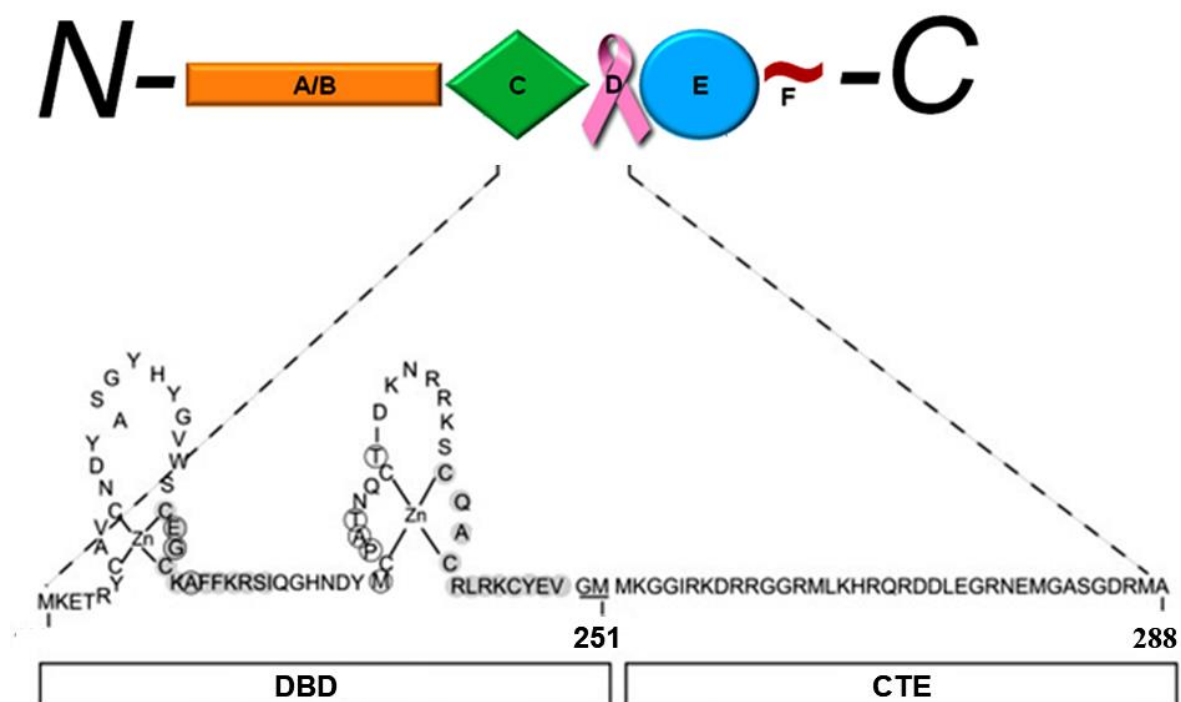
Слика 1.16. Топологија DBD.

Структура и фармакологија D домена ER α

Флексибилни зглобни, односно D домен (аминокиселине 251-355) садржи сигнал нуклеарне локализације (енг. nuclear localization signal, NLS) и повезује C домен са мултифункционалним C-терминусом (E доменом). D регион (Слика 1.17) [15]. Карактеристика D региона је да садржи СТЕ секвенцу која није конзервирана и заузима различите конформације у зависности од класе нуклеарног рецептора. СТЕ повећава афинитет везивања ER α за hERE остварујући интеракције са изоформама

Увод

HMGB-1 или HMGB-2 протеина велике мобилности (енг. high mobility group proteins, HMGB), чија је улога да олакшају интеракцију $ER\alpha$ са *hERE*. HMGB-1 и HMGB-2 показују велики афинитет ка нестандартном DNA ентитету какав је *hERE* [15]. Унутар конформације HMGB-1 и HMGB-2 такође постоје „Вох” DNA везујући домени који се везују за мали завој *hERE* и индукују дисторзије линеарног дуплекса, повећавају флексибилност *hERE* и олакшавају $ER\alpha$ -*hERE* асоцијацију [15]. Такође, HMGB-1/2 остварују интеракције са другим транскрипционим факторима, попут туморског протеина P53 (енг. tumor protein P53, p53), који утичу на развој канцера дојке [15].

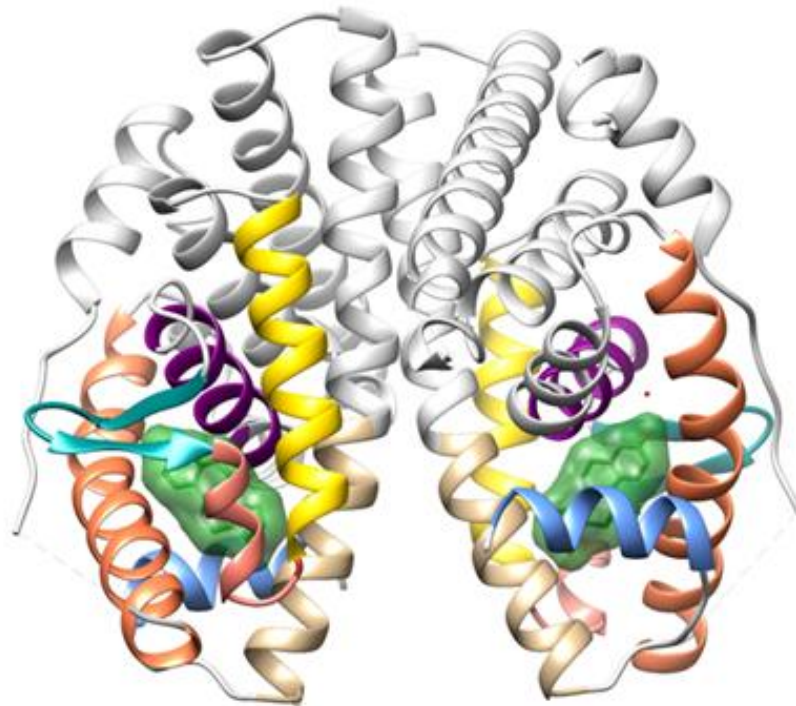


Слика 1.17. Повезаност топологија DBD и D домена.

Структура и фармакологија E домена $ER\alpha$

Лиганд везивни домен (LBD) (аминокиселине 356-549), односно E/F регион, фармаколошки представља лиганд-зависну AF-2 [16,114]. LBD $ER\alpha$ представља домен са глобуларном терцијарном структуром (Слика 1.18), који формира активни центар за остваривање интеракција са хормоном, парцијалним агонистима и антагонистима, затим интерфејс за хомодимеризацију, те алостерни центар за остваривање интеракција са ко-активаторима и ко-репресорима у виду лиганд-зависне ко-регулаторне функције интеракције AF-2 [15]. Терцијарна структура LBD у комплексу са E_2 заузима облик „трослојног сендвича” и проистиче из секундарне структуре са

топографијом сачињеном од 12 α -хеликса (Н1-Н12) и два β -набора са антипаралелном оријентацијом (S1 и S2): Н4, Н5, Н6, Н8 и Н9 налазе се са једне стране оивичени са Н1 и Н3, док се на другој страни налазе Н7, Н10 и Н11; хидрофобни џеп лиганда затворен са једне стране са S1 и S2 а са друге са Н12 [73].

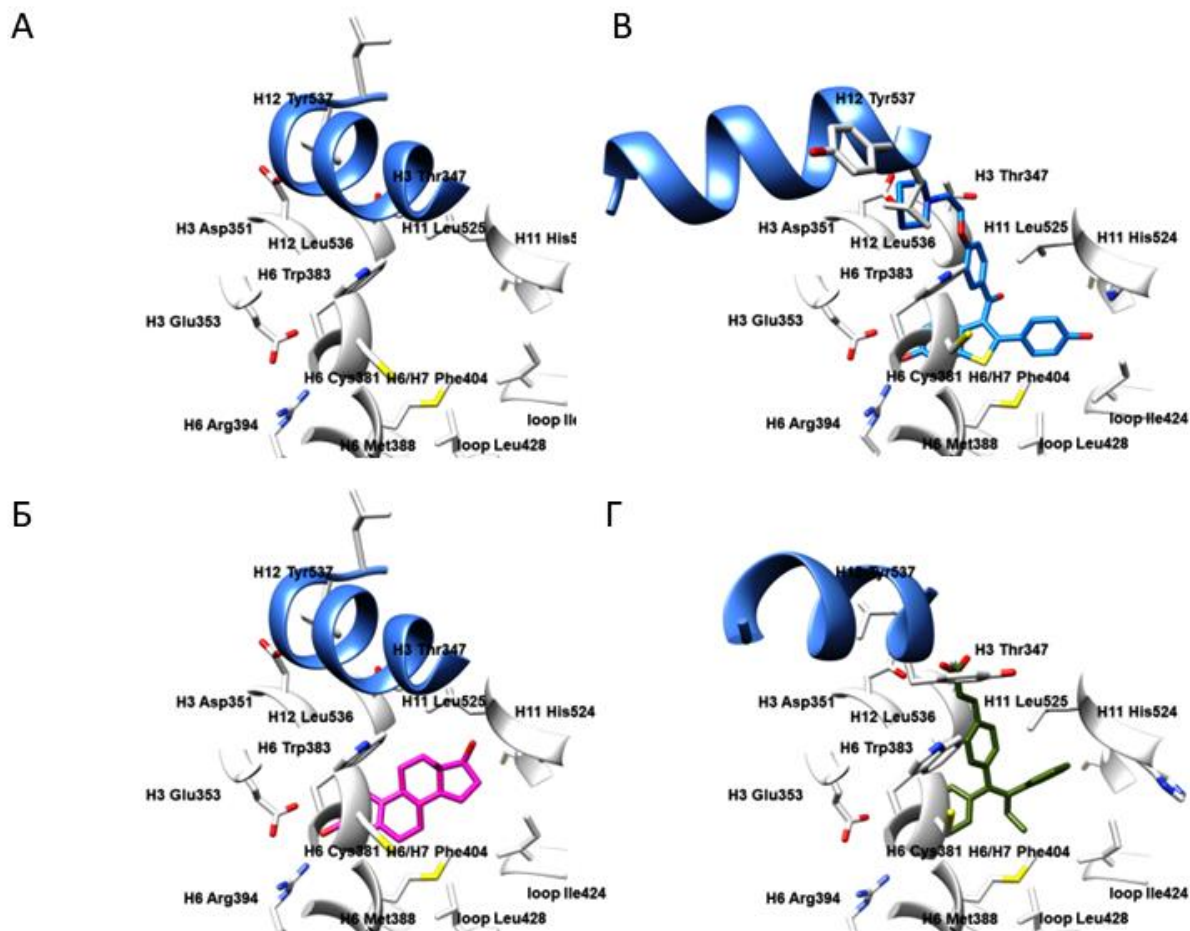


Слика 1.18. Кристална структура ER α LBD домена Е региона у комплексу са 17 β -естрадиолом (PDB ID: **1ERE**, у резолуцији од 3.1 Å): α -хеликси унутар лиганд-везујућег доменса приказани су различитим бојама, док су преостали ланци приказани у светло сивој боји; Н3 хеликс (аминокиселине 332-354) представљен је коралном бојом, Н6 хеликс (аминокиселине 383-394) обојен је љубичасто, Н7 хеликс (аминокиселине 429-438) означен је жутом бојом, Н11 хеликс (аминокиселине 517-528) представљен је светло браон бојом, Н12 хеликс (аминокиселине 531-547) приказан је светло-плавом бојом, структура насумице увијања (аминокиселине 418-428) назначена је ружичасто-наранџастом бојом, антипаралелни β -набори S1 и S2 (аминокиселине 402-410) приказани су у светло плавој боји; 17 β -естрадиол је приказан зеленом бојом, прекривен прозирном зеленом сфером. Ради прегледности, атоми водоника су изостављени.

Процесу рационалног дизајна нових лиганда модулатора фармакологије ER α претходи познавање структуре LBD. Међутим, како су резултати ове докторске дисертације директно проистекли из структуре активног центра, сама дискусија структуре истог биће кроз добијене резултате представљена у секцији **Резултати и дискусија**. За сада је потребно истаћи важност Н12 који се налази унутар AF-2 и мења своју конформацију сходно присуству агониста, парцијалног агониста, мешовитог антагониста или потпуног антагониста (Слика 1.19), те има одлучујући утицај на

Увод

фармакологију ER α [73-95].



Слика 1.19. Активни центар ER α LBD домена унутар апоензима (PDB ID: **4Q13**) [115] (A); у комплексу са 17 β -естрадиолом (PDB ID: **1ERE** [73], тј. са агонистом/парцијалним агонистом) (Б); у комплексу са ралоксифеном (PDB ID: **1ERR** [73], тј. са SERM антагонистом) (В); у комплексу са **GW568** (PDB ID: **1R5K** [74], тј. са SERD антагонистом) (Г). Приказани остаци припадају α -хеликсима Н3 (аминокиселине 332-354), Н6 (аминокиселине 383-394), Н7 (аминокиселине 429-438), Н11 (аминокиселине 517-528), Н12 (аминокиселине 531-547), затим структуре насумице увијања сачињеној од аминокиселина 418-428, односно структурама антипаралелних β -набораних конформација означених као S1 и S2 (аминокиселине 402-410). R-остаци аминокиселина су приказани у белој боји. Ради јасноће, само је Н12 хеликс представљен у плавој боји као кључни елемент секундарне структуре који мења своју конформацију након везивања агониста, односно једињења са SERM и SERD фармакологијом.

LBD ER α формира хомодимер након интеракције било са агонистом или антагонистом у симетричном „глава-ка-глави” аранжману (енг. “head-to-head” arrangement), где је сваки од протомера благо нагнут у односу на осу димера [15]. Димеризациони интерфејс подразумева аминокиселине из Н8-Н11, али су најважнији

Докторска дисертација Незрине Куртановић

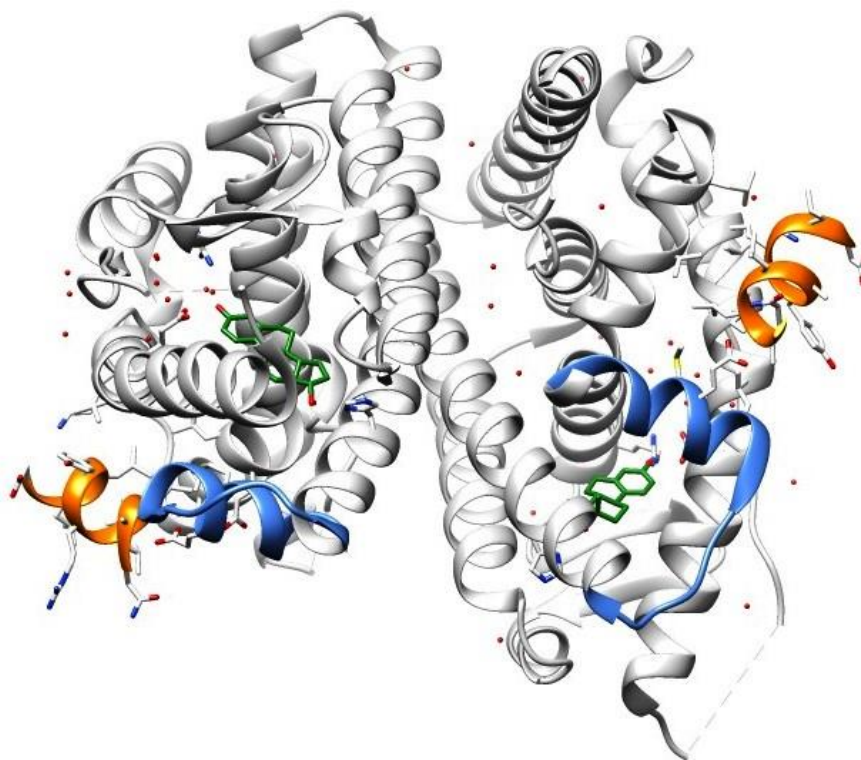
контакти остварени помоћу супротних Н10 и Н11, унутар хидрофобне зоне у којој остаци леуцина сваког од α -хеликса међусобно остварују хидрофобне интеракције, односно наелектрисане аминокиселине формирају водоничне везе са молекулима воде из медијума [15]. Обзиром на чињеницу да се и LBD делом формира од Н10 и Н11, постоје директне импликације интеракције лиганда са LBD на димеризацију.

Формирање димера есенцијално је за физиолошку активност ER α , обзиром на чињеницу да мутације које настају на нивоу димеризације узрокују да рецептор постане транскрипционо неактиван [116]. Према DBD сваког од мономера такође доприноси димеризацији ER α , преобладајући интерфејс димеризације јесте формиран од стране хеликса Н11 сваког од ER α -LBD мономера [73,117]. LBD остварује интеракције помоћу конзервираног хидрофобног региона са *N*-терминуса, праћено додатним интеракцијама димера које остварују аминокиселине унутар Н8 и завоја између Н9 и Н10 [73,117]. Препознавање лиганда остварује се водоничним везама и комплементарношћу хидрофобних остатака [73,117]. Интеракција E₂ са LBD позиционира динамично мобилни Н12 преко везивног простора перпендикуларно у односу на интерфејс димеризације и Н3, Н5/Н6 односно Н11, формирајући неку врсту поклопца преко просторне шупљине коју окупира хормон [73,117]. Овакво позиционирање Н12 предуслов је за транскрипциону активацију јер се њиме генерише компетентна лиганд-зависна AF-2 способна за интеракцију са ко-активаторима [73,117]. У оваквој конформацији E₂-LBD може прихватити кратки хеликоидни сегмент, тзв. LXXLL мотив, из различитих протеина ко-активатора [85,118].

Интеракција лиганда са LBD узрокује његове конформационе промене, што доводи до формирања специфичног алостерног центра који се назива „NR кутија” (енг. „NR-box”) и који остварује додатне интеракције са ко-активаторима и ко-репресорима (Слика 1.20) [73]. Овај алостерни центар формира се од стране аминокиселина из Н3, Н4, Н5 и Н12, односно завоја између Н3 и Н4. Структурни мотив LXXLL унутар кофактора служи као хидрофобни сегмент којим ко-активатор или ко-репресор остварује интеракције са LBD. Описане конформационе промене унутар AF-2 након интеракције са парцијалним агонистима и антагонистима утичу да „псеудо NR сегмент” (енг. „NR box-like sequence NR-box”) унутар Н12, у виду LXXML, савршено имитира интеракције LXXLL унутар „NR кутије”. Детаљније импликације интеракција агониста, парцијалних агониста, мешовитих антагониста или потпуних антагониста

Увод

[73-95] на индуковано прилагођавање H12 и фармакологију „псеудо NR сегмента” биће изложене током дискусије резултата ове докторске дисертације.



Слика 1.20. Кристална структура E_2 -ER α LBD домена у комплексу са ко-активатором (PDB ID: **1GWR**, у резолуцији од 2,40 Å [75]): E_2 је приказан зеленом бојом, H12 плавом бојом, ко-активатори наранџастом бојом, молекули воде црвеном бојом. Ради прегледности, атоми водоника су изостављени.

Структура и фармакологија F домена ER α

На LBD се директно надовезује F домен као нефункционални продужетак LBD/AF-2 (аминокиселине 550-595) [15]. О његовој физиолошкој улози се мало зна [15]. Предпоставља се да представља еволутивни реликт јер код прогестерон рецептора овај домен има изразиту улогу у димеризацији, док се код ER α димеризација одвија на нивоу LBD [68,96]. F домен вероватно модулира транскрипциону активност, утиче на интеракцију са ко-активаторима, димеризацију и стабилност рецептора [68,96].

Путеви биосинтезе канцера дојке

Као кључни фактори у развоју карцинома дојке, повећана биосинтеза и хормонална активност E_2 иницирају серију молекуларних процеса повезаних са ER α , углавном регулисаних факторима транскрипције [66-68]. Бројни фактори, попут

Докторска дисертација Незрине Куртановић

концентрације ER α односно типа комплементарних протеина који су потребни за медијацију физиолошке улоге ER α у ћелији, утичу на манифестацију целуларних промена након хормонског деловања E $_2$ [15]. Ипак, експресија ER α на различитим локацијама у ћелијама имплицира да испољавање хормонског ефекта E $_2$ у целуларним фенотипима подразумева динамички интегрисане фино подешене ER α -посредоване каскаде [15]. С тим у вези, тзв. „екстра-нуклеарна” (енг. “extra-nuclear”) или „мембрански-иницирана” (енг. “membrane-initiated”) E $_2$ сигнализација не само да посредује у јако брзим (од неколико секунди до неколико минута) ефектима ER α , независним од транскрипције (енг. transcription-independent effects of ER α), већ такође пост-транслаторно модулира физиолошку активност нуклеарних ER α , транскрипционих фактора, ко-регулаторних протеина и комплекса хроматина [15].

Експозиција ћелија циљних ткива естрадиолу, попут хипофизе, материце, јајника, васкуларног епитела, костију и дојке, утиче на активацију многих киназа кроз целу плазма мембрану [15]. У „мембрански иницираној” сигнализацији, ER α засићен са E $_2$ остварује интеракцију са системом G протеин-везаног рецептора естрогена (енг. G30 protein-coupled estrogen receptor, GPR30), припадника фамилије 1 G-протеин-везаних рецептора (енг. G-protein-coupled receptor 1 family), локализованог на мембрани ендоплазматичног ретикулума, што резултује активирањем киназа које врше форсфорилацију супстрата попут мембранских јонских канала и секундарних сигналних система, након чега долази до брзог ћелијског одговора [15]. Активиране киназе такође врше форсфорилацију протеинских компоненти унутар пута нуклеарне сигнализације инициране са E $_2$, попут самих ERs, затим ко-регулаторних протеина, осталих TFs укључених у сигнализацију и протеина хроматина, што резултује променама у експресији респонзивних гена [15].

Претходно је наговештено да су пре интеракције са E $_2$ и формирања E $_2$ -ER α комплекса, макромолекули ER α дислоцирани и динамички партиционисани између циљних места унутар хроматина и нуклеарног матрикса [119,120] (Слика 1.10). Формирање E $_2$ -ER α комплекса стимулише димеризацију ER α [16] и транслокацију димера у једро до интеракције са циљаним промотерима. Иако механизам којим се рецептор транслоцира у језгро остаје нејасан, импорт ER α у језгро контролише се помоћу мултимерне машинерије протеина чаперона (енг. multimeric chaperone machinery). Тако, димеризација ER α бива иницирана палмитоизацијом аминокиселине Cys447 унутар LBD, катализованом од стране протеина температурног шока 27 (енг.

Увод

heat shock protein 27, SHP27), што има за последицу интеракцију ER α са кавеолином-1 (енг. caveolin-1), транспортером ER α до кавеола унутар мембране [121-128]. Палмитоисани ER α бива транслоциран до мембране као мономер где се одвија димеризација ER α након излагања рецептора естрадиолу. NLS под-домен који се налази у D региону ER α потребан је за транслокацију ER α у језгро. Чини се да интеракција коју остварује NLS под-домен са импоринима и молекуларним моторним протеинима повезаним са микротубулама посредује у транспорту до језгра [121-128]. Унутар LBD постоји секвенца богата леуцином са сврхом нуклеарног експорта (енг. leucine-rich nuclear export sequence, NES) [121-128] која остварује интеракције са експортином и модулира нуклео-цитоплазматски шатл ER α [121-128].

Димеризација рецептора даље има за последицу активирање G α и G $\beta\gamma$ протеина [129-130] што је заправо предуслов за брзи одговор на E $_2$ сигнализацију. Током нуклеарне сигнализације, ER посредује хормоналну активност E $_2$ кроз hERE-зависне and hERE-независне путеве [15]. Тако, hERE-зависни сигнални пут подразумева интеракцију E $_2$ -ER комплекса са hERE секвенцама унутар DNA и последичну регулацију експресије гена [15]. Са друге стране, hERE-независни сигнални пут обухвата директну или индиректну модулацију експресије респонзивних гена помоћу ко-регулаторних протеина (енг. co-regulatory proteins, CRs), те интеракцију E $_2$ -ER комплекса са TFs који остварују интеракције са њиховим сродним респонзивним елементима унутар DNA [15].

Укратко, активација ER α хормонским деловањем E $_2$ изазива димеризацију E $_2$ -ER α комплекса и последично директно везивање DBD-а било за hERE или AP-1/Sp-1 елементе одговора као промотере, након чега се биосинтеза протеина одвија било тзв. геномским директним или геномским индиректним путем, респективно [15]. Оба процеса позитивно су регулисана интеракцијом новоформираног E $_2$ -ER α /hERE или AP-1/Sp-1 комплекса са специфичним активаторима и коактиваторима и резултују регрутовањем RNAP II и последично TBM, те развојем рака дојке регулисаног помоћу TBM [131-133]. Међутим, како експресија гена не може бити у потпуности контролисана *in vivo* помоћу специфичних репресора и ко-репресора који се везују за hERE или AP-1, повећава се учесталост развоја рака дојке услед активирања везивања ER α интеракцијом са E $_2$ [15].

Докторска дисертација Незрине Куртановић

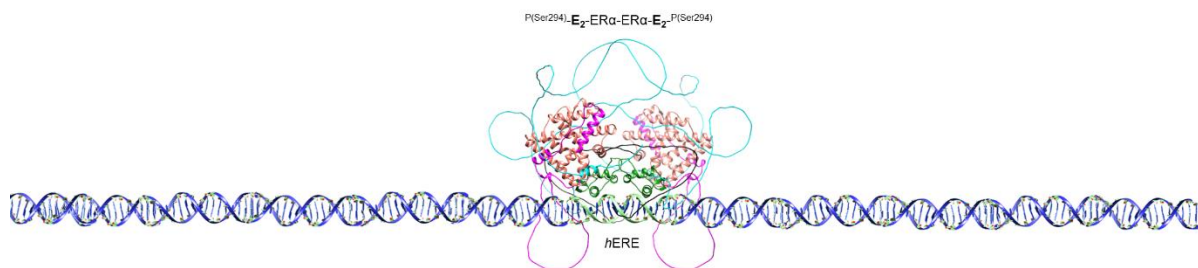
Треба напоменути да и нелигандирани ER α остварују интеракције са различитим hERE секвенцама [134,135], циклично, у кратким периодима који захтевају и активирање и потискивање епигенетских процеса [136-138]. Нелигандирани ER α кроз AF-1 и AF-2, респективно, остварују интеракције са хетерогеним комплексима ко-регулатора [119] тј. епигенетским метама попут хистон ацетил трансферазе (енг. histone acetyl transferase, НАТ), хистон метил трансферазе (енг. histone methyl transferase, НМТ), или другим АТФ-зависним протеинима ремоделирања хистона [136-138]. Ко-регулатори из описаних фамилија ступају у интеракцију са ER α у процесу стимулисаном са E₂; међутим, у одсуству хормона не долази до регрутовања RNAP II и транскрипције. Даље промене протеина, које обухватају убикитинацију ER α и одговарајућих ко-регулатора, деградирају транскрипциони комплекс [136-138], што је праћено и ремоделирањем промотера кроз интеракције протеина модификатора са базалним транскрипционим факторима. Овакво осцилирајуће реструктурирање промотера обезбеђује механизам којим се транскрипција брзо адаптира на сигнал E₂ [136-138].

Геномски директни пут

Класични (тј. геномски директни) пут иницира се након остваривања интеракције E₂ са LBD и пост-транслаторне модификације E₂-ER α комплекса у виду фосфорилације Ser294 из D региона, катализоване помоћу p38 митоген-активирани протеин киназе (енг. p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK). Фосфорилацијом, Ser294 постаје регулатор митогенезе карцинома, карциногенезе и метастаза [15]. D регион даље посредује у димеризацији (активацији) ^{P(Ser294)}-E₂-ER α која се јавља као последица интеракција између две „D кутије” [66-68]. Након тога, унутар hERE-зависног сигналног пута, настанак ^{P(Ser294)}-E₂-ER α -ER α -E₂-^{P(Ser294)} димера сигнал је групи високо покретљивих протеина (енг. high mobility group proteins, HMG), попут оних из групе 1 (HMG1) и групе 2 (HMG2), да изврше иницијално ремоделирање DNA и развију (оголе) 5'-GGTCAnnnTGACC-3' DNA палиндромску секвенцу, односно консензусну hERE, да би потом ^{P(Ser294)}-E₂-ER α -ER α -E₂-^{P(Ser294)} активирао hERE посредством DBD (Слика 1.21) [15]. У конкретној агрегацији, „P кутија” остварује интеракције са AGGTCA (AnnnTGA) секвенцом, док CII прст препознаје преосталу половину hERE секвенце [66-68].

Увод

Аминокиселине Glu203, Gly204, Ala207 Lys210 и Arg211 из „Р кутије” DBD ER α специфичне су према интеракцији са DNA и кључне су за дискриминацију према *hERE* [139,140]. Поменуте аминокиселине формирају мрежу протеин-*hERE* водоничних веза која утиче на афинитет ER α према *hERE* [141]. Унутар „Р кутије” нарочито је важна конзервирана аминокиселина Arg211 јер Arg211Glu мутацијом ER α стимулише транскрипцију интеракцијом не са *hERE* већ са секвенцом која се означава са *hTRE*, унутар тзв. геномског индиректног пута (о чему ће бити речи касније) [141], што сугерише да се геномски одговори са *hTRE* сигналног пута могу одвојити од индукције фенотипских промена, односно да је *hERE* сигнални пут неопходан да E₂-ER α изазове ћелијске одговоре, те се он примарно и одвија [141].

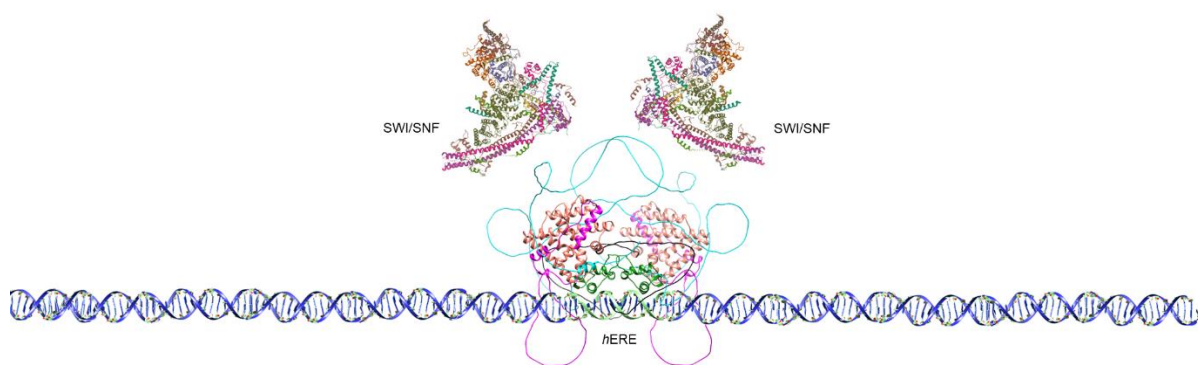


Слика 1.21. Иницирање геномског директног пута интеракцијом $P(\text{Ser}^{294})\text{-E}_2\text{-ER}\alpha\text{-ER}\alpha\text{-E}_2\text{-P}(\text{Ser}^{294})$ димера са *hERE*.

Гени који се активирају хормоналним деловањем E₂, међутим, садрже једну или више копија *hERE* које одступају од консензуса за један или више нуклеотида [142]. Иако су копије *hERE* секвенце такође целуларни одговор на хормоналну активност E₂ посредством ER α , оне су мање ефикасни регулатори транскрипције него консензусна *hERE* [142]. Афинитет ER α према *hERE* потиче из способности индукованог прилагођавања DBD у односу на *hERE* [142]; само једна промена нуклеотида унутар консензусне *hERE* захтева формирање нових интермолекулских водоничних веза између DBD и *hERE*, што има за последицу енергетски мање повољне додатне конформационе промене унутар DBD [143].

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Надаље, активацију транскрипције регулише ансамбл међусобно повезаних мултидоменских транскрипционих фактора. Интеракција транскрипционих фактора са $P^{(Ser294)}-E_2-ER\alpha-ER\alpha-E_2-P^{(Ser294)}$ одвија се на нивоу AF-1 и AF-2, који регрутују ко-регулаторне, односно протеине критичне за функционалну интеграцију AF-1 и AF-2 не би ли се транскрипција одвијала у пуном капацитету као одговор на хормоналну активност E_2 [144]. Ко-регулатори су транскрипциони фактори који олакшавају или инхибирају транскрипцију циљног гена у $mRNA$. Ко-активатори су експлицитно дефинисани као фактори који су потребни за функцију $ER\alpha$, али не и за базалну транскрипцију *per se*, јер не испољавају афинитет према везивању за $hERE$ [144]. Функција ко-регулатора је ремоделирање хроматина, односно његово даље развијање на месту транскрипције како би се олакшала регулација транскрипције интеракцијама са додатним ко-регулаторима. Другим речима, ко-регулатори надаље остварују интеракцију са нуклеарним рецептором и тако утичу на ћелијске механизме сигналне трансдукције директно или индиректно [144]. Тако је интеракција $P^{(Ser294)}-E_2-ER\alpha-ER\alpha-E_2-P^{(Ser294)}$ димера са $hERE$ праћена регрутовањем АТФ-зависног прекидач-сахароза неферментирајућег комплекса ремоделирања хроматина (енг. SWItch/Sucrose Non-Fermentable chromatin remodeling complex, SWI/SNF) као првог ко-регулатора и то на нивоу AF-1 (Слика 1.22), са циљем стабилизације ремоделираног хроматина око $hERE$ након иницијалног ремоделирања са HMG1 и HMG2 [15].

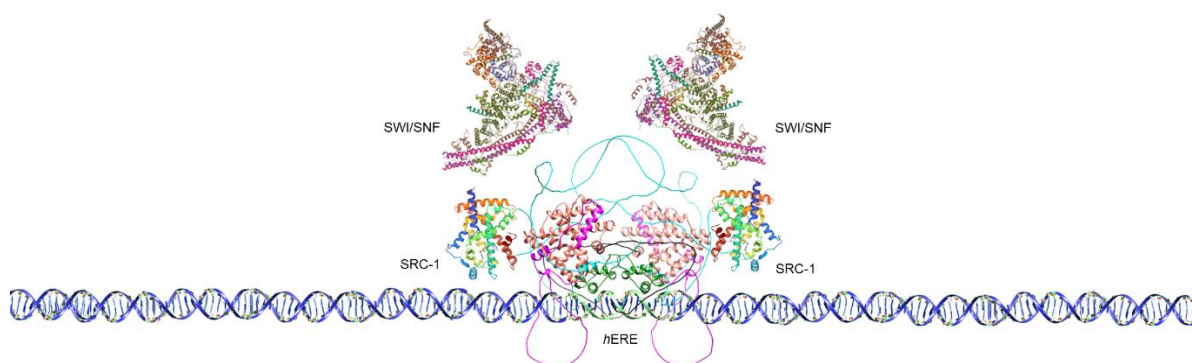


Слика 1.22. Регрутовање SWI/SNF унутар геномског директног пута.

Серију целуларних догађаја даље процесуира AF-2 домен $ER\alpha$ који регрутује ко-активаторе из породице HATs и ко-репресоре из породице HMTs, тим редоследом,

Увод

не би ли се додатно ремоделирали хистони зарад регулације транскрипције, односно не би ли се извршила додатна контрола самог процеса [15]. AF-2 домен остварује интеракције са ампифатским α -хеликсом ко-активатора унутар кога се налази LXXLL секвенца као део тзв. домена интеракције са нуклеарним рецептором (енг. nuclear receptor interacting domains, NRIDs). NRIDs јесу домени за унос сигнала специфични према НАТ ко-активаторима из породице ко-активатора стероидних рецептора (енг. steroid receptor coactivator family, p160/SRC) [15,145]. Тако селективност NRIDs условљава иницијално регрутовање ко-активатора 1 стероидног рецептора (енг. steroid receptor coactivator-1, SRC-1) из породице p160 ко-активатора, којим се започиње транскрипција канцера дојке (Слика 1.23) [15,145].

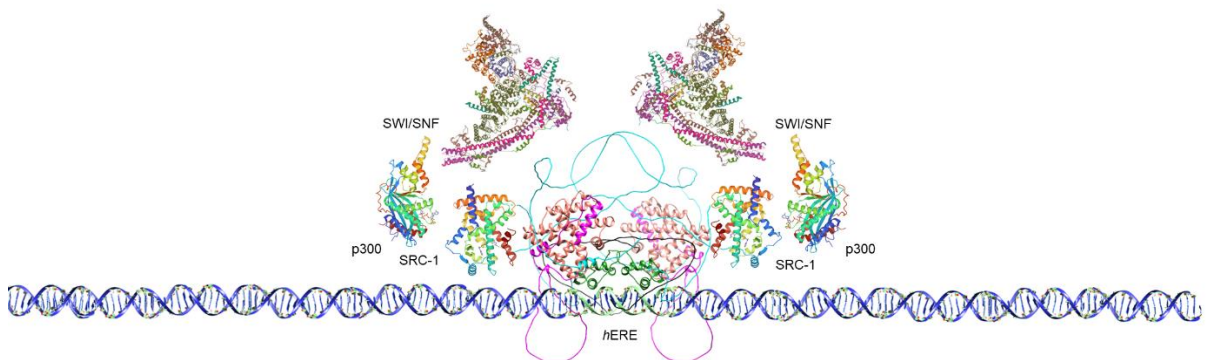


Слика 1.23. Регрутовање SRC-1 ко-активатора унутар геномског директног пута.

Као типична НАТ, SRC-1 ацетиљује конзервиране остатке Lys из еухроматина, катализујући трансфер ацетил групе са ацетил-КоА на Lys до формирања ϵ -N-ацетиллизина (ϵ -N-Ас-Lys) и дозвољавајући будућим транскрипционим факторима да остваре интеракције са регулаторним секвенцама DNA, узрокујући транскрипциону активацију [15,145]. Сврха ацетиловања јесте смањење афинитета хистона према DNA неутрализацијом утицаја позитивно наелектрисаног ϵ -NH₃⁺-Lys на хистон и трансформацијом амина у амид. Ипак, SRC-1 није селективан јер је генерални ко-активатор готово свих NRs, као и неколико рецептора који не припадају овој фамилији и врши трансактивацију хормонски-зависних циљаних гена кроз интеракцију NRIDs са AF-2 доменима унутар структуре NRs. Пост-транслаторна модификација у виду формирања ϵ -N-Ас-Lys има заправо за циљ да унутар ремоделираног еухроматина

учини расположивим центре за специфичне протеин-протеин домене интеракције попут ϵ -N-Ас-Lys-везујућег бромодомена.

Наиме, каталитичком активношћу SRC-1 ствара се предуслов за интеракцију НАТs типа А са еухроматином, класе која је експримирана у нуклеусу и која у топографији садржи бромодомен којим се препознају остаци Lys унутар хистона као супстрата [15,145]. SRC-1 као ко-активатор асоциран са ER α тако служи као платформа за регрутовање EP300 или E1A-везивног протеина p300 (енг. EP300 or E1A binding protein, p300) из класе НАТs типа А [146]. Регрутовањем p300 (Слика 1.24) повећава се интензитет ацетиловања хистона при чему се најчешће врши ацетиловање Lys27 из хистона 3 (H3), односно H3K27: ове опсежне измене у архитектури хроматина обезбеђују да hERE буде расположива довољно дуго да $P^{(Ser294)}-E_2-ER\alpha-ER\alpha-E_2-P^{(Ser294)}$ димер стимулише транскрипцију у циклусима, односно кроз вишеструко поновно покретање транскрипције чиме p300 учествује и у иницијацији транскрипције [146]. Додатно, пост-транслаторном модификацијом са p300 хроматин постаје хиперацетилован, тј. транскрипцијски активан, док хипоацетиловање само са SRC-1 може резултовати мањом транскрипционом активношћу [146]. Такође, ремоделирање катализовано са p300 стимулише регрутовање нефосфорилисане RNAP II, са способношћу иницијације касније транскрипције. Субсеквентна фосфорилација RNA полимеразе II компонентама комплекса базалне транскрипције машинерије конвертује полимеразу у форму са способношћу елонгације [146].

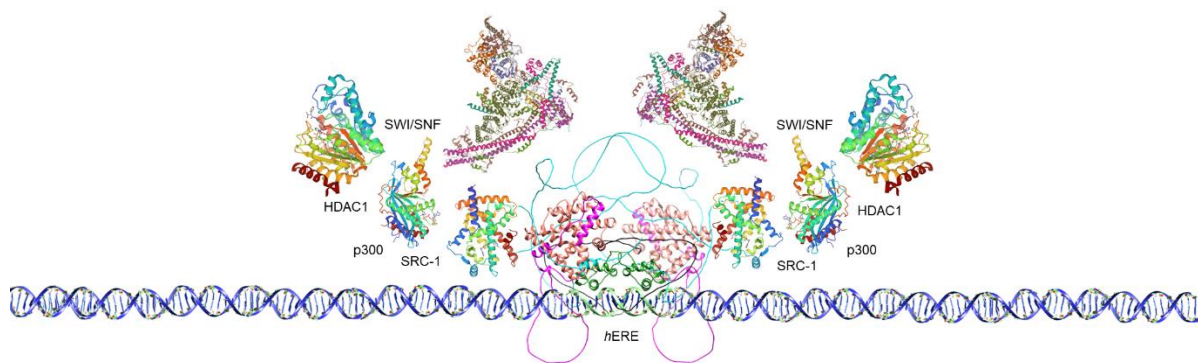


Слика 1.24. Регрутовање p300 ко-активатора унутар геномског директног пута.

Наравно, механизам унутрашње контроле ремоделирања ко-активаторима из групе НАТ најпре се врши адисијом ко-репресора из групе хистон деацетилаза (енг.

Увод

histone deacetylases, HDACs), најчешће хистон деацетилазе 1 (енг. histone deacetylase 1 (HDAC1) (Слика 1.25) [15,145]. Од HDAC1 ко-репресора, у процес је директно ко-репресор нуклеарних рецептора (енг. nuclear hormone receptor corepressor, NCoR), мада га може супституисати и медијатор утишавања гена ретиноидног и тироидног рецептора (енг. silencing mediator of retinoid and thyroid receptor, SMRT) [15,145]. Ко-репресори су специфични транскрипциони фактори (енг. specific transcription factors, STFs) који остварују интеракцију најчешће са AF-2 [15,145]. HDAC1 примарно врши деацетиловање ϵ -N-Ас-Lys тако контролишући степен ремоделирања [15,145].

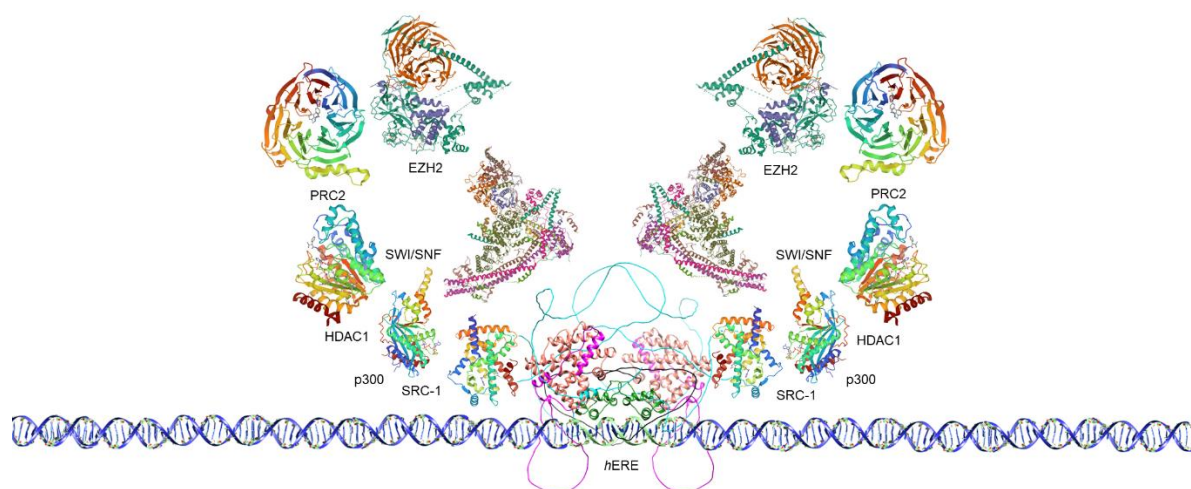


Слика 1.25. Регрутовање HDAC1 ко-репресора унутар геномског директног пута.

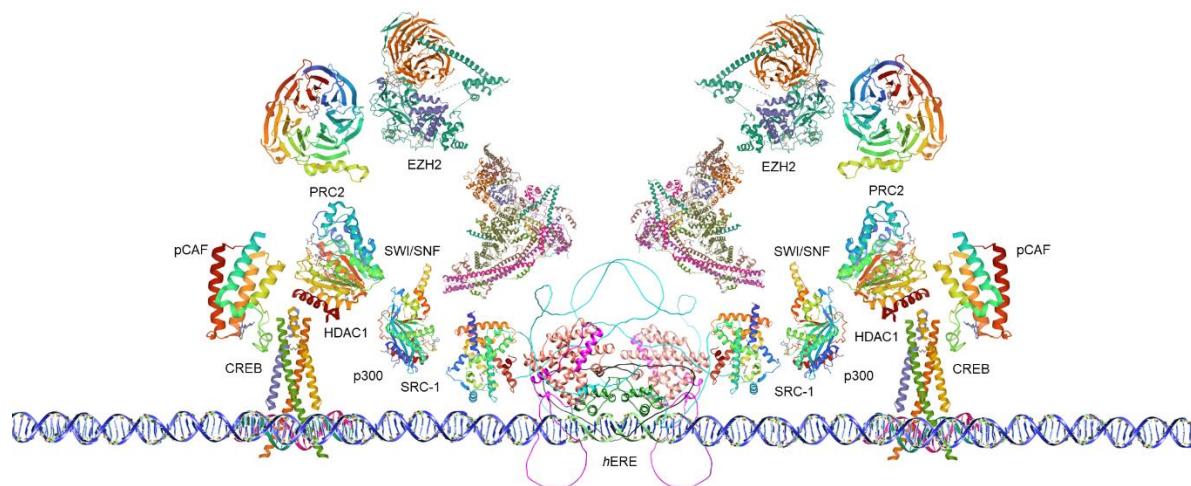
Колико је важан допринос ко-репресора на контролу трансактивације говори у прилог и да укључивање HDAC1 даље олакшава и интеракцију додатних ко-репресора попут поликомб рецесивног комплекса 2 (енг. polycomb repressive complex 2, PRC2) и појачивача зест хомолога 2 (енг. enhancer of zeste homolog 2, EZH2) (Слика 1.26) [15,145]. Ипак, ови додатни ко-репресори имају важнију улогу у даљој контроли процеса, условљеном метилацијом хроматина.

Након описаних целуларних догађаја, долази до дисоцијације p300 из комплекса а затим и до поновног укључења истог, овога пута у комплексу са CREB, што има за последицу и укључење фактора асоцираног са p300/CREB-везивним протеином (енг. CREB-binding protein, CBP), односно pCAF (енг. p300/CBP-associated factor) [15,145]. CREB протеин самостално, или заједно са pCAF, даље модификује хроматин ацетиловањем или метиловањем хистона, чиме се у процес укључују ко-активатори и ко-репресори из HMT фамилије (Слика 1.27) [15,145]. CREB је такође

укључен и у завршетак трансактивације ацетиловањем ацетилтрансфераза. Ацетиловање p160 протеина од стране CREB доводи до нарушавања комплекса између ко-регулатора p160 и E₂-ER α комплекса [15,145]. Ово резултира прекидом транскрипције и ремоделирањем хроматина за потребе рециклирања транскрипције и/или протеазомалне деградације [147].



Слика 1.26. Регрутовање PRC2 и EZH2 ко-репресора унутар геномског директног пута.

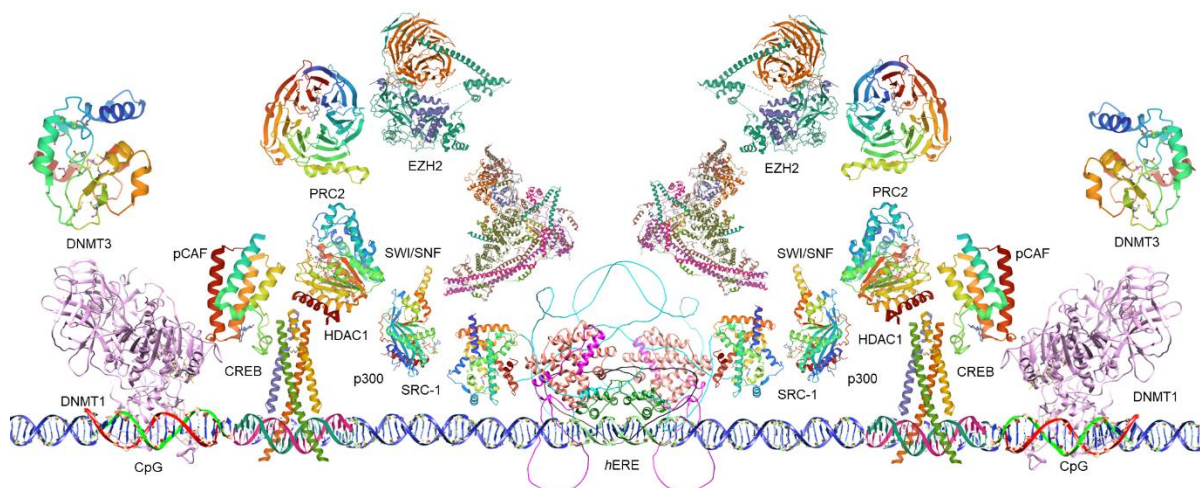


Слика 1.27. Регрутовање CREB и pCAF транскрипционих фактора унутар геномског директног пута.

Регулација експресије гена посредством E₂ ко-активатора и ко-репресора из породице HMT представља најзначајнији вид механизма унутрашње контроле процеса. Тако, E₂ иницира широк спектар епигенетских промена укључујући и метилацију CpG острва. CpG острва типична су места метилације са око 1000 bp дугачким еволутивно конзервираним секцијама DNA и регионима промотера који

Увод

регулишу експресију гена и структуру хроматина [15,145]. Метиловање CpG динуклеотида (CpG острва) дешава се у почетној фази сваког продуктивног циклуса и асоцирано је са регрутовањем метил CpG-везујућег протеина 2 (енг. methyl CpG-binding protein 2, CpG-BP2) и две изоформе DNA (цитозин-5-)-метилтрансфераза (енг. DNA (cytosine-5-)-methyltransferases, DNMTs), DNMT1 и DNMT3 (Слика 1.28) са посве различитим функцијама током интеракције са хроматинима око *hERE* [15,145]. У процесу метиловања катализованог од стране DNMTs, метил група бива трансферована са S-аденил метионина (енг. S-adenyl methionine, SAM) на положај C5 цитозина да би се формирао 5-метилцитозин (енг. 5-methylcytosine, 5mC) унутар CpG острва [15,145].



Слика 1.28. Регрутовање DNMT1 и DNMT3 ко-репресора унутар геномског директног пута.

DNMT1 је физиолошки активна током репликације DNA у сврху копирања образаца метилације DNA са родитељског хеликса и стимулише транскрипцију гена метиловањем H3K4 Lys4 из хистона 3 (енг. histone 3 lysine 4, H3K4) [148]. Ипак, важно је напоменути да када се метилација епигенетски одвија у региону CpG промотера или на местима транскрипције гена, онда ће вероватније доћи до репресије транскрипционе активности [149]. Изгледније је да геном буде метилован на нивоу CpG острва него на нивоу *hERE* [150], што имплицира да формирање $P^{(Ser294)}-E_2-ER\alpha-ER\alpha-E_2-P^{(Ser294)}$ димера стимулише метилацију CpG промотера и резултује „утишавањем гена” (енг. gene silencing). У „утишавању гена” најважнију улогу има DNMT3, која се другачије назива и *de novo* метилтрансфераза и која катализује метиловање Lys27 из хистона 3 (енг.

histone 3 lysine 27, H3K27), у процесу који је асоциран са репресијом гена [151]. Наиме, DNMT3 се експримује у три различите изоформе, DNMT3a, DNMT3b и DNMT3l, од којих DNMT3a и DNMT3b успостављају нове обрасце метилације на немодификованој DNA. Формирање $P(\text{Ser}294)\text{-E}_2\text{-ER}\alpha\text{-ER}\alpha\text{-E}_2\text{-P}(\text{Ser}294)$ димера активира DNMT3b, што указује да ER α има улогу у формирању нових DNA метилација и да на тај начин негативно утиче на иницијацију транскрипције помоћу DNMT3b-посредоване метилације DNA [152]. Да би DNMT3b вршио репресију транскрипције гена, претходно инкорпорирана HDAC1 мора да изврши деацетиловање H3K27, након чега укључење PRC2 и EZH2 резултује потпуним метиловањем, односно инкорпорацијом три метил групе на H3K27 (метиловање аминокиселине врши EZH2). Коначно, DNMT3b препознаје потпуно метиловану H3K27 и врши додано метиловање цитозина унутар CpG острва.

E₂ ипак индукује експресију гена деметилацијом региона промотера или појачивача унутар генома, што указује на то да ће приликом развоја рака дојке деметилација CpG острва на нивоу *hERE* бити стимулирана [150,153,154]. Током деметилације, CpG острво губи метил групу, чиме се иницира транскрипција гена [155]. Деметилација 5mC може да се одвија оксидацијом 5mC у хидроксилметил цитозин (енг. hydroxymethyl cytosine, 5hmC), катализованом помоћу тзв. десет-једанаест транслоказе 2 (енг. ten-eleven translocase 2, TET2) [156]. Лезија 5mC даље се оксидује до 5-формил-цитозина (енг. 5-formyl-cytosine, 5fmC) а онда и до 5-карбоксил-цитозина (енг. 5-carboxyl-cytosine, 5caC) [157]. Алтернативни начин модификације 5mC јесте њена активација деаминацијом катализованом са активираним цитидин деаминазом/аполипопротеин В mRNA едитујућим ензимом (енг. activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA editing enzyme, AID/APOBEC) [158,159]. AID/APOBEC врши деаминацију 5mC до 5-хидроксилметил-урацила (енг. 5-hydroxymethyl-uracil, 5hmU) [160,161]. Комплекс тимин DNA гликозидазе (енг. thymine DNA glycosylase, TDG), коначно уклања модификовани тимин, 5hmU, 5fmC и 5caC, те замењује лезије са цитозином [162].

Након неутрализације репресивног дејства HMTs, реструктурирање и транскрипционе особине респонзивног гена промотера *hERE* такође захтевају и раскидање двоструке спирале DNA катализовано топоизомеразом II (енг. topoisomerase II, Top II) [15]. Тако су $P(\text{Ser}294)\text{-E}_2\text{-ER}\alpha\text{-ER}\alpha\text{-E}_2\text{-P}(\text{Ser}294)$ димер-зависни транскрипциони процеси уско повезани са индукованим локалним променама у хроматину. Промене су

Увод

праћене позиционалним фазирањем нуклеозома и пост-транслаторним модификацијама нуклеозома, статусом метилације CpG динуклеотида и формирањем прекида у топологији DNA.

Укратко, транскрипција симулисана комплексом $P^{(Ser294)}-E_2-ER\alpha-ER\alpha-E_2-P^{(Ser294)}$ -*hERE*, односно одговарајућим ко-активаторима/ко-репресорима даље зависи од комплексне мреже протеин-протеин интеракција унутар транскрипционог апаратуса [15,66-68]. Транскрипциони апаратус додатно захтева укључење тзв. репресора и појачивача [15,66-68]. Док репресори остварују интеракције са секвенцама утишавача DNA које се обично налазе далеко узводно у односу на језгро промотера, DNA појачивачи секвенце (енг. enhancer DNA sequences) које се могу позиционирати хиљадама база далеко узводно од језгра промотера и формирају комплексе са специфичним транскрипционим факторима који се називају појачивач-везивни протеини (енг. enhancer-binding proteins), односно који представљају шест добро дефинисаних општих транскрипционих фактора из ТВМ (унутар ТВМ постоји преко 40 протеина са улогом транскрипционох фактора), транскрипционог фактора ПА (енг. transcription factor ПА, TFПА), затим транскрипционог фактора ПБ (енг. transcriptional factor ПБ, TFПБ), транскрипционог фактора ПД (енг. transcriptional factor ПД, TFПД), транскрипционог фактора ПЕ (енг. transcriptional factor ПЕ, TFПЕ), транскрипционог фактора ПФ (енг. transcriptional factor ПФ, TFПФ) и транскрипционог фактора ПН (енг. transcriptional factor ПН, TFПН) [15,66-68]. Укључење ових TF мора да се изврши узводно у односу на транскрибовани део гена пре него што RNAP II започне са својом каталитичком активношћу [15,66-68].

Транскрипција гена започиње са препознавањем базалног промотера [15,66-68]. Структуру базалног промотера чини четири сегмента и то елемент препознавања TFПБ (енг. TFПБ recognition element, BRE), тзв. „ТАТА кутија” (енг. “ТАТА-box”), елемент иницијације (енг. initiator element, INR) и низводни промотерски елемент (енг. downstream promoter element, DPE). „ТАТА кутија”, односно секвенца тимин-аденин-тимин-аденин (енг. thymine-adenine-thymine-adenine, ТАТА), налази се на око 25-30 парова база узводно у односу на *hERE*, односно од старта транскрипције и лоцирана је близу INR. Консензусна секвенца „ТАТА кутије” има форму ТАТА(А/Т)А(А/Т) и обично је окружена секвенцом богатом у гуанозину и цитозину (енг. GC-rich sequence). BRE, односно 5'-G/C,G/C,G/A,CGCC-3' секвенцом која се налази непосредно испред

Докторска дисертација Незрине Куртановић

„ТАТА кутије” јер 3’ крај BRE представља 5’-почетак „ТАТА кутије”. Са друге стране, INR секвенца има форму $YA_{+1}NT/AYY$ где је Y пиримидинска база а А место старта транскрипције на коме се налази стартни кодон (обично AUG који специфицира метионин) једну позицију након 5’-нетранслатираног региона.

TFIID први остварује интеракције са „ТАТА кутијом” и то је једини транскрипциони фактор који остварује директну интеракцију са DNA. Остали TFs из ТВМ остварују интеракције са TFIID, и то најпре TFIIA, који се позиционира испред „ТАТА кутије”, односно TFIIB, који иницира укључење осталих општих транскрипционих фактора, након интеракције TFIID са „ТАТА кутијом”. Наредни општи транскрипциони фактор из ТВМ који комплетира агрегат јесте TFIIF који коначно регрутује RNAP II и инкорпорира овај ензим у мега-комплекс, који се још назива и *комплексом иницијације*. RNAP II остварује интеракције директно са INR кутијом. Након стабилизације RNAP II на месту старта транскрипције, TFIIЕ и TFIIH остварују своју физиолошку улогу провоцирањем RNAP II да напусти *комплекс иницијације* и да започне полимеризацију нуклеотида зарад биосинтезе *m*RNA. Полимеризација нуклеотида одвија се на нивоу региона промотера који садржи око 20 парова база, након интеракције промотера са RNAP II. Транскрипција се одвија унутар места транскрипције, обично неколико парова база далеко од промотера. Активност *комплекса иницијације* контролише се екстерним транскрипционим факторима, од којих у директном геномском путу најзначајнију улогу има CREB.

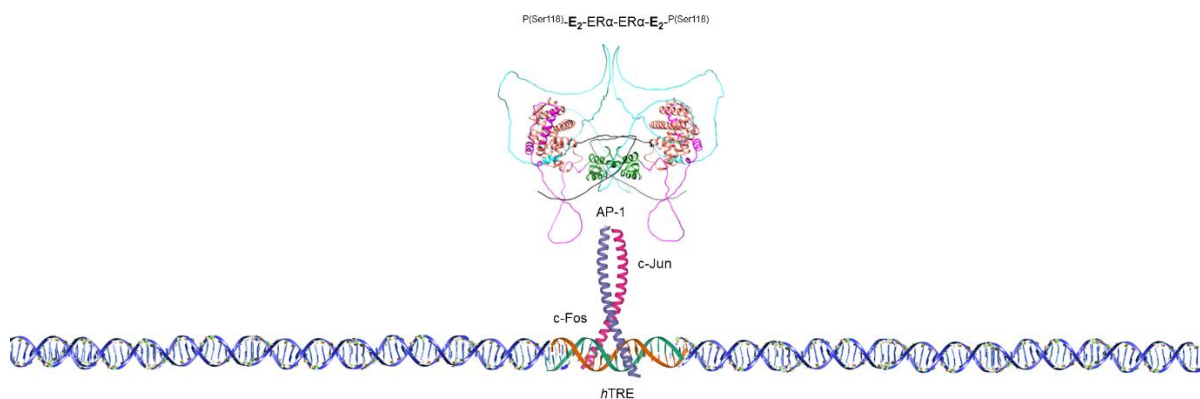
Геномски индиректни пут

E₂ такође може да стимулише експресију гена који не садрже hERE у својим регионима промотера. Заправо, готово трећина естроген-респонзивних гена не садржи hERE секвенце. Приликом одвијања геномског индиректног пута (енг. tethered pathway), E₂-ER α не остварује интеракције са DNA директно, већ радије преко протеин-протеин интеракција са другим класама транскрипционих фактора на нивоу њихових специфичних елемената одговора. Индиректна интеракција E₂-ER α подразумева потпуно одсуство интеракција лигандираног рецептора са hERE промотером, те протеин-протеин интеракцију (енг. tethering) са транскрипционим факторима активираним од стране ER α , попут AP-1 и/или Sp1 [163,164]. Способност E₂-ER α да посредује у експресији гена функционалним интеракцијама са AP-1 или Sp-1, као транскрипционим факторима који остварују директне интеракције са

Увод

одговарајућим секвенцама промотера унутар DNA, основа је одвијања *hERE*-независног сигналног пута [111-113,165]. Одвијање *hERE*-независног сигналног пута путем AP-1 сматра се примарним геномским индиректним путем, док је сигнализација условљена са Sp1 алтернативни геномски индиректни пут и биће му посвећена засебна под-секција.

Геномски индиректни пут започиње након интеракције E_2 са $ER\alpha$ те пост-транслаторних фосфорилација аминокиселина Ser104, Ser106, Ser118 и Tyr537, лоцираних унутар AF-1 домена, катализованих било помоћу p38 MAPK или CDk7, од којих је фосфорилација Ser118 пресудна за одвијање процеса. Описана активација E_2 - $ER\alpha$ комплекса неопходна је за последично активирање DBD домена, димеризацију самог $ER\alpha$ и интеракцију са AP-1 [66-68,111-113,165]. Наиме, настали димер, $P^{(Ser118)}-E_2-ER\alpha-ER\alpha-E_2-P^{(Ser118)}$, позитивно регулише посредством протеин-протеин интеракција физиолошку активност протеина AP-1, тј. c-Fos-c-Jun протоонкогеног хетеродимера. Транскрипциони фактор AP-1 сложене је топографије и формира се након димеризације карактеристичних bZIP домена (односно основних региона преплетања леуцина, енг. basic region leucine zipper, bZIP) унутар субјединица c-Jun и c-Fos онкогена. bZIP димен састоји се од региона преплетања леуцина (енг. leucine zipper region, LZR) и основног региона (енг. basic region, BR) који остварује интеракције са тзв. AP-1 елементом одговора, односно консензусном TGAGTCA секвенцом (тј 5'-TGAT/CTCA-3'), познатом и као елемент одговора 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата (енг. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) response element, *hTRE*).

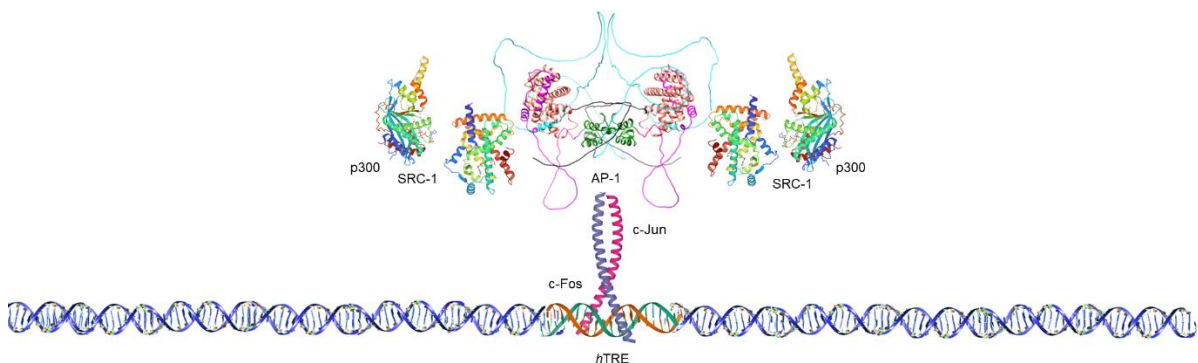


Слика 1.28. Иницирање геномског индиректног пута интеракцијом $P^{(Ser118)}-E_2-ER\alpha-ER\alpha-E_2-P^{(Ser118)}$ димера са AP-1 и *hTRE*.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

LZR омогућава с-Fos-с-Jun димеризацију са сврхом регулације експресије гена. Једном димеризовани, BRs сваке од субјединица остварују интеракцију са *hTRE*. Другим речима, након формирања $P^{(Ser118)}-E_2-ER\alpha-ER\alpha-E_2-P^{(Ser118)}-AP-1$ долази до активирања AP-1 промотера и иницирања ТВМ посредством *hTRE* [66-68,111-113,165]. Већ је напоменуто да мутација Arg211Glu унутар „Р кутије” DBD $ER\alpha$ диригује интеракцију $ER\alpha$ са AP-1 и одвијање транскрипције посредством *hTRE*. Активност AP-1 повећава се хормоналним деловањем E_2 а смањује се анти-естрогенима без повећања експресије с-Fos и с-Jun [66-68,111-113,165]. Као што је већ речено, $ER\alpha$ не остварује директно интеракције са *hTRE* али се регрутује директним протеин-протеин интеракцијама са с-Jun онкогеном путем DBD домена. Транскрипција посредована $ER\alpha$ зависи од AF-1 и AF-2 функција, јер рецептор коме недостаје AF-1 и AF-2 не успева да модулира транскрипцију која започиње са *hTRE* [66-68,111-113,165].

Унутрашња контрола геномског индиректног пута одвија се као и код геномског директног пута на нивоу $P^{(Ser118)}-E_2-ER\alpha-ER\alpha-E_2-P^{(Ser118)}$ димера, односно након интеракција AF-1 односно AF-2 са одговарајућим паровима активатора/ко-активатора или репресора/ко-репресора, мада процес није тако добро дефинисан као геномски директан пут. Иницијално долази до регулације процеса интеракцијом AF-1 унутар димера $P^{(Ser118)}-E_2-ER\alpha-ER\alpha-E_2-P^{(Ser118)}$ са SRC-1 и p300.

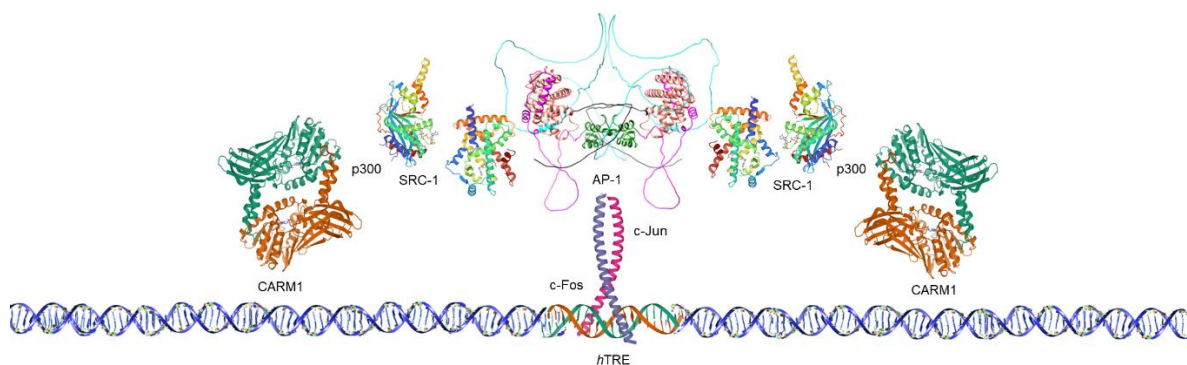


Слика 1.29. Регрутовање SRC-1 и p300 ко-активатора унутар геномског индиректног пута.

Потом се у процес укључују НМТ ко-активатори, попут аргинин метилтрансфераза 1 повезане са коактиватором (енг. co-activator-associated arginine

Увод

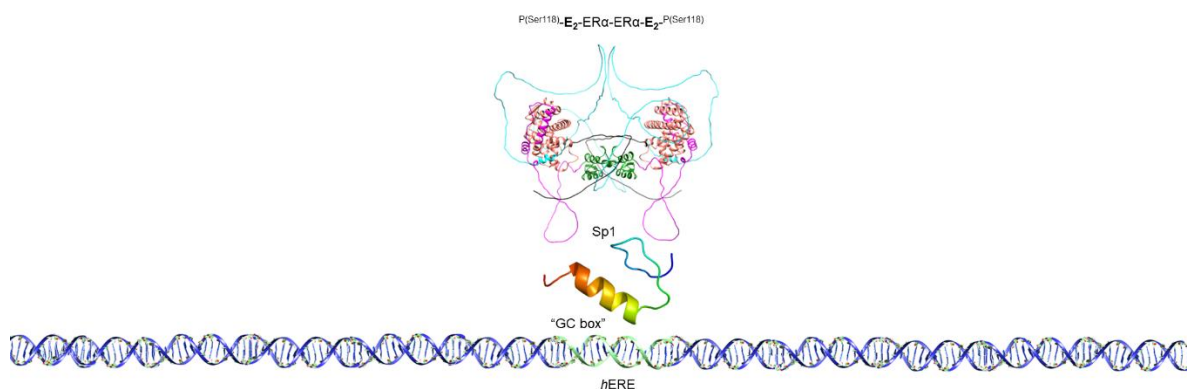
methyltransferase 1, CARM1), док је непознато који НМТ ко-репресори регулишу процес. Након асоцијације CARM1, о путу се мало зна [66-68,111-113,165].



Слика 1.30. Регрутовање CARM1 ко-репресора унутар геномског индиректног пута.

Алтернативни пут геномског индиректног пута

Sp1 припада фамилији специфичних протеина (енг. specificity proteins, Sps)/транскрипционих фактора која подсећају на Krüppel-ове (енг. Krüppel-like family of transcription factors, KLF), тј. Sp/KLF фамилији TFs са Zn^{2+} -прстом (енг. SPs/KLF zinc-finger transcription factor family), којим се остварују интеракције са консенсузном секвенцом (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T) (односно 5'-GGGCGGGAC-3') удаљеном од hERE, познатом и као „GC кутија” (енг. “GC box”) (Слика 1.31) [167].

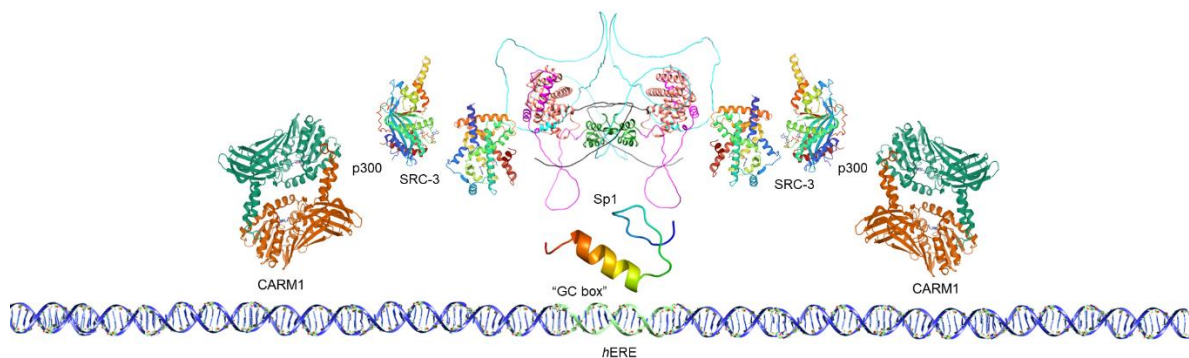


Слика 1.31. Иницирање алтернативног геномског индиректног пута интеракцијом P(Ser118)-E₂-ERα-ERα-E₂-P(Ser118) димера са Sp-1 и hERE.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Zn²⁺-прст формира се координативним везивањем Zn²⁺ за два остатка цистеина и два остатка хистидина (Cys2/His2) и представља квадратно-планарни комплекс на нивоу секундарне структуре Sp1. ER α , као одговор на унакрсне интеракције (енг. cross-talks) E₂ са Sp1, модулира транскрипције различитих гена [132,168]. Такав вид фармакологије ER α је наравно посредован интеракцијом (енг. tethering) ER α са Sp1, те последичним активирањем елемента одговора посредством „GC кутије” [132,168]. Чини се да AF-1 ER α успоставља интеракције са Sp1 [132,168].

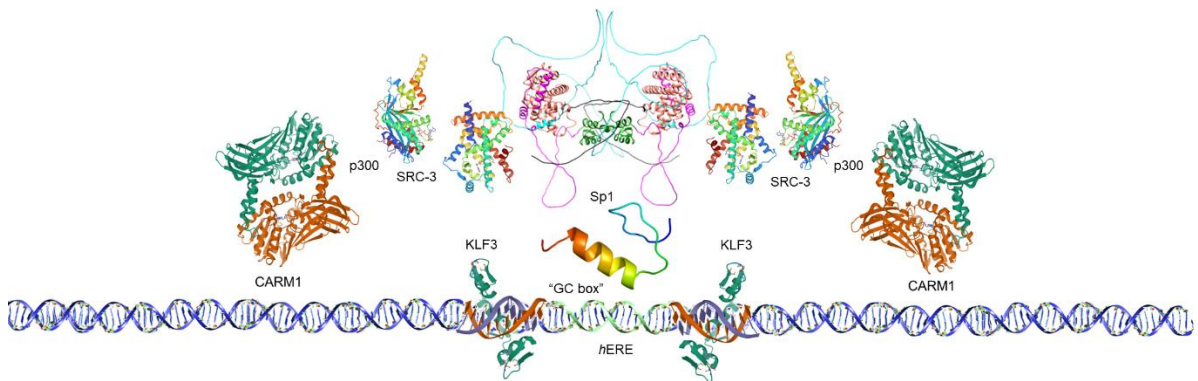
Оно што је карактеристично за описани пут је да је сâм hERE промотер богат GC нуклеотидима унутар половине hERE секвенце (односно на нивоу hERE_{1/2}, 5'-AGGTCA сегмента) да би активирао експресију гена олакшану од стране RNAP II. Механизми унутрашње контроле пута подразумевају интеракцију CPB/p300 на нивоу AF-1 ER α , док је LBD расположив за интеракције са SCR-3 коактиватором, након чега долази до комплексирања са CARM1 (Слика 1.32) [132,168].



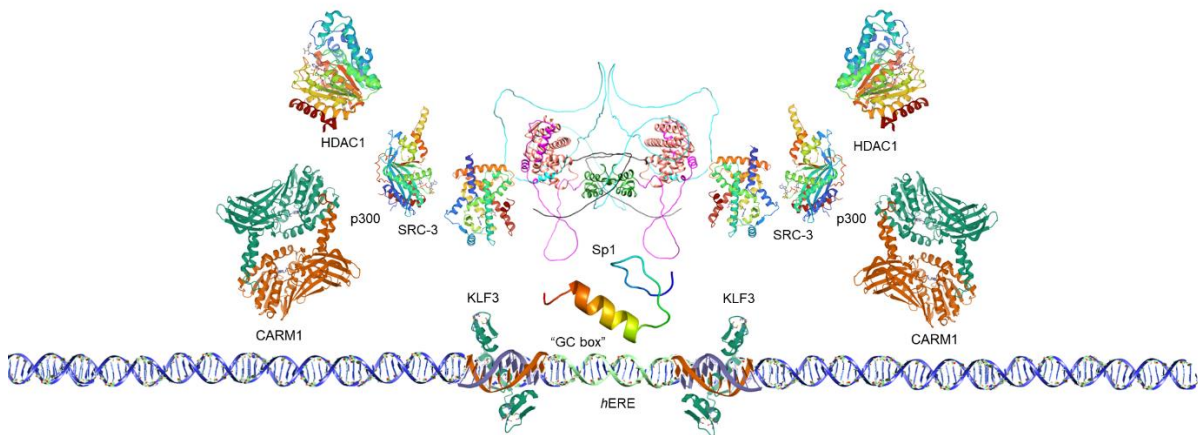
Слика 1.32. Регрутовање SRC-1, p300 и CARM1 ко-активатора унутар алтернативног геномског индиректног пута.

Ипак, геномски индиректни пут може бити и негативно регулисан да би се сузбила транскрипциона активност $P^{(Ser118)}-E_2-ER\alpha-ER\alpha-E_2-P^{(Ser118)}$. Тако, неки чланови породице протеина сличним Sp1 протеинима/KLF породице, попут, фактора 3 који подсећа на Krüppel-ов (енг. Krüppel-like factor 3, KLF3), фактора 8 који подсећа на Krüppel-ов (енг. Krüppel-like factor 8, KLF8) и фактора 12 који подсећа на Krüppel-ов (енг. Krüppel-like factor 12, KLF12), везани за DBD домен делују као репресори (Слика 1.33) [132,168].

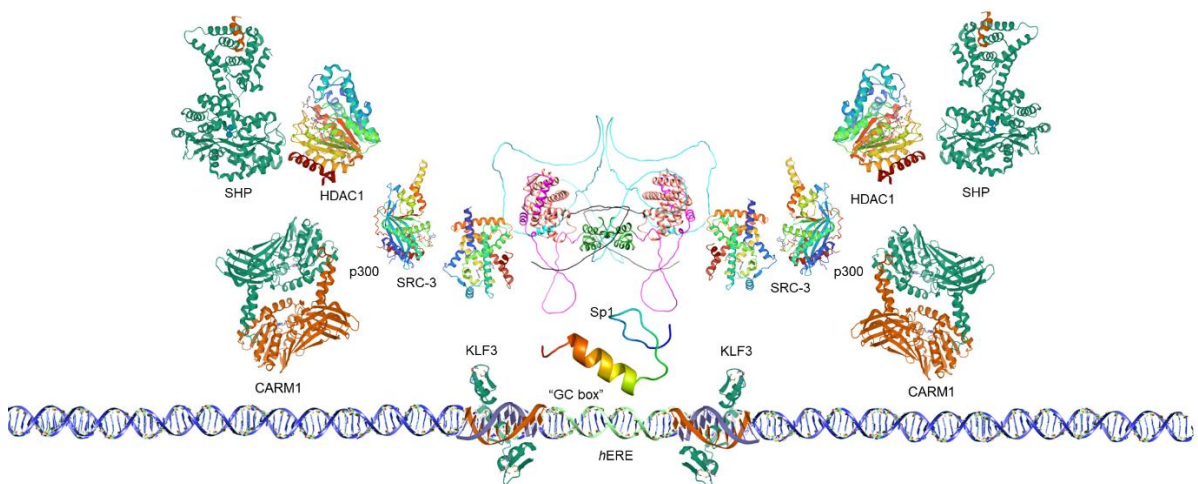
Увод



Слика 1.33. Регрутовање KLF3 ко-активатора унутар алтернативног геномског индиректног пута.



Слика 1.34. Регрутовање HDAC1 ко-активатора унутар алтернативног геномског индиректног пута.



Слика 1.35. Регрутовање SHP ко-репресора унутар алтернативног геномског индиректног пута.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Њихово ометање DBD је предуслов за агрегацију NCoR или SMRT за LLEML секвенцу LBD преко CoRNR (корепресор – нуклеарни рецептор, енг. Co-Repressor-Nuclear Receptor) секвенце (тј. LXXLLI/HIXXXI/L мотива) (Слика 1.34). Након тога, ко-репресори класе II, попут малог хетеродимерног партнера (енг. small heterodimer partner, SHP) остварују интеракције са LBD преко LXXLL и бивају асоцирани са HDAC протеинима (Слика 1.35).

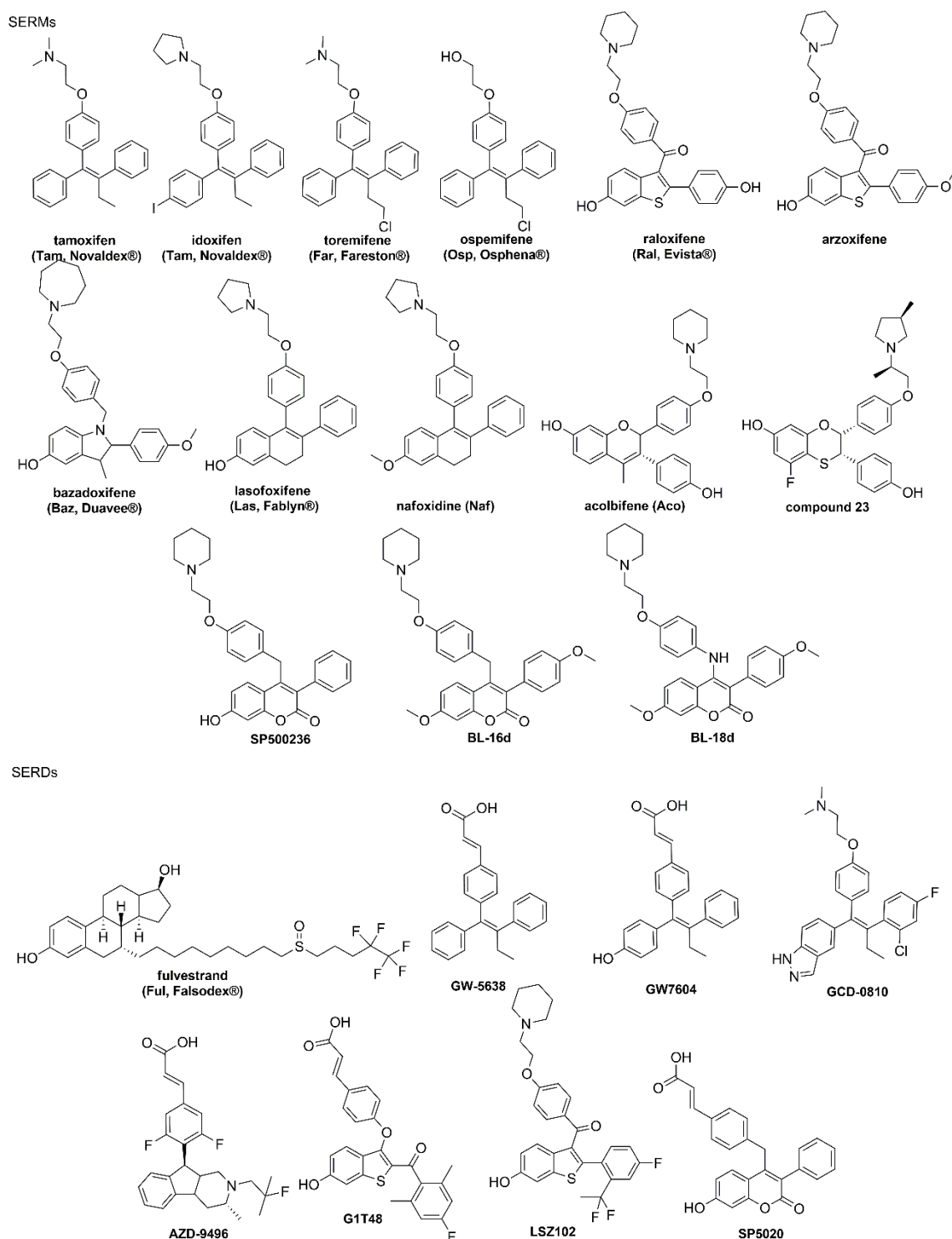
Лекови против канцера дојке

Код ER α (+) канцера, ER α -индукована сигнализација стимулише пролиферацију ћелија рака дојке [169]. Како ER α (+) канцери представљају око 75% свих дијагностикованих канцера дојке [170], антиестрогени на нивоу ER α преобладајуће се користе у лечењу истог и могу се на основу фармакологије класификовати као: 1) једињења која смањују ендегену продукцију естрогена у виду инхибитора ароматазе (енг. aromatase inhibitors, AI) и гонадотропин-отпуштајућих хормонских агониста (енг. gonadotropin-releasing hormone agonists); 2) хемијски ентитети који модулирају ER α као парцијални агонисти, SERMs и SERDs [171]. Клиничка примена сваке од класа антиестрогена у лечењу канцера дојке зависи од неколико фактора: фазе развоја тумора, репродуктивног доба пацијента и претходне историје лечења [169]. Надаље су представљене фармакологија, ткиво-специфичне особине, клиничка истраживања и примена лекова са SERM и SERD фармакологијом у лечењу канцера дојке [169].

Парцијални агонисти, SERMs (мешовити агонисти-антагонисти) и SERDs (потпуни антагонисти), поменути у претходном делу текста (Слика 1.19) а детаљније описани у наставку (Слика 1.36), представљају главне класе терапеутика против рака дојке остварујући интеракције са LBD ER α [169]. Парцијални агонисти испољавају ефикасност мању од потпуних агониста (E₂) али због тога индукују суб-максимални одговор рецептора на стимулацију, односно смањују физиолошку активност истог [169]. SERMs испољавају одређени фармаколошки ефекат, али у односу на циљно ткиво (у неким ткивима су агонисти у другим антагонисти), док SERDs стимулишу деградацију рецептора независно од ткива [169]. Обзиром да је тема ове докторске дисертације рационални дизајн SERMs, у даљем делу текста ће бити дат осврт на досадашње резултате у области (Слика 1.36). Обзиром да SERMs не стимулишу деградацију ER α њихова примена је оправдана у раној фази развоја канцера дојке када је потребно вршити супресију истог [169]. Са друге стране, SERDs, премда јако ефикасна, имају недостатак да њиховом апликацијом мора да се стимулише

Увод

биосинтеза ER α , што је бенефитно код каснијих стадијума канцера али има импликације у хомеостази рецептора [169].



Слика 1.36. Хемијске структуре SERM и SERD антиестрогена, комерцијални називи лекова одобрених од стране америчке агенције за храну и лекове (енг. Food and Drug Agency, FDA) заједно са тривијалним називима лекова који су подвргнути клиничким испитивањима против развоја рака дојке, као и структуре недавно развијених потентних SERM антагониста или SERD антагониста базираних на језгру кумарина.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

SERMs и SERDs су антиетрогени дизајнирани да буду компетитивни антагонисти естрогена и антагонирају активности ER α . Иако су већина кључних аминокиселина унутар LBD које су одговорне за интеракцију са SERMs и SERDs идентичне, мале структурне разлике у функционалним групама које остварују интеракцију са H12 утичу на то да SERMs спречавају интеракцију ER α са ко-активаторима и ко-репресорима [172], док се једињењима са SERD фармакологијом такве особине не приписују. Наиме, активирањем ER α са E₂ H12 подлеже индукованом прилагођавању на начин да долази до затварања LBD, што резултује отварањем AF-2 и остваривањем интеракција са претходно описаним ко-регулаторима (Слике 1.22 до 1.25) преко LXXLL мотива [73]. Са друге стране, интеракција SERMs са LBD форсира индуковано прилагођавање H12, односно његов отклон од H11 ка тзв. отвореној конформацији, због чега не долази до затварања LBD али H12 окупира простор препознавања ко-активатора имитирајући интеракције пептида ко-активатора са AF-2 користећи сопствени LXXML мотив, односно CoRNR. Таква интеракција спречава ER α да оствари интеракцију са ко-репресорима [73].

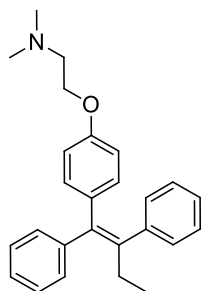
Хемијска класификација и фармакологија SERMs

SERMs као нестероидна једињења изазивају дислокацију LBD H12 и последично покрећу каскаду унутар ћелијских догађаја, попут повећања доступности промотера, ангажовање ткивно-зависних ко-регулатора, или индукције пост-транслационих модификација, који имају за циљ да спрече ER α -зависну сигнализацију на нивоу hERE промотера (види даљи текст) [169]. До сада су развијене три SERM генерације (Слика 1.36): SERM I, којој припадају тамоксифен (енг. Tamoxifene, **Tam**, Nolvadex®) и торемифен (енг. toremifene, Far, Fareston®), SERM II, чији је представник ралоксифен (енг. raloxifene, **Ral**, Evista®), односно SERM III, којој припадају клинички медикаменти попут нафоксидина (енг. nafoxidine, **Naf**), ласофоксифена (енг. lasofoxifene, **Las**, Fablyn®), оспемифена (енг. ospemifene, **Osp**, Osphena®) и базадоксифена (енг. basadoxifene, **Baz**, Duavee®) [173]. Развој бројних агенаса (Слика 1.36) заустављен је у некој од фаза клиничких испитивања, па ће наредни део текста бити посвећен кратком опису фармакологије најважнијих SERMs [169].

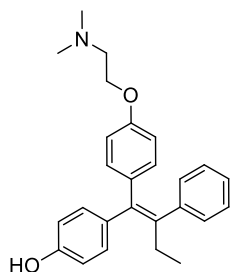
Увод

Трифенилетилени као SERMs

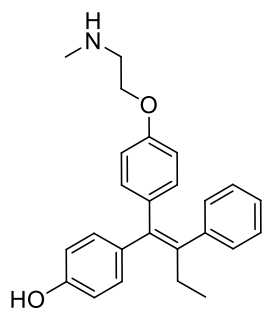
Тамоксифен



Оригинално комерцијализован као регулатор плодности, **Tam** је такође показао ефикасност у клиничким студијама против напреднијих случајева рака дојке [174,175]. Откривен од стране Walpole *et al.*, унутар Imperial Chemical Industries Pharmaceuticals [176], **Tam** (оригинално кодно име ICI 46,474) као антипролигеративни агенс против ER α (+) канцера дојке значајно је редуковао инкорпорирање тимидина у ћелије рака дојке [177]; међутим лек је испољио слабу *in vitro* активност у односу на *in vivo* ефикасност [178,179]. Стереоизомер *E-Tam* поседује агонистичко дејство, док *Z-Tam* испољава антагонистичко дејство [178,179]. Поред описаних нежељених ефеката, **Tam** изазива и таласе врућине, ноћно знојење, гинеколошке симптоме (сувоћа вагине, вагинални исцедак), депресију, заборавност, промене сна, повећање телесне тежине и смањену сексуалну активност. Жене са нежељеним ефектима такође чешће узимају лекове који инхибирају CYP2D6 [180-182].



Тек је касније откривено да *in vivo* ефикасност **Tam** потиче од његових активних метаболита 4-хидрокситамоксифена (енг. 4-hydroxytamoxifen, **4-OHT**) и ендоксифена (енг. endoxifen, **End**) [183], биосинтетисаних током прве фазе метаболизма каталитичком активношћу цитохром P450 ензимима CYP2D6, CYP3A и CYP2C [184]. Као антагонист ER α , **4-OHT** [185] стимулише интеракцију рецептора са ко-репресорима попут NCOR1 and SMRT узрокујући репресију ER α сигнализације унутар MCF-7, односно ER α (+) ћелијским линијама [186].

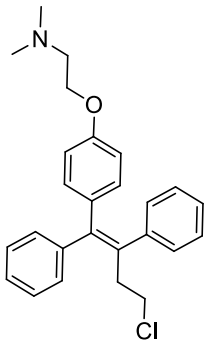


Међутим, диференцијална експресија ко-регулатора унутар различитих ткива разлог су зашто се **4-OHT** понаша као антагонист канцера дојке али истовремено и парцијални агонист унутар ендометријума, јер унутар утеруса **4-OHT** стимулише регрутовање NCOA1 ко-активатора који доприноси агонистичком деловању лека (потврђено на нивоу Ishikawa и ECC1 ћелијских линија ендометријума [187]: NCOA1 унутар MCF-7 и T47D ћелијских линија канцера

Докторска дисертација Незрине Куртановић

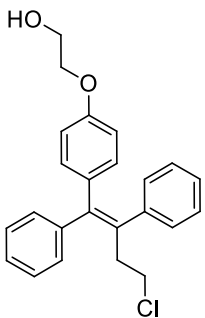
дојке може конвертовати **4-ОНТ** у транскрипциони активатор. Описане особине **4-ОНТ** потврђене су *in vivo* помоћу ксенографт студија [188]. Стога је клиничка употреба **Tam (4-ОНТ)** асоцирана са 2-7 пута већим ризиком од развоја канцера ендометријума код жена старијих од 50 година [189].

SERMs слични тамоксифену

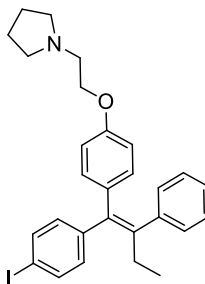


Описани нежељени ефекти **Tam** довели су до развоја серије деривата са потенцијално умањеним нежељеним дејствима али без компромитовања ефикасности лека. Тако је развијен торемифен (енг. toremifene, **Tor**), увођењем једног атома хлора на једну од *trans*-етил група **Tam** [189]; код пременопаузалних жена **Tor** је показао сличне ефекте као и **Tam** што је довело до његове клиничке примене код напредних случајева рака дојке са метастазама [190].

Карактеристично за **Tor** јесте брза апсорпција са 100% биорасположивошћу. Његова биотрансформација у јетри се постиже ензимом CYP3A4 (*N*-деметилација), при чему настаје метаболит *N*-диметилторемифен. **Tor** испољава низ гинеколошких нуспојава као што су цисте јајника и фиброиди материце, затим осип на кожи и мучнину, односно заборавност [181].



Хидроксилацијом **Tor** настаје **Osp**. Има примену у терапији код метастатског карцинома дојке, блокирањем рецептора естрогена. Поред тога, **Osp** делује и на α и β трансформацијске факторе раста и епидермални фактор раста и инхибира протеин киназу C (енг. protein kinase C). Налази се у трећој фази клиничких испитивања за терапију постменопаузалне остеопорозе и урогениталне атрофије. Осим деловања на кости, оспемифен снижава концентрацију липопротеина ниске густине (LDL) [173].

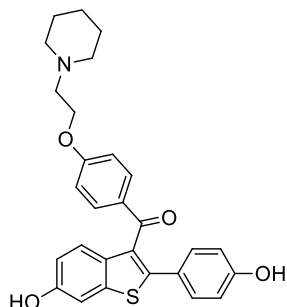


Идоксифен (енг. idoxifene, **Ido**) развијен је увођењем јода на положају C4 зарад потенцијалног смањења клиренса и повећања времена полу-живота те последичног споријег метаболизма [191]. Међутим, услед испољавања агонизма у ендометријуму, развој лека обустављен је у фази III клиничких испитивања [192].

Увод

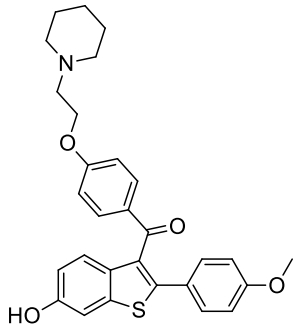
Базедоксифени као SERMs

Ралоксифен



Континуални напори за смањењем нежељених ефеката на нивоу ендометријума довели су до развоја бензотиофена, индола и нафталена као SERMs. **Ral** припада класи бензотиофена и иницијално је био испитиван за умањење ризика од рака дојке [193]. Ко-кристализација **Ral** са LBD ER α [73] довела је до сазнања да лек има већи афинитет према остваривању водоничне везе посредством пиперидинског прстена са аминокиселином H3 Asp351 у односу на терцијарни амин **Tam** (4-OHT) [194], као кључном интеракцијом за испољавање антиестрогених особина [195]; мутација D351E може конвертовати **Ral** у парцијалног агониста са особинама сличним **Tam** (4-OHT) [194,195]. **Ral**, за разлику од **Tam** (4-OHT) не регрутује NCOA1 у ћелијама ендометријума и не испољава естрогене особине у утерусу [196], те може блокирати **Tam**-посредован раст ендометријалног карцинома [197]. Међутим, **Ral** испољава агонистичко дејство на ER α у костима и кардиоваскуларном систему. Током *in vitro* студија, **Ral** се понашао као антагонист ER α и инхибирао пролиферацију ћелијских линија рака дојке; током *in vivo* студија **Ral** је био ефикасан против рака дојке изазваног метил нитросоуреом (енг. methyl nitrosourea, MNU) [198]. Ипак, **Ral** је испољио унакрсну резистентност у односу на **Tam**-третиране туморе дојке [199] и показао је само умерену активност према напреднијим карциномима дојке [200]. Ипак, **Ral** је показао ефикасност у превенцији рака дојке [197], те се у клиничкој пракси употребљава за редуковање ризика од ER α (+) рака дојке код жена са предиспозицијама у пост-менопаузи. Један од главних недостатака **Ral** је ниска биорасположивост од само 2% узрокована брзом апсорпцијом услед глукуронидације фенолних група са UDP-глукуронозилтрансферазама (UDP-glucuronosyltransferases) UGT1A8 и UGT1A10 [201]. Расподељује се у ткивима и прелази у активне метаболите у јетри, плућима, костима, слезини, материци и бубрезима. Полуживот **Ral** износи 32 сата. Регистрован је у неким земљама за лечење и превенцију остеопорозе у постменопаузи [173]. Зависно од дозе, доводи до пораста остеобластне активности. Смањује коштану преградњу и спречава губитак коштане масе у постменопаузи. Такође, смањује ризик настанка вертебралних фрактура (прелома). Значајно смањује укупне липопротеине LDL без дејства на HDL. Остали нежељени ефекти **Ral** су топлота и грчеви у ногама, те венска тромбоемболија [201].

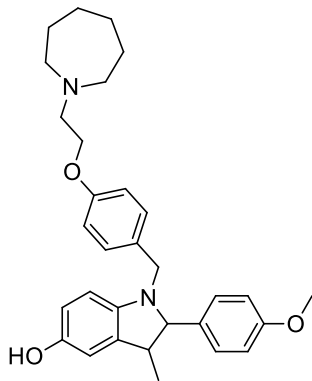
Арзоксифен



Услед описаних нежељених ефеката **Ral**, је дошло до развоја лекова са потенцијално оптималнијим фармакокинетичким профилем, попут арзоксифена. **Arz** је дизајниран као про-дрога у којој је једна од фенолних хидроксилних група **Ral** заштићена метилетром да би се побољшала биорасположивост [202]. **Arz** је демонстрирао већу антипролиферативну активност *in vitro* на нивоу MCF-7 ћелијских линија од **Tam** и **Ral** [202], те незнатно бољу активност од **Ral** код MNU-индукованих модела туморигенезе дојке [203]. Такође, **Arz** је испољио неутрални ендометријални профил [203]. Међутим, код **Tam**-резистентних пацијената, **Arz** је био неефикасан [204], да би коначно његов развој био обустављен у фази III клиничких испитивања због инфериорности у односу на **Tam** током испитивања времена прогресије тумора (енг. time to progression [TTP] endpoint) [205].

Индоли и тетрахидронафталени као SERMs

Базедоксифен



Baz је монотерапеутик за превенцију и лечење остеопорозе који се такође користи у терапији канцера дојке у комбинацији са коњугованим естрогенима. Као лек против канцера дојке, структурно је јединствен јер његову основу чини језгро 2-фенил-3-метилиндола у поређењу са бензотиофенским језгром **Ral** и трифенилетиленским језгром **Tam** [206], док у бочном низу волуминознији азепански хетероциклус врши већи стерни опритисак на H12 од **Ral** [206]. **Baz** је испољио антагонизам према пролиферацији MCF-7 ћелијских линија [206]. Како је примећено да **Baz** утиче на инверзну функцију ER α у смислу активности транскрипционог фактора, али без индуковања деградације рецептора, односно да испољава „псеудо-SERD” профила (енг. “SERD-like” profile), лек се често карактерише као мешовити SERM/SERD хибрид [207]. Са оваквом фармакологијом асоцирана је и активност **Baz** код **Tam**-резистентних ксенографта [207]. Иако је у малим дозама **Baz** узроковао повећање масе утеруса [206], у фази III клиничких испитивања инциденце ендометријалне хиперплазије (енг. endometrial hyperplasia) и полипа биле су на нивоу

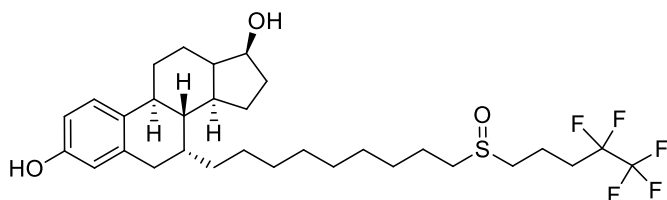
Увод

плацеба [208]. Тренутно се **Vaz** испитује у комбинацији са палбоциклибом (енг. palbociclib), инхибитором циклин-зависне киназе 4/6 (енг. cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6) у стадијуму IV ER α (+) канцера дојке, где је нотирана позитивна синергистичка активност ([209]; NCT02448771).

Хемијска класификација и фармакологија SERDs

Са друге стране, SERD једињења представљају потпуне антагонисте ER α који такође индукујући дислокацију H12, али чије везивање узрокује брзу разградњу ER α [210]. Везивање SERD једињења у лиганд-везивном домену ER α доводи до дестабилизација рецептора и последичне деградације унутар протеозома (видети даљи текст) [210]. Једино SERD једињење одобрено од стране FDA јесте стероидно-компетитивни антагонист ER α фулвестрант (енг. fulvestrant, **Ful**, Faslodex®), док је у фази клиничких испитивања и било и једињење GW-5538 које је развила компанија Glaxo SmithKline (Слика 1.36) [210].

Фулвестрант



Иако велики проценат **Там-**резистентних тумора показује унакрсну резистентност у односу на SERMs, овакви канцери ипак зависе од ER α сигнализације [211]. Сазнање да ER α сигнализација остаје активна код оваквих канцера подстакла је истраживања у смеру развоја једињења са SERD фармакологијом. Супротно једињењима са SERM фармакологијом, SERDs су антиестрогени дизајнирани да дестабилизују H12 ER α и функцију рецептора, те да индукују деградацију истог [212]. Први SERDs била су стероидна једињења са дугим бочним низовима попут ICI 164,384 и ICI 182,780, такође познатог и као **Ful** [213].

ICI 164,384, откривен међу 7 α -супституисаним дериватима естрадиола, био је први антагонист ER α описан као чисти антиестроген, што је указивало на недостатак агонизма у свим ER α (+) ткивима [213]. Бочни низ ICI 164,384 није дозвољавао асоцијацију H12 и остатка LBD, спречавајући рецептор да заузме агонистичку или антагонистичку конформацију, што је представљало јединствену фармакологију резервисану за чисте антагонисте [214].

Ful је добијен даљим развојем ICI 164,384 и демонстрирао је већу активност у *in vitro* and *in vivo* моделима канцера дојке и ендометријалног канцера [215].

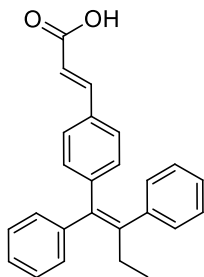
Докторска дисертација Незрине Куртановић

Предпостављена фармакологија **Ful** била је његова интеракција са мономером ER α и спречавање димеризације рецептора [216], након чега долази до деградације истог унутар убикитин-протеазомалног пута [217]. **Ful** је током предклиничких испитивања био ефикасан против **Tam**-резистентних тумора [218], док је сличан потенцијал био уочен и током клиничких студија [219]. Стога се као интрамускулаторни терапеутик, али ипак са повећаном биорасположивошћу, **Ful** користи за пацијенте са метастазама [220].

Лимитирана биорасположивост **Ful** усмерила је даља истраживања ка развоју орално биорасположиве формулације, што нажалост није резултовало успехом [221]. Стога су скорије учињени напори да се повећа поларност и растворљивост бочног низа **Ful** као и да се повећа биорасположивост употребом биоизостера борне киселине, што тренутно чека на клиничку валидацију [222].

Употребом **Ful** долази до испољавања минималних нежељених ефеката са симптомима унутар гастроинтестиналног тракта, затим главобољама и топлотним таласима. **Ful** не стимулише карцином материце али није пожељно да га користе труднице и пацијенткиње које су на терапији антикоагулантима [223].

GW5638

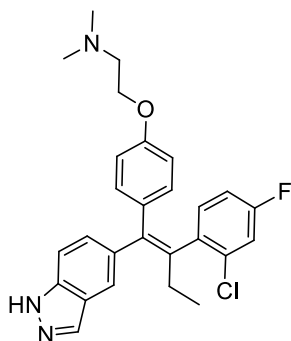


GW5638, продрога GW7604, јесте аналог тамоксифена и први SERD који је развијен увођењем остатка акрилне киселине уместо традиционалног терцијарног амина у структури SERMs [224]. У својој биоактивној конформацији карбоксилна група из акрилног остатка остварује интеракције са H3 Asp351 и аминокиселинама из H12, што доводи до дестабилизације рецептора и деградације након излагања хидрофобних остатака H12 [74]: поменута функционална група индуковала је дестабилизацију ER α након дислокације H12 где је сâм остатак фенилакрилне киселине нарушио формирање водоничних веза између H12 Leu536 и H12 Tyr537 (вероватно заједно са још једним молекулом воде) унутар структуре насумице увијања између H11 и H12; као последица нарушавања поменуте мреже водоничних веза дошло је до дислокације H12 даље у односу на H11 што је довело до повећања хидрофобности површине лиганд-везујућег домена унутар терцијарне структуре ER α (аминокиселине H12 Leu536, H12 Leu539, H12 Leu540 и H12 Met543 више нису биле сакривене у хидрофобном језгру), смањења стабилности ER α и последичне

Увод

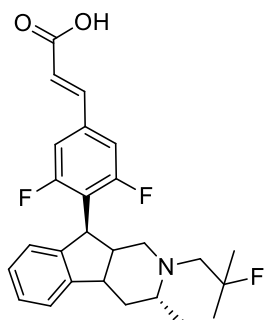
деградације у протеозомима [74]. Оваква јединствена фармакологија довела је до активности код **Tam**-резистентних ксенографта [225]. Ипак, даљи развој једињења обустављен је након фазе I клиничких испитивања [226].

GDC-0810



GDC-0810, познат и под кодним именом ARN-810, оригинално је развијен од стране Seragon Pharmaceuticals и даље оптимизован од стране Genentech/Roche Inc, након структурне модификације GW5638 [226]. Током пред-клиничких студија GDC-0810 деградирао је ER α и показао високу активност *in vitro* [226]. У *in vivo* ксенографту ћелијских линија канцера дојке и ксенографтима изолованим из пацијената (енг. patient-derived xenograft, PDX), укључујући и туморе резистентне на ендокрину терапију, GDC-0810 је показао значајну антитуморску активност [227]. GDC-0810 такође показује благу агонистичку активност у ендометријалним ћелијама и *in vivo* на лабораторијским животињама [227]. Ипак, развој GDC-0810 обустављен је фази II клиничких испитивања [228].

AZD9496



AZD9496 јесте SERD који се такође примењује орално и развијен је од стране Astra Zeneca Plc. Структури AZD9496 недостаје фенолни остатак присутан у **Ful** и **4-OHT** те стога до остваривања физиолошке активности долази кроз нове интеракције са ER α [229]. За разлику од **Ful**, AZD9496 изазива раст тежине утеруса код експерименталних животиња, али ипак не у мери у којој то изазива **Tam** [230]. Док AZD9496 и **Ful** испољавају моћ да деградирају ER α , модулација гена регулисана са AZD9496 одвија се другачије у односу на **Ful** [230], што говори у прилог да свако једињење са SERD фармакологијом има јединствене фармаколошке карактеристике. Ипак, AZD9496 инхибира раст ћелија канцера дојке *in vitro*, унутар MCF-7 ксенографта и код PDX тумора *in vivo*. Тренутно је AZD9496 у фази I клиничких испитивања на пацијентима са ER α (+) канцером дојке [231].

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Кумарини као модулатори ER α

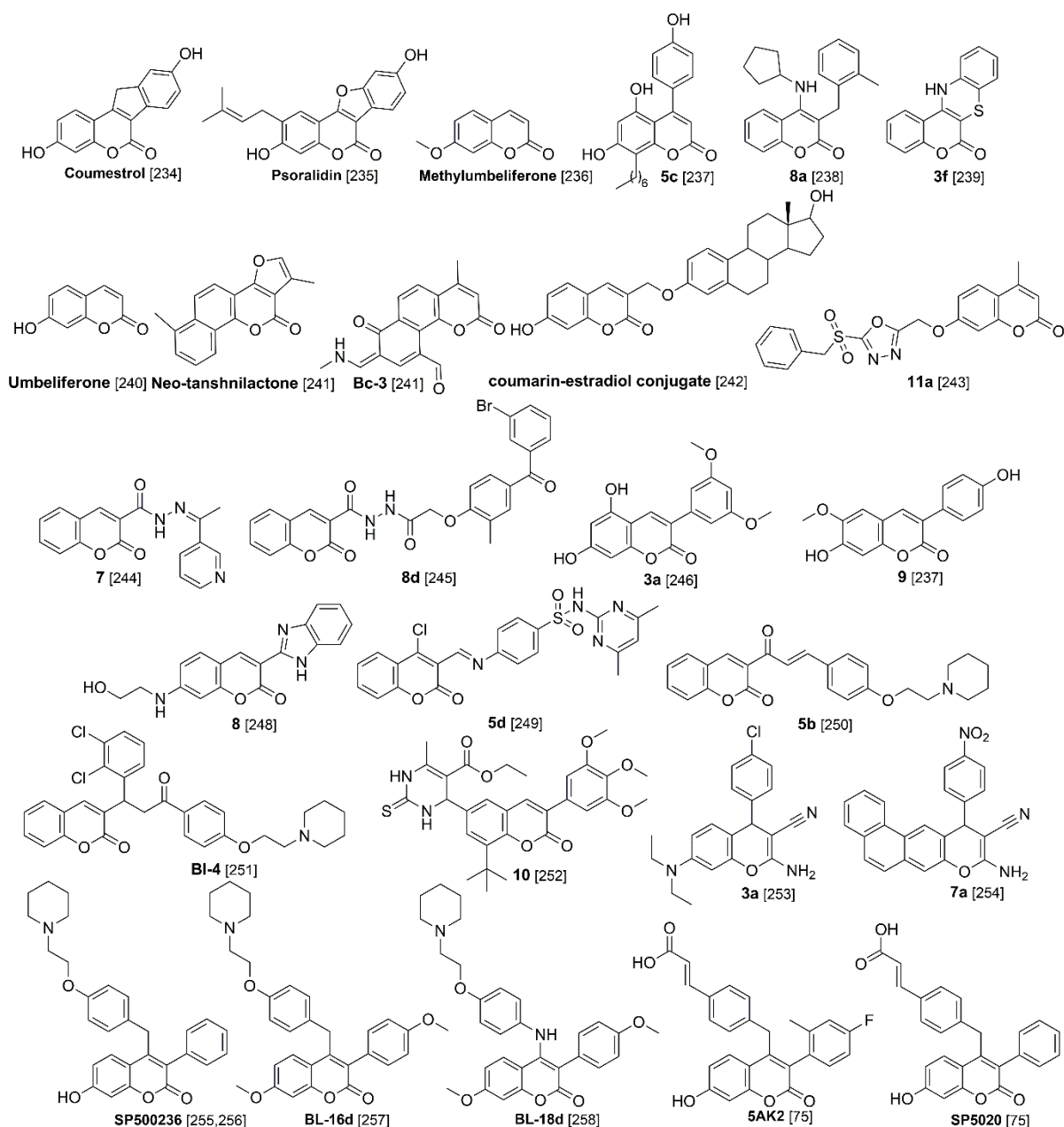
Међу хиљадама развијених једињења којима је приписивана антиестрогена активност, кумаринима и једињењима сличним кумарину посвећена је значајна пажња током откривања нових лекова против рака дојке, између осталог и током израде ове докторске дисертације, нарочито кумаринима са SERM фармакологијом. Биосинтеза кумарина и њихова физиолошка активност је позната [233,234]. Како природни, тако и синтетисани кумарини испитивани су као потенцијални лекови против канцера дојке. Тако, природни кумарини [75,234-236], 4-арил-3,4-дихидрокумарини (тј. неофлаванони) као и (\pm)-8-алкил-5,7-дихидрокси-4-(4-хидроксифенил)-3,4-дихидрокумарини као деривати неофлаванона [237], *N*-супституисани 4-амино-3-(2-метилбензил) кумарини [238] и супституисани бензопиранобензотиазинони [239] у основи су се понашали естрогено. Са друге стране, умбелиферон [240] и неоганшинлактон [241] били су цитостатички агенси против ER α (+) ћелијских линија (односно, MCF-7 ћелијских линија).

Надаље, естрадиол-биокоњугати [241] попут кумарин-17 β -естрадиола [242], кумарин-17-оксимино-естрадиола [242], 8-метоксикумарин-естрогена [242] и кумарина куплованих са 1,3,4-оксадиазолом [243], испољили су ниску до средњу μ M антипролиферативну активност против MCF-7 и MDA-MB-435 (односно ER α (-)) ћелијских линија. Други хибриди, попут хидразидихидразона [244], бензофенон-коњугованих кумарин-3-карбохидразида [245], кумарин-стилбен коњугата [246], хидроксилованих 3-фенилкумарина [247], кумарин-бензимидазола [248], сулфонамид аналога кумарина повезаних имино везом [249], 3-(3-(супституисаних фенил)акрилоил)-2*H*-хромен-2-она [250], 3-(3-оксосупституисаних фенил-3-)-4-(2-(пиперидинил)етокси)фенил)пропил)-2*H*-хромен-2-она [250-251] и 3-фенилкумарина супституисаних на положају C6 монастролом [252], показали су средњу до слабу μ M антипролиферативну активност против MCF-7, T-47D (односно, ER α (+)) или MDA-MB-435 ћелијских линија.

Ниска до nM активност средњег интензитета постигнута је дериватима C4-4-метоксибензо[*d*][1,3]диоксол-хромен карбонитрила [253,254], док се прави напредак у погледу антипролиферације догодио развојем SERM једињења, попут 3-фенил-7-хидроксибензопиранона (тј. 7-хидрокси-2*H*-хромен-2-она) означених као **SP500263** [255,256], **BL-16d** и **BL-18d** (Слика 1) [257], као и 3-арил-4-арилокси-2*H*-хромен-2-она

Увод

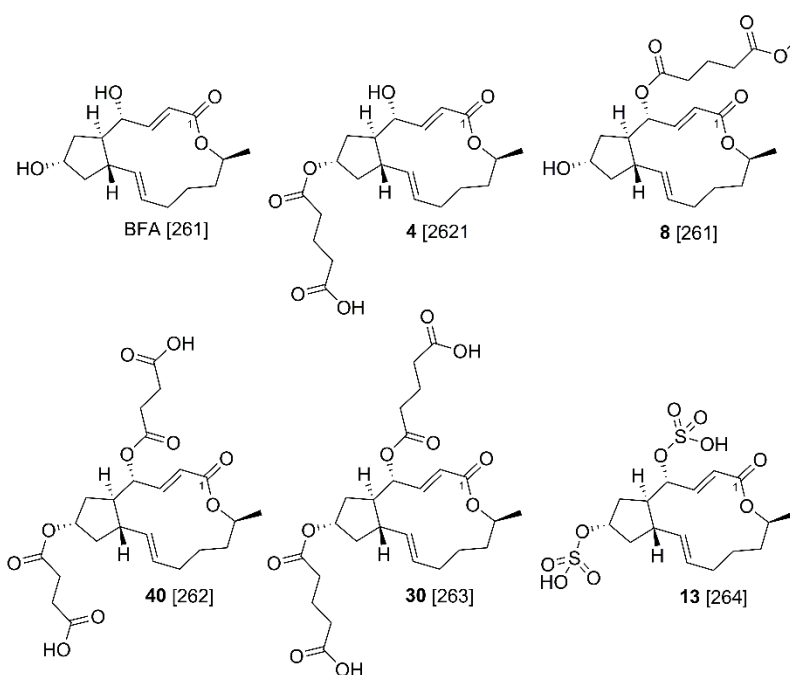
[258] и једињења са SERD фармакологијом, попут деривата оксифенилпропенске киселине са ознаком **5AK2**, комплексираним са E α и доступним на протеинској бази података (PDB) [75], односно **SS5020** (Слика 1.37), који су испољили ниску nM активност против MCF-7 ћелијска линија.



Слика 1.37. Најактивнији естрогени и антиестрогени кумаринског типа према литературним изворима (коришћене су оригиналне ознаке водећих једињења према литературним наводима).

Деривати брефелдина А као модулатори ER α

Иницијално непланирано, али као последица експерименталних резултата (видети даљи текст), деривати брефелдина А (енг. brefeldin A, **BFA**) као модулатори ER α постали су предмет ове докторске дисертације. Претходно публикована антиканцерогена активност **BFA** и његових деривата **BFA** против рака дојке повезана је са способношћу једињења да индукују апоптозу и поремете *cis*-Голгијев апарат [259,260]: C4- и C7-естри **BFA** испољили су nM антипролиферативну активност против MCF-7 ћелијских линија [261], C4-сукцинил или глутарил **BFA** аналози и деривати који су на положају C7 супституисани вишим масним киселинама испољили су активност против MCF-7 ћелијских линија у опсегу nM до μ M опсегу концентрација [262,263], док су аналози **BFA** коњуговани са сулфидом и сулфоксидом такође били потентни против MDA-MC-435 ћелијских линија у сличном опсегу концентрација [264].



Слика 1.38. Најактивнији антиестрогени деривати BFA према литературним изворима (коришћене су оригиналне ознаке водећих једињења према литературним наводима).

QSAR студије естрогене и антиестрогене активности на нивоу ER α

У покушају да се умање или у потпуности неутралишу нежељени ефекти испољени од стране како SERM тако и SERD једињења, експериментални део ове докторске дисертације фокусирао се на свеобухватној анализи парцијалних агониста и антагониста ER α ко-кристализованих како са природним (енг. Wild Type, WT) или

Увод

мутираним (енг. Mutated, MUT) рецепторима [73-95], не би ли се помоћу 3-D QSAR студија дефинисале молекуларне детерминанте неопходне за остваривање лиганд-рецептор интеракција [265]. Као крајњи циљ, модели генерисани на основу структуре молекуларске мете (енг. Structure-Based, SB) и на основу структуре сâмих лиганада (енг. Ligand-Based, LB) пружили су детаљне упуте како дизајнирати још увек не тестиране ER α антагонисте [265].

До сада публиковане изузетно значајне QSAR студије анализирале су потентност деривата естрадиола, 3-кетостероида и неароматских аналога, као и нестероидних једињења: хексетрола и метахекетрола, индена и индона, 2-фенилиндола, бензотиофена, трифенилакрилонитрила и 1,1-дифенилетилена, диетилстилбестрола, трифенилетилена, 2-фенилбензотиофена, фенола и бифенола [266,267].

3-D QSAR студије естрогене и антиестрогене активности на нивоу ER α

Са друге стране, претходно публиковане 3- D QSAR студије углавном су биле ограничене на генерисање CoMFA/CoMSIA LB модела са циљем да изврше корелацију релативних афинитета везивања (енг. Relative Binding Affinity, RBA) унутар тренинг сетова (енг. Trening Set, TR) сачињених од стране SERM и SERD једињења [268-271] попут естрогена, хидрокси-2-(хидроксифенил)индола, ксеноестрогена, хидроксилираних полихлорованих бифенила, фурана, пиразола, дихидробензоксантиина, ксеноестрогена и 2-(4-хидроксифенил)бензо[*b*]тиофен-6-ола. Молекулско доковање као SB приступ, коришћено је за генерисање 6-D QSAR модела који су описали биоактивне конформације различитих ER α лиганда [272].

Иако је *n*-димензионални QSAR приступ коришћен у дефинисању нових ER α лиганда, у овој докторској дисертацији приказани су, према нашим најбољим сазнањима, први резултати базирани на детаљној дескрипцији образаца препознавања лиганада погодних да врше парцијални агонизам или антагонизам у односу на ER α , максимално експлоатишући информације проистекле из структурно неповезаних једињења ко-кристализованих било са WT или MUT ER α рецепторима [73-95,265]. Као резултат опсежне анализе, генерисани су 3-D QSAR модели базирани на структури молекуларске мете, који су заједно са правилима за SB/LB поравнања базираним на консензусу, допринели рационалном дизајну дванаест лиганада деривата кумарина као потенцијалних антагониста ER α , означених као **3DQ-1a** до **3DQ-1e** [265], који су одмах синтетисани и подвргнути исцрпном *in vitro/in vivo* скринингу зарад утврђивања

Докторска дисертација Незрине Куртановић

њиховог антиканцерогеног потенцијала у односу на рак дојке [273]. Сумирајући резултате (видети текст даље), неколико једињења са потенцијалном за патентирање и клиничке студије (енг. leads) означених као **3DQ-4a**, **3DQ-2a**, **3DQ-1a**, **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b** могу се сматрати будућношћу SERM терапије против рака дојке [273].

ComBinE студије естрогене и антиестрогене активности на нивоу ER α

Према најбољим сазнањима аутора ове докторске дисертације, до сада није публикован ни један модел естрогене и антиестрогене активности на нивоу ER α користећи ComBinE методологију [274]. Стога су применом идентичних лиганата ко-кристализованих на нивоу ER α рецептора генерисани ComBinE модели, унапређени одговарајућим правилима за SB/LB поравнање базираним на консензусу који су допринели рационалном дизајну шест нових деривата кумарина као потенцијалних антагониста ER α , означених као **СВЕ-1** до **СВЕ-6**, који су такође одмах синтетисани и подвргнути исцрпном *in vitro/in vivo* скринингу зарад утврђивања њиховог антиканцерогеног потенцијала у односу на рак дојке. Премда резултати још увек нису публиковани, једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** показују потенцијал да буду будућност SERM терапије против рака дојке (видети текст даље).

3-D фармакофорне студије естрогене и антиестрогене активности на нивоу ER α

Дизајн лекова коришћењем рачунарских метода (енг. Computer-aided drug design, CADD) навелико је коришћен у сврху разумевања фармакологије и активности парцијалних агониста ER α , односно једињења са SERM и SERD фармакологијом, нарочито у сегменту развоја хипотеза 3-D фармакофора ER α . Историјски гледано, придата је значајна пажња дефинисању тродимензионалне фармакофоре ER α . У семиналном раду Anstead *et al.*, дат је преглед фармакофорног модела естрадиола изграђеног било на основу структуре самог молекула или на основу биоактивне конформације унутар рецептора [275]: хидроксилна група А-прстена E₂ означена је као дозор водоничне везе (енг. hydrogen-bond donator HBD), док је 17 β -ОН група из D-прстена специфицирана као акцептор водоничне везе (енг. hydrogen-bond acceptor HBA).

Наредни LB 3-D фармакофорни модели (енг. 3-D Pharmacophore models, 3DP) изграђени су на бази природних једињења. Тако је на основу структуре стероидних сапогенина, алкалоида, флавоноида и галактоманана из *Trigonella foenum-graceum*,

Увод

генерисан модел помоћу софтвера LigandScout [276], где је фармакофора поседовала три особине: хидрофобне интеракције (енг. hydrophobic interactions, HI), HBA и HBD, што је било у сагласности са моделом за E₂ [277].

Један од пионирских радова у генерисању 3DP модела против ER α сводио се на анализу 31. једињења доступног из литературе са активностима исказаним као RBA, што је резултовало генерисањем модела помоћу PharmPrint методе [278]: хипотеза са три особине одговарала је оној генерисаној за E₂ и диетилстилбестрол, потврдивши хидроксилну групу А-прстена као HBD, односно 17 β -ОН групу из D-прстена као HBA, док је А прстен препознат као ароматична карактеристика. С друге стране, мосни деривати бицикличног-1,1-диарилетилена третирани су помоћу софтвера Accelrys Discovery Studio [279] Catalyst [280] како би се генерисала хипотеза екстерно валидирана у односу на **Ral**: први фенолни остатак и централни бензенов прстен нотирани су као ароматични прстенови (R), други фенолни остатак окарактерисан је као хидрофобна (P) особина, док је атом кисеоника унутар етаноламина означен као HBA [281]. Следећи модел, изграђен само помоћу деривата арилбензотиофена (на бази **Ral**), такође је развијен помоћу софтвера Accelrys Discovery Studio [279] Catalyst [280], овог пута верификовао је први фенолни остатак као HBD, други бензенов прстен као P, карбонилну функционалну групу као везу између главног језгра и централног бензеновог прстена као HBA липид (енг. HB acceptor-lipid, HBal), те хетероцикл који носи азот као другу P особину [282]. Модел креиран помоћу софтвера Accelrys Discovery Studio [279] Catalyst [280] такође је изведен из групе од 35 естрогенских лиганда, био је састављен од две HBA карактеристике, једне P и једне R [283].

Једињења са SERM фармакологијом доступна из литературе, коришћена су за генерисање хипотезе генерисане помоћу софтвера Accelrys Discovery Studio [279] Catalyst [280], дискутоване на примеру **Ral** као представника тренинг сета: HBA и хидрофобне ароматичне (енг. hydrophobic aromatic, HY1) особине приписане су првом фенолном остатку једињења, HBD и HY2 описале су другу фенолну порцију, док је још једна HY описала централни бензенов прстен [284]. Занимљиво је да ниједна фармакофорна особина није објаснила допринос пиперидинског прстена. Добијени 3DP екстерно је валидиран на метаболитима тетрахидрофурана са ацетогеном структуром изолованим из *Laurencia glandulifera*. Даљи напори били су усмерени на генерисању LB хипотезе из 74 ER α селективних лиганда из литературе [285] помоћу софтвера Accelrys Discovery Studio [279] Catalyst [280] екстерно validirane на генистеин

Докторска дисертација Незрине Куртановић

ко-кристализован унутар **1X7R** комплекса [78]: интеракције фенолног дела генистеина са Н3 Glu353 и Н6 Arg394 препознате су кроз НВА особину, интеракције са Н11 His524 окарактерисане су НВА особином, док су две од три генерисане хидрофобне (енг. Hydrophobic, Hyd) особине покривале главно језгро.

Значајан допринос у разумевању LB 3-D фармакофора за једињења са SERM фармакологијом доступних у литератури дат је када је активност **Ral** објашњена помоћу хипотезе [286] генерисане помоћу софтвера PHASE [287,288]: НBD особине (овде означене само као D) биле су преклопљене са првим фенолним остатком и карбонилном групом, НВА особина (односно A) описала је допринос другог фенола, док су две R особине приписане главном језгру. Хипотеза AARRD коришћена за виртуелно скенирање Asinex 3D gold collection chemical database (Asinex Ltd., 5 Gabrichevskogo, St. Building 8, Moscow 125367, Russia).

Даљи LB 3DP модели генерисани су из серије једињења доступних у литератури, истичући **4-ОНТ** као најактивније једињење из тренинг сета [289]. Тако је најбоља хипотеза, коју је генерисао софтвер Accelrys Discovery Studio [279] Catalyst [280] била састављена од једне НBD особине, преклопљене са фенолном хидроксилном групом једињења, једне R особине поравнате са фенолним бензенским прстеном, једне НВА особине, постављене на атом кисеоника етаноламинског моста, те једне НУ особине која је описала допринос хетероцикла. Хипотеза је екстерно тестирана на структури февикордина-А из *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. Seeds.

Надаље, лиганди ER α из литературе анализирани су од стране Accelrys Discovery Studio [279] Catalyst [280] софтвера да би се добила хипотеза састављена од две НВА и две Нуд особине [290], екстерно потврђена виртуелним скенирањем Available Chemical Directory базе података.

Једињења са SERM фармакологијом преузета са ChEMBL базе података са pIC₅₀ вредностима у распону од 5,0 до 9,7, анализирани су помоћу софтвера PHASE [287,288] како би се добила LB хипотеза тестирана на **4-ОНТ**: А особина поравната је са фенолним остатком једињења, особина позитивног наелектрисања (P) смештена је на атом азота, док су три R особине очекивано биле лоциране на бензеновим прстеновима [291]. Хипотеза APRRR коришћена је за виртуелно скенирање ZINC базе података.

Увод

Даље LB 3DP модели генерисани су из серије 7-тиабицикло[2,2,1]хепт-2-ен-7-оксида, користећи софтвер Accelrys Discovery Studio [279] Catalyst [280], у облику HBD-Hyd-Hyd-Hyd-HBD [292]. Још један LB допринос дат је генерисањем 3DP хипотезе [293] из полибромованих дифенил-етера, помоћу софтвера Accelrys Discovery Studio [279] Catalyst [280] састављеног од две Hyd, две HY и једне HBA особине која је описала естрогенски потенцијал једињења.

Највећи напредак у смислу генерисања 3DP модела [294] из лиганада ко-кристализованих унутар ER α , постигнут је коришћењем лиганада пронађених у **1ERR** [73], **1SJ0** [75], **1XP1** [79], **2IOG** [83], **3ERT** [84], **5FQP** [295] и **6B0F** [296], где је LB хипотеза генерисана помоћу софтвера Accelrys Discovery Studio [279] Catalyst [280]. Ипак, добијена је веома лоша хипотеза са само три особине, HBA-Hyd-Hyd, преклопљена са фенолним остацима и бензенским прстеновима Тамоксифена (**Tam**). Хипотеза је коришћена за виртуелно скенирање ZINC Traditional Chinese Medicine базе података. Још једна LB 3DP хипотеза изведена је из деривата α -мангостина користећи софтвер LigandScout [276] која је садржала једну HBD, једну HBA и једну Hyd особину [297].

Даљи покушаји да се LB 3DP [298] примене на разумевање фармакологије једињења ко-кристализованих унутар ER α извршен је анализом 34 лиганда ER α екстрахованих из PubChem базе података и хипотезом генерисаном помоћу софтвера LigandScout [276] која је описала интеракције лиганда пронађеног у комплексу **1SJ0** [76]: две HBD особине биле су преклопљене са првим фенолним остатком **1SJ0** описујући његову интеракцију са H3 Glu353 и H3 Lee387, једна HBA особина позиционирала се преко другог фенолног остатка описујући интеракције са H11 His524, односно са H11 Gly521, док су преостале три хидрофобне (ароматичне, Ar) карактеристике биле суперимпониране са ароматичним прстеновима. Хипотеза је коришћена за виртуелно скенирање VS асиметричних хексахидро-2H-индазол аналога куркумина (AIACs).

Коначно, један од првих покушаја дефинисања фармакофоре [299] базиране на структури ER α био је коришћењем агониста ко-кристализованих у комплексима **1QLU** [300], **3ERD** [84] и **2P15** [301], где је хипотеза генерисана помоћу Pharmacophore Query Editor модула имплементираног у софтвер MOE [302]. Генерисана хипотеза благо је ревидирала до тада опште прихваћену LB фармакофору за **E2** [275,277] јер је

Докторска дисертација Незрине Куртановић

нагласила: (1) присуство ароматичног прстена А_г (ароматични прстен био је пожељнији од неароматског прстена); (2) присуство функционалних група способних да формирају водоничне везе (ОН групе) на сваком крају молекула (хидроксилна група А прстена, у LB хипотези означена као HBD, била је важнија за активност од 17β-ОН из D прстена, у LB хипотези нотирана као HBA); (3) прецизно растојање (11 Å) између атома хидроксилног кисеоника на положајима C3 и C17; (4) неопходност хидрофобног крутог основног језгра чији су супституенти у виду хидроксилне групе А прстена и 17β-ОН групе D прстена наведене као мешовите HBD/HBA особине.

3DP модел базиран на структури молекулске мете [303] такође је добијен помоћу софтвера LigandScout [276] комбинацијом лиганада ко-кристализованих унутар мутираних ER α , односно из **1UOM** [86], **2JFA** [304] и **4XI3** [305], са лигандима пронађеним у нативном рецептору **1R5K** [74]. Најважнија примена хипотезе била је карактеризација фенолног остатка **1UOM**, **Ral (2JFA)** и **4XI3** окренутог према H3 Glu353 и H6 Arg394 као функционалне групе са HBD (за H3 Glu353) и HBA (за H6 Arg394) особиним, респективно, те означавање фенолног остатка окренутог према H11 His524 као HBA, иако то није потврђено одговарајућом особиним. Сходно очекивањима, ароматични прстенови били су адекватно препознати, док је хетероциклични позитивни наелектрисани азот наглашен као HBD. Хипотеза је коришћена за виртуелно скенирање ZINC базе података.

Из биоактивне конформације **4-ОНТ**, ко-кристализоване унутар **3ERT** [84] комплекса, генерисана је хипотеза помоћу софтвера LigandScout [276] која се састојала од позитивних јонизационих (PI), хидрофобних (HI), HBD и HBA особина [293]. Модел је специфицирао фенолни остатак у интеракцији са H3 Glu353 и H6 Arg394, односно HBD (за H3 Glu353) и HBA (за H6 Arg394). Ароматични прстенови **3ERT** окараактерисани су као HI или особине ароматичног прстена, атом кисеоника етаноламинског моста означен је као HBA током интеракције са H3 Thr347, док је позитивно наелектрисани азот наведен као HBD током интеракције са H3 Asp351. Модел је коришћен за виртуелно скринирање деривата α -мангостина који су углавном окупирали H12. Још два SB 3DP модела генерисаних из **3ERT** коришћена су за виртуелно скенирање 2',4'-дихидрокси-6-метокси-3,5-диметилхалкона [306] и халкона [307] из листова биљке *Eugenia aquea* Burm F. Комплекс **3ERT** био је темплат за SB виртуелно скенирање UNDP, NPACT, FDA и SANDB база података помоћу програма Glide [308-310] из чега је произашао SB 3DP модел са четири фармакофорне

Увод

карактеристике генерисан помоћу софтвера PHASE [287,288], са једном хидрофобном (H) особином, једном A особином и два ароматична прстена (RR), који је ипак био слабо корелиран са структуром активног центра [311]. Значајан напредак постигнут је стварањем хипотезе помоћу Schrödinger's E-Pharmacophore модула [312] изграђене коришћењем лиганада ко-кристализованих унутар Y537S мутираних ER α комплекса, **3UUD** [90], **4ZNV** [313], **4ZNS** [313], **5TLT** [314], **5TM8** [314], **5TN4** [314], **5TN5** [314], **5KCD** [325], **5KCT** [315], **5KD9** [315] и **5DXE** [316]. Генерисана ADRHRD хипотеза, парадоксално је лоше разматрала интеракције лиганада са аминокиселинама из активних центара али је коришћена за дизајн нових 3-ацетил-2*H*-бензо[*g*]хромен-2-она.

У овој докторској дисертацији, сходно напорима да се развију иновативна једињења са SERM фармакологијом, експлоатисана је хемијска информација лиганада ко-кристализованих на нивоу ER α не би ли се генерисали SB 3-D фармакофорни модели против ER α , односно последични 3-D QSAR модели код којих су поља молекулских интеракција израчуната након преклапања атома унутар сâмих лиганада из тренинг сета (енг. atom-based), а не на основу преклапања вредности енергија поља стерних и електростатичких интеракција, односно водоничних веза (енг. field-based) [317]. Генерисани SB 3-D фармакофорни модели, први оваквог типа у смислу генерисања из сета експериментално одређених биоактивних конформација, упоређивани су са претходно публикованим LB and SB 3-D фармакофорним хипотезама [275-316]. Статистички најбоља 3-D фармакофорна хипотеза коришћена је за кампању виртуелног скенирања (енг. virtual screening, VS, што је довело до открића да се из **BFA** могу дизајнирати и синтетисани дванаест нових деривата, **3DPQ-1** до **3DPQ-12**, чија је активност потврђена устаљеним протоколима. Сумирајући резултате (видети текст даље), неколико једињења, **3DPQ-12**, **3DPQ-9**, **3DPQ-3**, **3DPQ-4**, **3DPQ-2** и **3DPQ-1**, могу се сматрати будућношћу SERM-засноване терапије канцера дојке [317].



**Експериментални
део**

2

Колекционирање и припрема кристалних структура ER α

У сврху генерисања тренинг сета (TR) и тест сета (TS_{CRY}) (Табеле 2.1-2.3, [73-94,322-324]) са једињењима чије су биоактивне конформације експериментално одређене, са Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) су октобра 2015. године преузети сви расположиви комплекси ER α (Додатни материјали I, III и IV: Табела ДМ1). Комплекси су потом подвргнути протоколу селекције који је подразумевао одбацавање оних код којих није пронађен ко-кристализовани лиганд, те додатном филтрирању у смислу уклањања оних комплекса за чије ко-кристализоване лиганде није пронађена активност у литератури. Селекција је даље настављена уклањањем дупликата, односно комплекса који су под различитом кодном ознаком садржали идентичне лиганде и различите ниже вредности активности. Тако је естрадиол као лиганд пронађен комплексиран у кристалима са ознаком **1ERE** [73], **1A5A** [318], **1G50** [319] и **1QKU** [320] при чему је задржан само комплекс **1ERE** јер је окарактерисан највишом вредношћу активности. За разлику од кристала који су садржали хормон, оба комплекса са генистеном (**1X7R** [78] и **2QA8** [88]) задржани су унутар TR јер је исти лиганд био комплексиран и унутар природног (**1X7R**, Табела 2.1 [78]) и унутар мутираног (**2QA8**, Табела 2.2 [88]) рецептора. Кристали са ознакама **5AAU** [321] и **5AAV** [321] нису укључени у TR јер су 3-D QSAR модели и SB и LB моделирање већ урађени пре него што су исти депоновани у Protein Data Bank.

Свих 39 селектованих комплекса ER α са парцијалним агонистима, те једињењима са SERM односно SERD фармакологијом (Табеле 2.1-2.3) учитани су у UCSF Chimera v1.10.1 програм [325] и визуелно прегледани. Комплекси су задате идентичне релативне координате преклапањем са **1ERR** као темплатом (као кристалом са најбољом резолуцијом од 1,6 Å) помоћу MatchMaker модула, да би потом ланци хомодимера били раздвојени позивањем split модула са командне линије UCSF Chimera. Након пажљиве инспекције, утврђено је да су сви В ланци били комплетни у смислу присуства лиганада те су они подвргнути даљој оптимизацији. Лиганди екстраховани из В ланаца даље су структурно унапређени додавањем водоникових атома док су Amber параметри Gasteiger-ових наелектрисања израчунати уз помоћ Antechamber модула применом семи-емпиријске QM методе. Протеински остаци сачуваних мономера унапређени су додавањем атома водоника помоћу leap модула Amber 12 пакета [326], након чега је извршена одговарајућа протонација сваке аминокиселине на pH = 7,4 помоћу Antechamber модула. Потом су протеини спојени са

Експериментални део

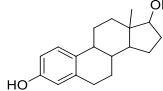
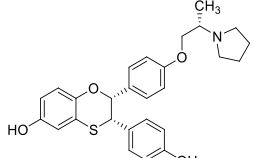
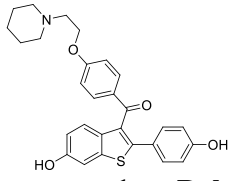
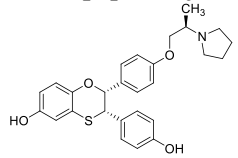
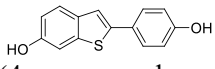
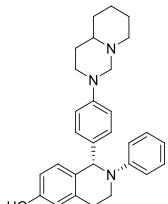
одговарајућим лигандима након чега је извршена енергетска минимизација свих комплекса на следећи начин: солватација је извршена SOLVATEOCT командом при чему је сваки од ензима смештен у просторну решетку димензија 10 Å и окружен ТПЗР моделом молекула воде. Системи су потом неутралисани додатком Na⁺ или Cl⁻ јона и извршена је минимизација енергије применом Sander модула Amber пакета у 1000 корака, при чему је сваки наредни конформер имао најмању могућу енергију у односу на претходни (енг. steepest-descent energy minimization). Други корак у минимизацији система извршен је у 4000 корака при чему су парови конформера који садрже највећу и најмању енергију симултано минимизирани док не добију исту енергију (енг. conjugate-gradient energy minimization). Минимизирани су све функционалне групе које су биле на међусобном растојању мањем од 5 Å. Минимизирани комплексни поново су поравнати (**1ERR** као темплат), након чега је извршена екстракција лиганада у циљу формирања TR и тест сета TSCRY за генерисање SB 3-D QSAR, ComBinE и 3-D фармакофорних модела.

Компилација датасетова

Укратко (Слике 2.1-2.3), сви сачувани и припремљени лиганди надаље су подељени у TR [73-88] и TSCRY [84-94]. Анализа доступних података (Додатни материјали I, III и IV: Табеле ДМ1) открила је хетерогену асоцираност лиганада са вредностима активности у виду pIC₅₀ (-log[IC₅₀]) или pK_i (-log[K_i]), док је само неколицина лиганада била окарактерисана са обе вредности. Како је већи број лиганада био асоциран са pIC₅₀ вредностима, одлучено је да они чине TR (Табеле 2.1 и 2.2). Супротно томе, како би се проценила предиктивна моћ 3-D QSAR, ComBinE и 3-D фармакофорних модела, једињења повезана са pK_i вредностима (укључујући и она са дуалним активностима, односно pK_i и pIC₅₀) формирала су TSCRY (Табела 2.3). Моделирани тест сетови такође су формирану употребом лиганада ER α из литературе груписаних према pIC₅₀ (TSMOD₁, Додатни материјал I: Табеле ДМ38-ДМ39, Додатни материјал III: Табеле ДМ12, ДМ13, ДМ20, ДМ21, Додатни материјал IV: Табеле ДМ7, ДМ8 [327-329]), pK_i (TSMOD₂, Додатни материјал I: Табеле ДМ40-ДМ41, Додатни материјал III: Табеле ДМ14, ДМ15, ДМ22, ДМ23, Додатни материјал IV: Табеле ДМ9-ДМ10, 28 једињења [330-333]) и pRBA (TSMOD₃, Додатни материјал I: Табеле ДМ42-ДМ43, Додатни материјал III: Табеле ДМ16, ДМ17, ДМ24, ДМ25, Додатни материјал IV: Табеле ДМ11-ДМ12, 46 једињења [333-335]).

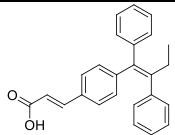
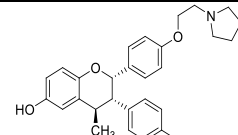
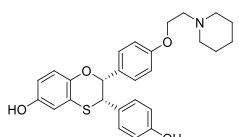
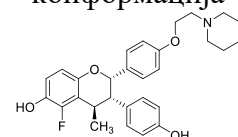
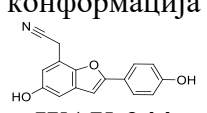
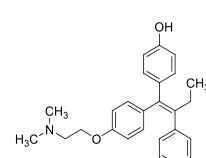
Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 2.1. PDB кодови и структуре лиганда ER α природног типа (енг. wild type, WT) комплексираних са парцијалним агонистима, односно једињењима са SERM и SERD фармакологијом (комплекси коришћени у TR).

PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	IC ₅₀ (nM) pIC ₅₀	Реф.	PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	IC ₅₀ (nM) pIC ₅₀	Реф.
1ERE	 17 β -естрадиол, E ₂ 13-метил- 7,8,9,11,12,13,14,15,16,17- декахидро-6H- циклопента[а]фенантрен- 3,17-диол парцијални агонист H12: затворена конформација	0,54 9,24	73	1XP9	 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-(4- хидроксифенил)-2-(4- {[(2 <i>S</i>)-2-пиролидин-1- илпропил]окси}фенил)- 2,3-дихидро-1,4- бензоксантиин-6-ол SERM H12: отворена конформација	1,29 8,89	79
1ERR	 ралоксифен, Ral (6-хидрокси-2-(4- хидроксифенил)бензо[<i>b</i>] тиофен-3-ил)(4-(2- (пиперидин-1- ил)етокси)фенил)метанон SERM H12: отворена конформација	0,30 9,52	73	1XPC	 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-(4- хидроксифенил)-2-(4- {[(2 <i>R</i>)-2-пиролидин-1- илпропил]окси}фенил)- 2,3-дихидро-1,4- бензоксантиин-6-ол SERM H12: отворена конформација	1,7 8,77	79
1GWQ	 2-(4-хидроксифенил) бензо[<i>b</i>] тиофен-6-ол парцијални агонист H12: затворена конформација	1410 5,85	75	1XQC	 (1 <i>S</i>)-1-{4-[(9 <i>AR</i>)- октахидро-2 <i>H</i> - пиридо[1,2- <i>a</i>]пиразин-2- ил]фенил}-2-фенил- 1,2,3,4- тетрахидрохинолин-6-ол SERM H12: отворена конформација	63 7,20	80

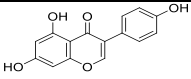
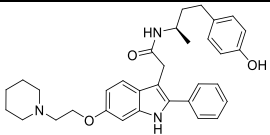
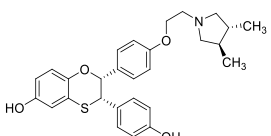
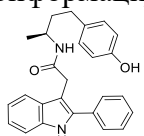
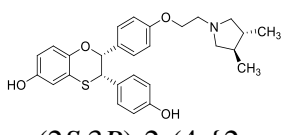
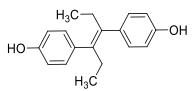
Експериментални део

Табела 2.1. Наставак.

PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	IC ₅₀ (nM) pIC ₅₀	Реф.	PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	IC ₅₀ (nM) pIC ₅₀	Реф.
1R5K	 <p>GW-5638 (2E)-3-{4-[(1E)-1,2-дифенилбут-1-енил]фенил}акрилна киселина SERD H12: отворена конформација</p>	39 7,40	74	1YIM	 <p>(2R,3R,4S)-3-(4-хидроксифенил)-4-метил-2-[4-(2-пирролидин-1-илетокси)фенил]хроман-6-ол SERM H12: отворена конформација</p>	1,57 8,80	81
1SJO	 <p>(2S,3R)-2-(4-(2-(пиперидин-1-ил)етокси)фенил)-2,3-дихидро-3-(4-хидроксифенил)бензо[b][1,4]оксантиин-6-ол SERM H12: отворена конформација</p>	0,8 9,09	76	1YIN	 <p>(2R,3R,4S)-5-флуоро-3-(4-хидроксифенил)-4-метил-2-[4-(2-пиперидин-1-илетокси)фенил]хроман-6-ол SERM H12: отворена конформација</p>	1,40 8,85	81
1X7E	 <p>WAY-244 [5-хидрокси-2-(4-хидроксифенил)-1-бензофуран-7-ил]ацетонитрил парцијални агонист H12: затворена конформација</p>	1152 5,94	77	2BJ4	 <p>4-OHT (Z)-4-(1-(4-(2-(диметиламино)етокси)фенил)-2-фенилбут-1-ен-1-ил)фенол SERM H12: отворена конформација</p>	3 8,52	82

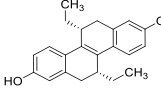
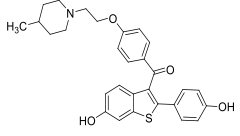
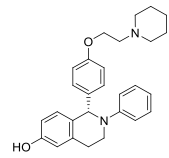
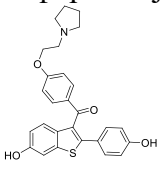
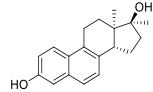
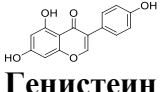
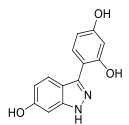
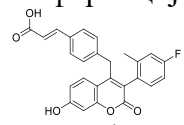
Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 2.1. Наставак.

PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	IC ₅₀ (nM) pIC ₅₀	Реф.	PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	IC ₅₀ (nM) pIC ₅₀	Реф.
1X7R	 <p>генистеин 5,7-дихидрокси-3-(4-хидроксифенил)-4H-хромен-4-он парцијални агонист H12: затворена конформација</p>	9,7 8,01	78	2IOG	 <p><i>N</i>-[(1<i>R</i>)-3-(4-хидроксифенил)-1-метилпропил]-2-[2-фенил-6-(2-пиперидин-1-илетокси)-1<i>H</i>-индол-3-ил]ацетамид SERM H12: отворена конформација</p>	8 8,09	83
1XP1	 <p>(2<i>S</i>,3<i>R</i>)-2-(4-{2-[(3<i>R</i>,4<i>R</i>)-3,4-диметилпиролидин-1-ил]етокси}фенил)-3-(4-хидроксифенил)-2,3-дихидро-1,4-бензоксантиин-6-ол SERM H12: отворена конформација</p>	0,5 9,30	79	2IOK	 <p><i>N</i>-[(1<i>R</i>)-3-(хидроксифенил)-1-метилпропил]-2-(2-фенил-1<i>H</i>-индол-3-ил)ацетамид SERM H12: отворена конформација</p>	1 9,00	83
1XP6	 <p>(2<i>S</i>,3<i>R</i>)-2-(4-{2-[(3<i>S</i>,4<i>S</i>)-3,4-диметилпиролидин-1-ил]етокси}фенил)-3-(4-хидроксифенил)-2,3-дихидро-1,4-бензоксантиин-6-ол SERM H12: отворена конформација</p>	0,4 9,40	79	3ERD	 <p>диетилстилбестрол (<i>E</i>)-4,4'-(хекс-3-ене-3,4-диил)дифенол парцијални агонист H12: затворена конформација</p>	0,33 9,48	84

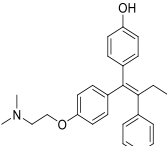
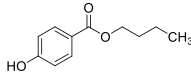
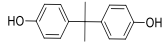
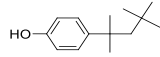
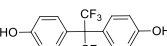
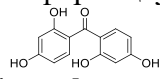
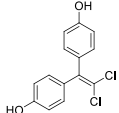
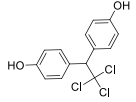
Експериментални део

Табела 2.2. PDB кодови и структуре лиганда ER α мутираног типа (енг. mutated, MUT) комплексираних са парцијалним агонистима, односно једињењима са SERM и SERD фармакологијом (комплекси коришћени у TR).

PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	IC ₅₀ (nM) pIC ₅₀	Реф.	PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	IC ₅₀ (nM) pIC ₅₀	Реф.
1L2I	 (<i>R,R</i>)-5,11- <i>cis</i> - диетил-5,6,11,12- тетрахидрохризен- 2,8-диол парцијални агонист H12: затворена конформација	2,99 8,52	85	2R6W	 [6-хидрокси-2-(4- хидроксифенил)-1-бензотиен-3- ил]{4-[2-(4-метилпиперидин-1- ил)етоксифенил]фенил}метанон SERM H12: отворена конформација	2,5 8,60	89
1UOM	 2-фенил-1-[4-(2- пиперидин-1-ил- етокси)-фенил]- 1,2,3,4-тетрахидро- изохинолин-6-ол SERM H12: отворена конформација	16,48 7,78	86	2R6Y	 [6-хидрокси-2-(4- хидроксифенил)-1-бензотиен-3- ил][4-(2-пиролидин-1- илетокси)фенил]метанон SERM H12: отворена конформација	1,27 8,90	89
2B1Z	 17-CH ₃ -17 α - дихидроеквиленин парцијални агонист H12: затворена конформација	79 7,10	87	2QA8	 Генистеин 5,7-дихидрокси-3-(4- хидроксифенил)-4 <i>H</i> -хромен-4- он парцијални агонист H12: затворена конформација	9,7 8,01	88
2QA6	 4-(6-хидрокси-1 <i>H</i> - индазол-3- ил)бензен-1,3-диол парцијални агонист H12: затворена конформација	48 7,32	88	5AK2	 (<i>E</i>)-3-[4-[[3-(4-флуоранил-2- метил-фенил)-7-оксиданил-2- оксиданилиден-хромен-4- ил]метил]фенил]проп-2- еноична киселина SERD H12: отворена конформација	3,80 8,42	75

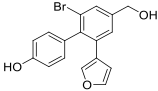
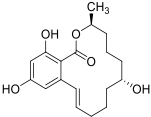
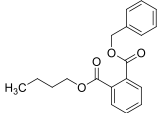
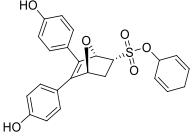
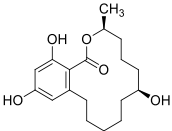
Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 2.3. PDB кодови и структуре лиганда ER α природног типа (енг. wild type, WT) и мутираног типа (енг. mutated, MUT) (класификација назначена испод кода) комплексираних са парцијалним агонистима, односно једињењима са SERM и SERD фармакологијом (комплекси коришћени у TS_{CRY}).

PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	K_i (nM) pK_i	Реф.	PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	K_i (nM) pK_i	Реф.
3ERT (WT)	 4-хидрокситамоксифен (Z)-4-(1-(4-(2-(диметиламино)етокси)фенил)-2-фенилбут-1-ен-1-ил)фенол SERM H12: отворена конформација	0,25 9,60	84	4MG9 (MUT)	 бутилпарабен бутил 4-хидроксibenзоат парцијални агонист H12: затворена конформација	1000 6,00	92
3UU7 (MUT)	 бисфенол-А 4,4'-(пропан-2,2-диил)дифенол парцијални агонист H12: затворена конформација	1,62 8,79	90	4MGA (MUT)	 4-tert-октилфенол 4-(2,4,4-триметилпентан-2-ил)фенол парцијални агонист H12: затворена конформација	1000 6,00	92
3UUA (MUT)	 бисфенол-АФ 4,4'-(перфлуоропропан-2,2-диил)дифенол парцијални агонист H12: затворена конформација	1,62 8,79	90	4MGC (MUT)	 бензофенон-2 bis-(2,4-дихидроксифенил)метанон парцијални агонист H12: затворена конформација	100 7,00	92
3UUC (WT)	 бисфенол-С 4,4'-(2,2-дихлороетен-1,1-диил)дифенол парцијални агонист H12: затворена конформација	1990 5,70	89	4MGD (MUT)	 HPTE 4,4'-(2,2,2-трихлоретан-1,1-диил)дифенол парцијални агонист H12: затворена конформација	1000 6,00	92

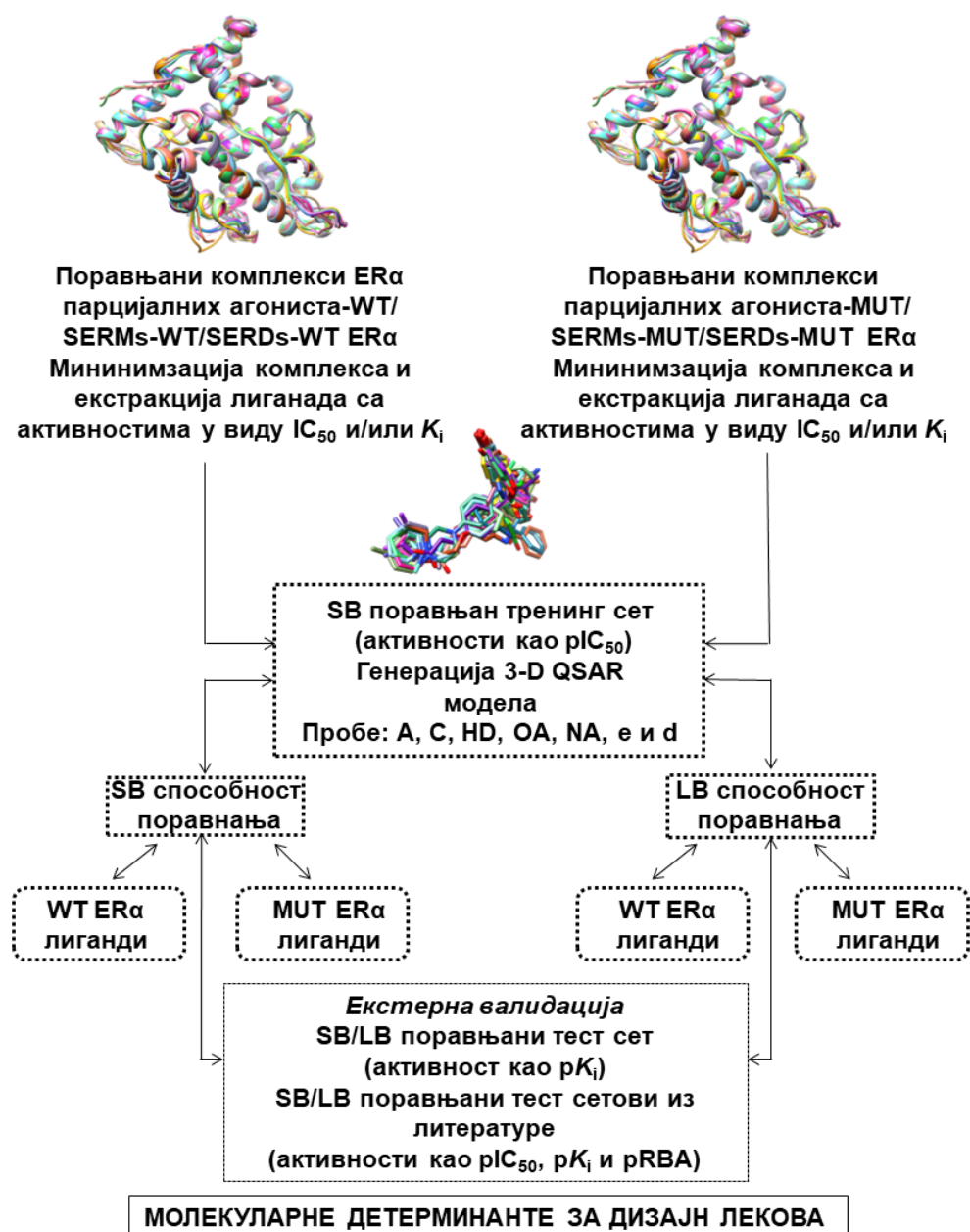
Експериментални део

Табела 2.3. Наставак.

PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	K_i (nM) pK_i	Реф.	PDB	Структура лиганда, тривијално име, номенклатура и фармакологија	K_i (nM) pK_i	Реф.
4DMA (WT)	 <p>RU100132 2'-бромо-6'-(фуран-3-ил)-4'-(хидроксиметил)бифенил-4-ол парцијални агонист Н12: затворена конформација</p>	2511 5,60	91	4TUZ (MUT)	 <p>α-зеараланон (3<i>S</i>,7<i>R</i>)-7,14,16-трихидрокси-3-метил-3,4,5,6,7,8,9,10,11,12-декахидро-1<i>H</i>-бензо[с][1]оксациклотетрадецин-1-он парцијални агонист Н12: затворена конформација</p>	0.1 10,00	93
4MG6 (MUT)	 <p>бензил бутил бензен-1,2-дикарбоксилат парцијални агонист Н12: затворена конформација</p>	1000 6,00	92	4ZN9 (MUT)	 <p>октабицикло хептен сулфонат (OBHS) циклохекса-2,5-диен-1-ил (1<i>S</i>,2<i>R</i>,4<i>S</i>)-5,6-<i>bis</i>(4-хидроксифенил)-7-оксабицикло[2.2.1]хепт-5-ен-2-сулфонат парцијални агонист Н12: затворена конформација</p>	0.25 9,60	94
4MG8 (MUT)	 <p>β-зеараланон (3<i>S</i>,7<i>S</i>)-7,14,16-трихидрокси-3-метил-3,4,5,6,7,8,9,10,11,12-декахидро-1<i>H</i>-бензо[с][1]оксациклотетрадецин-1-он парцијални агонист Н12: затворена конформација</p>	0.1 10,00	92				

Генерисање 3-D QSAR студија заснованих на пољима молекулских интеракција употребом 3-D QSAutogrid/R методологије

Протокол [336] који је коришћен за генерисање 3-D QSAR студија употребом 3-D QSAutogrid/R методологије [337] приказан је на Слици 3.1. Сви прорачуни извршени су на кластеру са 6 нодова (8 Intel-Xeon E5520 2,27 GHz CPU и 24 GB DDR3 RAM сваки) са укупно 48 CPU који је био покретан од стране Debian GNU/Linux “Wheezy” 7.5 64-битног оперативног система.



Слика 3.1. Генерална процедура за дефинисање 3-D QSAR модела употребом 3-D QSAutogrid/R методологије и њихову анализу.

Експериментални део

Оптимизација тродимензионалне просторне решетке и израчунавање поља молекулских интеракција (енг. molecular interaction fields, MIF)

Тренинг сет учитан је у Python верзију 3-D QSAutoGrid/R алата [337], названу Py_3-D QSAR. За свако од једињења унутар TR израчунато је MIF помоћу софтвера AutoGrid (AutoDock Suite [338], заснованом на AMBER-овом UNITED ATOM пољу сила), узимајући у обзир 8 различитих проба (Додатни материјал I: Табела ДМ2). XYZ координате (у Å) кубоидне решетке, која је коришћена за рачунање MIF, биле су $X_{\min}/X_{\max} = 90,000/116,000$, $Y_{\min}/Y_{\max} = 13,000/26,000$, $Z_{\min}/Z_{\max} = 84,000/110,000$, како би се обухватио простор око свих минимизираних лиганда у распону од 10 Å у све три димензије. Тродимензионални (3-D) QSAR модели генерисани су за сваку пробу, користећи максимално 5 принципијелних компоненти. Почетни модели, дефинисани су помоћу стандардних подешавања, са растојањем тачака унутар просторне решетке (енг. grid spacing) од 1 Å, максималним и минималним вредностима енергија стерних и електростатичких интеракција, односно водоничних веза (енг. Cutoff) од ± 5 Kcal/mol, нулирањем (енг. Zeroing) од 0,01 Kcal/mol и минималном стандардном девијацијом (енг. MinStd) од 0,05. Потом је за сваку пробу извршена даља оптимизација селекцијом најбољег растојања између тачака просторне решетке систематском варијацијом истог у интервалу од 0,5 до 2,5 Å, са кораком повећања растојања од 0,05 Å (Додатни материјал I: Табеле ДМ3-ДМ9) истовремено чувајући одговарајуће вредности коефицијената корелација стандардних (r^2) и унакрсних (q^2) валидација.

Статистичка анализа

Након дефинисања одговарајућег растојања између тачака унутар тродимензионалне просторне решетке за сваку од проба, извршен је пред-третман вредности енергија поља на свакој од тачака решетке помоћу VPO (енг. variable pretreatment optimization) анализе, користећи leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO, одстрањивањем 5 једињења односно насумичних група енергија у 100 понављања) унакрсну валидацију, у исто време пратећи q^2 вредности, стандардну девијацију прорачуна (енг. standard deviation of calculation, SDEC) и стандардну девијацију грешке предвиђања (енг. standard deviation of prediction, SDEP) (Додатни материјал I: Табеле ДМ10-ДМ16). Потпуни пред-третман вредности енергија унутар MIF спроведен је истраживањем комбинација вредности енергија у интервалу од -5 до

Докторска дисертација Незрине Куртановић

5 Kcal/mol са интервалима између вредности енергија једнаким 1, вредностима нулирања у интервалу од -0,005 до 0,05 Kcal/mol са кораком од 0,005, те вредностима стандардне девијације од -0,01 до 0,1 са инкрементом од 0,01. Најбољи VPO модели за сваку од проба коначно су оптимизовани у смислу селекција вредности преосталих енергија унутар MIF применом алгоритма симулираног хлађења (енг. Simulated Annealing, SA) користећи следеће параметре: почетна температура 100°C, коначна температура 1×10^{-3} °C и фактор хлађења 0,999 (Табела 4, Додатни материјал I: Табеле ДМ17-ДМ23). Одсуство случајне корелације код модела потврђено је Y-мешањем (енг. Y-Scrambling, Y-S) у 100 итерација. Добијени статистички резултати потврдили су како интерне могућности предвиђања, тако и робусност модела (Додатни материјал I: Табеле ДМ24-ДМ37) и њихову подобност да буду коришћени као 3- D QSAR модели.

Интерпретација 3-D QSAR модела

По добијању нумеричке дефиниције модела, завршна фаза генерисања било којег 3-D QSAR модела је његова графичка репрезентација и интерпретација резултата. Тумачење модела добијених 3-D QSAutogrid/R процедуром своди се на преклапање *PLS-коэффицијената*, који глобално карактеришу 3-D QSAR модел, са мапама стварних доприноса активности (енг. actual activity contribution, AAC), које описују биопотенцијал сваког једињења тренинг сета индивидуално. Укратко, преклапање позитивних *PLS-коэффицијената* добијених из пробе ($P_{PLS-коэффицијенти}$, црвени полиедри) са позитивним AAC са мапама лиганда (L_{AAC} , зелене контуре) изведеним из исте пробе, као и преклапање негативних $P_{PLS-коэффицијената}$ (плави региони) са негативним L_{AAC} (жуте мапе) указује на повољан допринос активности дела молекула (функционалне групе или угљеничног скелета) преко кога је дошло до преклапања одговарајућих мапа. Допринос на активност је негативан уколико је одређени део молекула окарактерисан преклапањем позитивних $P_{PLS-коэффицијената}$ и негативних A_{AAC} мапа и обрнуто.

Било који 3-D QSAR модел генерисан је да би се успоставила корелација сваке од функционалних група једињења са биолошком активношћу. Међуоднос се дефинише било интеракцијом одређеног дела молекула са одговарајућом аминокиселином унутар активног центра (SB приступ) или преклапањем молекула са фрагментима који постоје у различитим структурним обрасцима (LB приступ). Активност тренинг сета се корелира са сумом производа *PLS-коэффицијената* и вредности енергија MIF, као и са стварним пољима (односно стварним доприносом активности

Експериментални део

AAC као скаларним производом *PLS*-коэффицијента и просечне вредности енергија MIF: *PLS*-коэффицијенти x средње вредности MIF) па се процедура своди на класичне QSAR моделе (једначине 1а и 1б):

$$Y = C_1X_1 + C_2X_2 + \dots + C_nX_n \quad (1a)$$

$$Y = AAC_1 + AAC_2 + \dots + AAC_n \quad (1б)$$

где C_n представља C_{PLS} -коэффицијент за одређену пробу (у интерпретацији 3-D QSAR модела означено са P_{PLS} -коэффицијент) на n -тој тачки тродимензионалне просторне решетке, X_n је вредност енергије поља молекулских интеракција (MIF), AAC_n је стварни допринос активности за одређени лиганд и одређену пробу у оквиру тренинг сета на n -тој тачки просторне решетке (у интерпретацији 3-D QSAR модела означено са A_{AAC}), Y је биолошка активност, док n је број тачака унутар просторне решетке [324,325].

Примењујући претходно описани поступак на ко-кристализоване лиганде унутар тренинг сета, биофизички рационале модела може се добити позиционирањем лиганда и аминокиселина у односу на 3-D QSAR *PLS*-коэффицијенте како би се добио увид у функционалне групе молекула способне за интеракцију са пробом, идентификовале регије од значаја у оквиру активног центра и интерпретирале структурне детерминанте неопходне за активност лиганда. Према једначини 1а, *PLS*-коэффицијенти омогућавају како интерпретацију података релевантних за тренинг сет (објашњавајући релативни утицај сваке тачке унутар тродимензионалне просторне решетке помоћу величине и знака) тако и предвиђање биолошке активности молекула унутар тест сета. Стога је активност сваког лиганда ко-кристализованог са ER α интерпретирана на основу просторног преклапања генерисаних *PLS*-коэффицијента (C) и израчунатих MIF (X) у регионима који окружују и прекривају како једињења тренинг сета тако и активни центар ER α . Повезивање највећих одступања *PLS*-коэффицијента и поља молекулских интеракција помаже у идентификовању оних региона који најбоље корелирају са променом активности. И вредности *PLS*-коэффицијента и вредности енергија MIF могу бити позитивне и негативне, па је основна премиса генерисаног 3-D QSAR протокола да се особине молекула које повећавају или умањују активност добијају множењем *PLS*-коэффицијента и вредности поља. Дакле, интеракција позитивног (одбојног) поља у региону окарактерисаном са позитивним *PLS*-коэффицијентима (црвени полиедар), као и негативног (привлачног) поља са негативним *PLS*-коэффицијентима (плави регион)

Докторска дисертација Незрине Куртановић

произвешће позитиван ефекат на активност, будући да $(C_n \times X_n)$ или $(-C_n \times -X_n)$ дају позитиван производ. Супротно томе, активност би се смањила уколико дође до преклапања између позитивног *PLS-коэффицијента* и негативног MIF $(C_n \times -X_n)$ и обрнуто $(-C_n \times X_n)$.

Док мапе *PLS-коэффицијената* представљају 3-D QSAR модел глобално, AAC поља указују на тродимензионално представљен профил активности једињења са поновно израчунатом (тренинг сет) или предвиђеном (тест сет) активношћу сваког од разматраних молекула (припадника тренинг сета или тест сета). AAC се могу преклопити са мапама коэффициентјената и њихова кохерентност или разилажење у смислу знакова преклопљених *PPLS-коэффицијената* и L_{AAC} могу нагласити повољан или неповољан утицај функционалне групе на одређеном положају молекула. На приказаним сликама преклапање позитивних L_{AAC} (зелене мапе) са позитивним *PPLS-коэффицијентима* (црвени полиедри), као и негативних L_{AAC} (жуте контуре) са негативним *PPLS-коэффицијентима* (плаве регије) указује на повољан ефекат суперпонираног дела молекула (функционална група или угљенични скелет) на активност. Фрагмент молекула негативно утиче на активност у случају преклапања између позитивних *PPLS-коэффицијентима* и негативног L_{AAC} (и обрнуто).

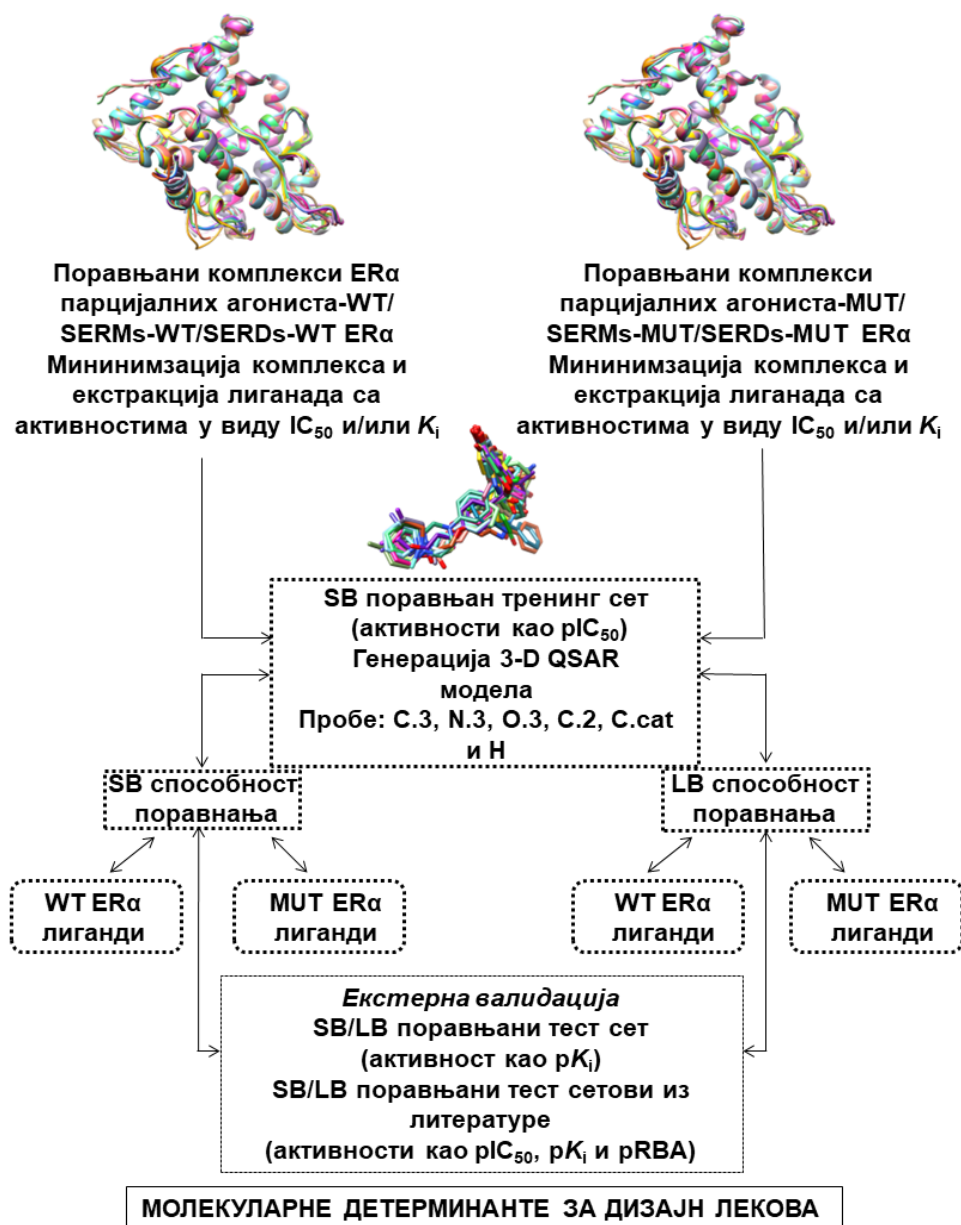
Генерисање 3-D QSAR студија заснованих на пољима молекулских интеракција употребом Py-CoMFA методологије

Слични протоколи коришћени су за генерисање 3-D QSAR студија употребом Py-CoMFA методологије [339,340], користећи ресурсе доступне на порталу www.3d-qsar.com и апликацију Py-CoMFA.

Израчунавање поља молекулских интеракција (енг. molecular interaction fields, MIF)

Тренинг сет учитан је у Py-CoMFA апликацију на порталу www.3d-qsar.com. За свако од једињења унутар TR израчунато је MIF засновано на Sybyl TRIPOS пољу сила), узимајући у обзир 6 различитих проба (Додатни материјал II: Табела ДМ2). 3-D QSAR модели генерисани су за сваку пробу, користећи максимално 8 принципијелних компоненти. У сврху генерисања 3-D QSAR модела, Py-CoMFA web апликација генерисала је за сваку пробу три модела са различитим комбинацијама MIF: само електростатичке интеракције (енг. electrostatic, ELE), само стерне интеракције (енг. steric, STE), те комбинација ELE и STE (енг. BOTH).

Експериментални део



Слика 3.2. Генерална процедура за дефинисање 3-D QSAR модела употребом Ru-CoMFA методологије и њихову анализу.

Статистичка анализа

За сваку пробу најпре су генерисани сирови модели помоћу основних подешавања: растојање између тачака просторне решетке (енг. grid spacing, GS) од 2 Å, додати простор од краја просторне решетке не би ли се обухватиле све интеракције око лиганда (енг. grid extension, GE) од 5 Å, вредност диелектричне константе (енг. dielectric constant, ϵ) од 8, вредности максималних и минималних CutOff од ± 30 Kcal/mol, те вредност стандардне девијације (енг. minimum sigma, δ) од 2 (Додатни

Докторска дисертација Незрине Куртановић

материјал III: Табела ДМ3). Затим је за сваку од проба генерисано 100 модела применом насумичне VPO анализе (Додатни материјал III: Табеле ДМ4-ДМ9), користећи LOO и LSO унакрсну валидацију, варијацијом свих параметара предтретмана: GS у интервалу од 1 до 3,6 Å са интервалом од 1 Å, GE у интервалу од 1 до 5 11 Å са интервалом од 1 Å, ϵ од 0 до 81 са интервалом од 1, CutOff од ± 1 од ± 31 Kcal/mol, са интервалом од 1 Kcal/mol, δ од 0,1 до 1,1 са интервалом од 0,1, истовремено чувајући одговарајуће вредности r^2 и q^2 коефицијената. Финални 3-D QSAR модели (Табела 3.12, Сlike 3.18-3.20, Додатни материјал III: Сlike ДМ1-ДМ3), добијени су SA оптимизацијом користећи следеће параметре: почетна температура 100°C, коначна температура 1×10^{-3} °C и фактор хлађења 0,999. Одсуство случајне корелације код модела потврђено је помоћу Y-S у 100 итерација. Током процеса, робусност статистички најбољег модела (Додатни материјал III: Табеле ДМ10-ДМ11) интерно је валидирана применом LOO и LSO CV (Слика 3.18) [336].

Интерпретација 3-D QSAR модела

Интерпретација дефинисаних модела спроведена је путем глобалних L_{AAC} мапа, (Сlike 3.19, 3.20 и Додатни материјал III: Сlike ДМ1-ДМ5), односно скаларних производа индивидуалних MIF вредности и P_{PLS} -коефицијената, тј. позитивних/негативних стерних или електростатичких региона око молекула, у виду полиhedрона, који су директно повезани са асоцираним биолошким одговорима.

Генерисање COMBINEr модела употребом Py-ComBinE методологије

Упоредна анализа молекуларних везивних енергија (енг. comparative binding energy, COMBINE) јесте SB 3-D QSAR метода која користи серију лиганд-рецептор комплекса да би квантификовала енергије интеракције молекулском механиком [274]. Фундаментална идеја COMBINE анализе јесте да једноставна експресија за разлику у афинитету везивања за серију хомологих лиганд-рецептор комплекса може да се генерише помоћу мултиваријатне статистике у смислу корелације експерименталних података афинитета везивања са вредностима лиганд-аминокиселина интеракција израчунатих из 3-D структура. Основа COMBINE методологије јесте претпоставка да слободна енергија везивања лиганда за рецептор, ΔG , може бити апроксимирана као сума n доприноса дефинисана тежинским коефицијентима, ΔU , од којих сваки

Експериментални део

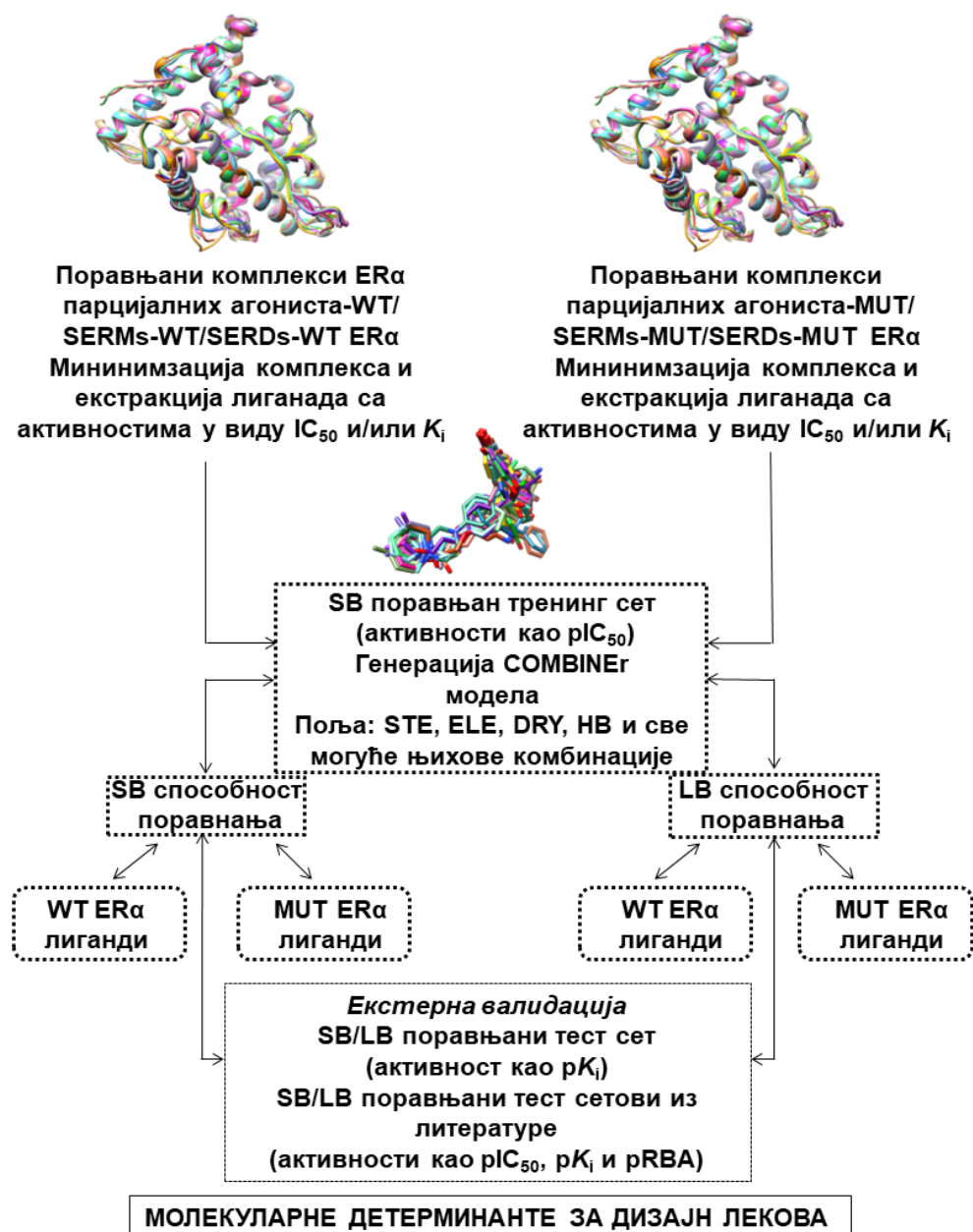
допринос описује промену особине и након везивања, што се може исказати једначином 2:

$$\Delta G = \sum_{i=1}^n w_i \Delta u_i + C \quad (2)$$

Из ове експресије, биолошке активности могу се добити ако се претпостави да су оне линеарне функције ΔG . Експресија се добија анализирајући интеракције сета лиганда са екпериментално познатим афинитетима везивања (или другим вредностима биолошке активности) у односу на циљани рецептор. У овој докторској дисертацији коришћен је модификовани протокол назван COMBINEr [341] (енг. Roman reincarnation of COMBINE) који користи AutoGrid модул софтвера AutoDock [338] зарад израчунавања лиганд-аминокиселина интеракција за сваки лиганд/рецептор комплекс.

Статистичка анализа

Употребом Python верзије COMBINEr имплементиране у Py-ComBinE апликацију доступну на www.3d-qsar.com порталу [339], генерисано је 15 комбинација лиганд/аминокиселина енергетских интеракција: стерне (енг. steric, STE), електростатичке (енг. electrostatic, ELE), десолватационе (енг. desolvation, DRY), водоничне везе (енг. hydrogen bond, HB), као и све могуће комбинације, STE+ELE, STE+DRY, STE+HB, ELE+DRY, ELE+HB, DRY+HB, STE+ELE+DRY, STE+ELE+HB, STE+DRY+HB, ELE+DRY+HB, STE+ELE+DRY+HB. Блок-скалирање комбинованих интеракција вршено је према препорукама Ortiz *et al* [342]. Комбинације које су довеле до модела са највишим статистичким коефицијентима оптимизоване су помоћу SA алгоритма имплементираног у Py-ComBinE апликацију, користећи следеће параметре: почетна температура 100°C, коначна температура 1x10⁻³°C и фактор хлађења 0,999. Током свих израчунавања, LOO и LSO CV, као и Y-S коришћене су за евалуацију робустности модела и потврду одсуства случајне корелације, код су молекули тест сета коришћени за евалуацију предиктивне активности.



Слика 3.3. Генерална процедура за дефинисање COMBINEr модела употребом Ру-ComBinE методологије и њихову анализу.

Интерпретација COMBINEr модела

Графичка анализа Ру-ComBinE модела извршена је помоћу хистограма и графичких информација у форми молекул-аминокиселина доприноса активности (енг. molecule-residue activity contribution, MRAC), који представљају скаларни производ између вредности индивидуалних молекул-аминокиселина интеракција помножених са вредностима *PLS-коэффицијената*, односно просечних молекул-аминокиселина доприноса активности (енг. molecule-residue average activity contribution, MRAAC),

Експериментални део

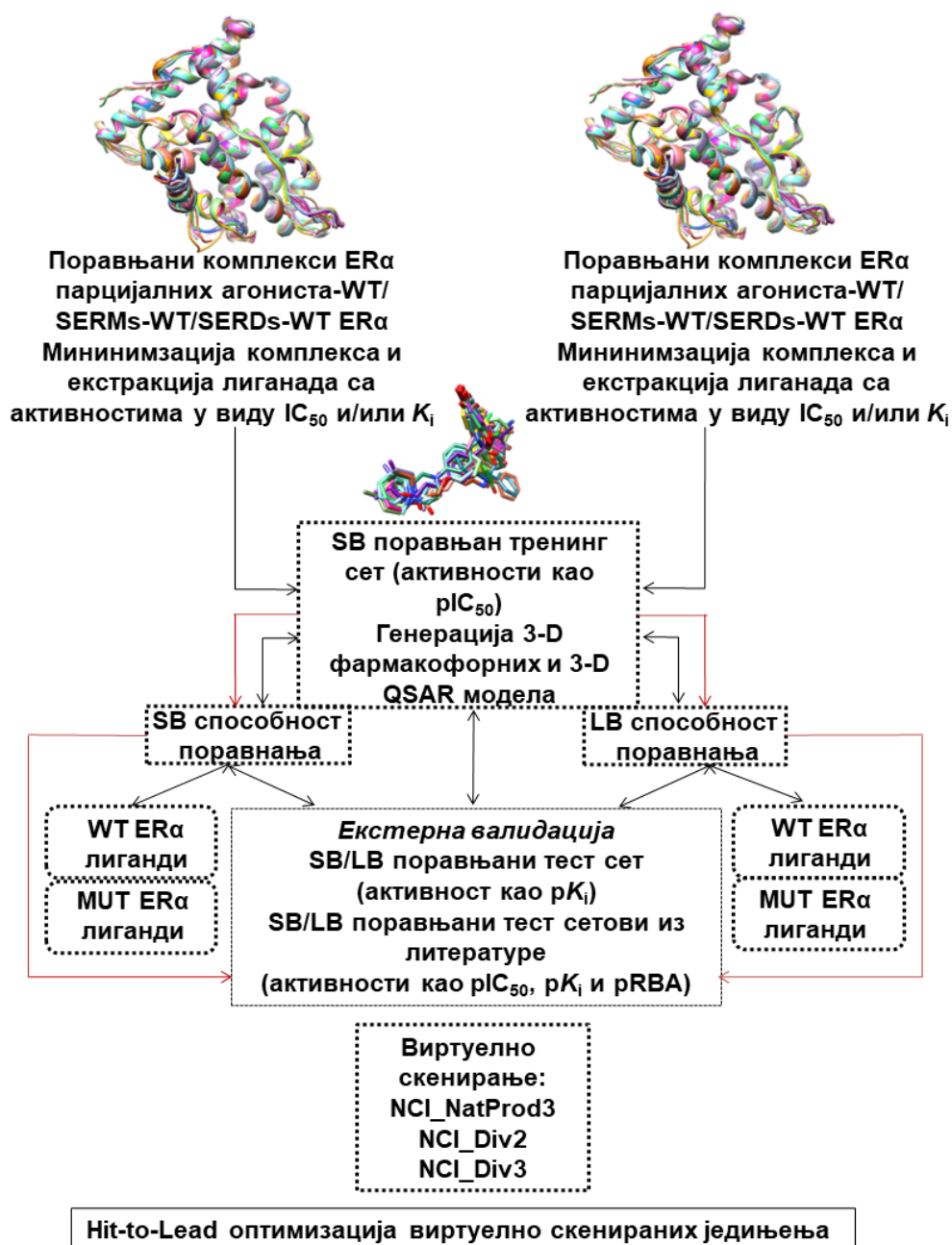
добијених множењем просечних вредности интеракција молекул-аминокиселина (енг. average molecule-residues interactions, AMRIs) са вредностима *PLS-коэффицијената* (COEFs), [343]. Позитивне вредности MRACs и MRAACs директно су корелиране са повољном интеракцијом; супротно томе, негативне вредности корелирају са смањеним биолошким афинитетима.

Генерисање 3-D фармакофорних модела употребом PHASE методологије

Унапред поравњани тренинг сет је подвргнут 3-D фармакофорном и 3-D QSAR моделирању користећи модул „Develop Pharmacophore Hypothesis” програма PHASE [287,288]. Да би се добиле најбоље PHASE хипотезе, асоциране са највишим q^2 вредностима [336], TR молекули класификовани су као „активни” и „инактивни”, користећи IC_{50} вредност од 7,30 као делимитер, сходно основним подешавањима. Током претраге за оптималним хипотезама, све доступне комбинације фармакофорних особина су такође итеративно истражене, након чега су генерисани заједничка фармакофорна хипотеза (енг. common pharmacophore hypothesis, CPH) и 3-D QSAR модели базирани на поравнању атома (најбоље хипотезе приказане су као Додатни материјал IV: Табела ДМ2), узимајући у обзир највећи могући број карактеристика у хипотези, док је пожељан минималан број карактеристика био 4, имајући у виду да је структуре најмање 50% лиганада треба да могу да се преклапају са особинама развијених хипотеза. Генерисане фармакофорне особине међусобно су рангирање користећи уобичајене параметре.

Генерисање 3-D QSAR модела заснованих на поравнању атома

3-D QSAR модели засновани на поравнању атома генерисани су из најбољих CPH. Поменути модели базирани на пројекцији латентних структура, односно методи парцијалних најмањих квадрата (енг. partial least-squares, PLS), генерисани су користећи максималан број од 5 PLS фактора у регресионом моделу и растојањем између тачака просторне решетке једнаким 1 Å. Екстерна валидација предиктивне моћи 3-D QSAR модела извршена је помоћу једињења из тест сетова.



Слика 3.4. Генерална процедура за дефинисање 3-D фармакофорних и 3-D QSAR модела употребом PHASE методологије и њихову анализу.

Генерисање правила за репродукцију биоактивних конформација лиганата ER α

3-D QSAutogrid/R, Py-CoMFA, Py-ComBine и PHASE протоколи екстерно су унапређени правилима за репродукцију биоактивних конформација лиганата ER α у циљу стицања знања како једињења са познатом биолошком активношћу али непознатом биоактивном конформацијом имплементирати у поступке виртуелног скенирања односно дизајна нових антагониста ER α [336]. Тако, да би се стекло знање како дефинисати биоактивну конформацију новог молекула, пажљиво су спроведени

Експериментални део

поступци репродукције биоактивних конформација ко-кристализованих лиганата ER α , у исто време процењујући способност како *open source* и алата бесплатних за академску заједницу тако и комерцијалних решења да изврше SB или LB поравнање истих.

У случају процене способности за SB поравнање, репродукција ко-кристализованих биоактивних конформација спроведена је молекулским доковањем, најпре користећи алгоритме и функције погодатка имплементираних у програмима AutoDock [338], AutoDock Vina [344] и DOCK [345], зарад унапређења 3-D QSAutogrid/R пакета, затим користећи апликацију Py-Docking доступну на www.3d-qsar.com [339], односно графичке корисничке интерфејсе за програме Smina [346] и PLANTS [347] као модуле апликације Py-Docking, у сагласју са Py-CoMFA и Py-ComBine алатима, те на крају користећи програм Glide [308-310] у оквиру софтверског пакета Schrödinger [288], као комплементарног PHASE методологији.

Сви алати коришћени за молекулско доковање подвргнути су верификованом поступку који се састојао од четири корака евалуације: поновном доковању експерименталне конформације (енг. *experimental conformation re-docking*, ECRD), поновном доковању насумичне конформације (енг. *randomized conformation re-docking*, RCRD), унакрсном доковању експерименталне конформације (енг. *experimental conformation cross-docking*, ECCD) и унакрсном доковању насумичне конформације (енг. *randomized conformation cross-docking*, RCCD) [336]. Ипак, алгоритми молекулског доковања још увек нису у потпуности оптимизовани и поуздани, у смислу да са великом тачношћу могу истовремено да предвиде биоактивну конформацију (сегмент за који је заслужан алгоритам молекулског доковања) и афинитет лиганда према молекулској мети (сегмент за који су развијене функције погодака (рангирања)). Такође, током симулације протеини као молекулске мете и се даље углавном користе као ригидни [336]. Стога, SB поравнање нових молекула може резултовати неоптималним позиционирањем и довести до већих грешака предвиђања.

Овакве особине алгоритама за молекулско доковање могу се делимично заобићи ако се LB приступи узму у обзир као алтернативна методологија поравнања. Стога, је извршена процена способности LB поравнања користећи одговарајуће протоколе [336]: поновно поравнање експерименталне конформације (енг. *experimental conformation re-alignment*, ECRA), поновно поравнање насумичне конформације (енг. *randomized conformation re-alignment*, RCRA), унакрсно поравнање експерименталне конформације (енг. *experimental conformation cross-alignment*, ECCA) и унакрсно поравнање

Докторска дисертација Незрине Куртановић

насумичне конформације (енг. randomized conformation cross-alignment, RCCA), на основу алгоритама и функција погодака имплантираних у Obconformer/Open3DALIGN [348,349] и Balloon/ShaEP [350,351] парове програма, зарад унапређења 3-D QSAutogrid/R пакета [337], затим користећи апликације Py-ConfSearch и Py-Align доступне на www.3d-qsar.com [339], односно користећи методе Balloon, RDkit [352] и Openbabel као модуле апликације Py-ConfSearch, те методе RDkit и ShaEP као модуле апликације Py-Align, у сагласју са Py-CoMFA и Py-ComBine алатима, те на крају користећи алгоритме имплементираним у Schrödinger's Flexible Ligand Alignment tool (FLA) у оквиру софтверског пакета Schrödinger [288], као комплементарне PHASE методологији.

Репродукција биоактивних конформација лиганада базирана на структури молекулске мете и сâмих лиганада

Што се тиче процење способности SB поравнања, тестиран је низ програма за молекулско доковање са свим доступним алгоритмима и функцијама погодака како би се изабрао најбољи за репродукцију биоактивних конформација реверзибилних лиганада ER α . Процена способности SB поравнања извршена је у четири нивоа тежине:

1. Поновно доковање експерименталне конформације (ECRD): поступак у којем су експерименталне конформације (EC) флексибилно поново доковане у одговарајуће нативне молекулске мете, процењујући програм у смислу његове способности да репродукује експерименталне биоактивне конформације лиганада.

2. Поновно доковање насумичне конформације (RCRD): слична процедура као ECRD, са том разликом што активни центар молекулске мете виртуелно окупирају конформације иницијално добијене компјутационо, насумичном оптимизацијом одговарајућих координата и положаја ко-кристализованих молекула. Тако, лиганди су на почетку удаљени из активног центра да би се њихове експерименталне координате промениле додељивањем нових вредности координата: $X = 0,000$, $Y = 0,000$, $Z = 0,000$. Затим су новонастале конформације енергетски минимизирани. Овде се програми процењују у смислу способности да пронађу експерименталну конформацију почев од насумично минимизираних конформација.

3. Унакрсно доковање експерименталне конформације (ECCD): процедура упоредива са ECRD, са том разликом да је молекулско доковање изведено унутар свих

Експериментални део

молекулских мета тренинг сета, осим унутар нативне. Овим протоколом се процењују програми у смислу налажења биоактивне конформације лиганда у активном центру сличном нативном протеину чија је терцијарна структура ипак модификована индукованим прилагођавањем аминокиселина услед интеракције са структурно различитим нативним лигандима, истовремено дискретно опонашајући флексибилност протеина.

4. Унакрсно доковање насумичне конформације (RCCD): протокол упоредив са ECSD, са разликом што се као почетне конформације користе насумично генерисане конформације лиганда. Ово је протокол највишег нивоа тежине, јер се од програма за молекулско доковање захтева да докује насумичну конформацију лиганда унутар активних центара свих расположивих молекулских мета осим унутар нативне молекулске мете. Исход ове процедуре сматра се најважнијом способношћу програма за молекулско доковање, јер се најтачнија функција погодака у RCCD експерименту субсеквентно примењује за доковање било ког молекула тест сета чија је експериментална биоактивна конформација непозната.

LB поравнање молекула спроведено је слично SB протоколима на четири различита нивоа тежине:

1. Поновно поравнање експерименталне конформације (ECRA): екстраховане ко-кристализоване експерименталне конформације лиганда подвргавају се конформационом претраживању након чега се генеришу ансамбли конформера који се преклапају са сопственим експериментално одређеним биоактивним конформацијама, процењујући програм у смислу способности репродукције експерименталне конформације молекула користећи исту као темплат.

2. Поновно поравнање насумичне конформације (RCRA): процедура упоредива са ECRA, с том разликом да су почетне конформације коришћене за генерисање ансамбала конформера добијене насумичним додељивањем координата и просторног положаја лигандима. Као и код SB поравнања, лиганди су најпре просторно дислоцирани и енергетски минимизовани то би се добиле насумичне конформације. Овом методом се програм процењује у смислу способности да преклопи ансамбл конформера у односу на експериментално добијену конформацију лиганда.

3. Унакрсно поравнање експерименталне конформације (ECCA): процедура упоредива са ECRA, али је суперимпонирање молекула извршено на свим молекулима тренинг сета осим на оном који се користи за генерисање конформера. Овде се врши

Докторска дисертација Незрине Куртановић

процена програма у смислу поравнања групе конформера молекула на претходно поравнате молекуле темплате.

4. Унакрсно поравнање насумичне конформације (RCCA): слично претходном протоколу са том разликом да је генерисање конформера извршено из насумице добијених конформација лиганда. Као и RCCD, овај поступак је најзахтевнији LB приступ. Овај поступак се примењује за било које молекуле тест сета и биће примењен за поравнање екстерно генерисаних (дизајнираних) молекула.

Способност програма за поравнање квантификована је одређивањем RMSD вредности између преклопљене и експерименталне конформације након чега су израчунати тачност доковања (енг. docking accuracy, DA) и тачност поравнања (енг. alignment accuracy, AA), за SB односно LB протоколе, респективно. Као што је претходно наведено [336], DA и AA могу се користити за тестирање колико су алгоритми за доковање односно поравнање способни да предвиде конформацију лиганда која ће бити што је могуће приближнија експерименталној, те се могу израчунати помоћу следеће једначине 3:

$$xA = f_{rmsd} \leq a + 0.5 (f_{rmsd} \leq b - f_{rmsd} \leq a) \quad (3)$$

Конкретно, xA је једнако DA када се израчунава тачност доковања, док је xA једнако AA када се рачуна тачност поравњања. Са друге стране, $f_{rmsd} \leq a$ и $f_{rmsd} \leq b$ представљају удео поравњаних лиганда са RMSD вредностима мањим од 2 Å или једнаким 2 Å (a коефицијент), односно мањим од 3 Å или једнаким 3 Å (b коефицијент). Опште прихваћени стандард је да су правилно доковане/преклопљене конформације оне чија је израчуната RMSD вредност мања од 2 Å у односу на експериментално одређену конформацију лиганда пронађену у лиганд-молекулска мета комплексу. Структуре са RMSD вредностима између 2 и 3 Å сматрају се делимично докованим/поравнатим, док су оне са RMSD вредностима већим од 3 Å погрешно доковане/поравнате и стога нису узете у обзир у прорачуну DA/AA.

Рандомизације експерименталних конформација лиганда за SB поравнање

Током процене способности SB поравнања помоћу програма AutoDock, AutoDock Vina и DOCK, иницијална конформациона анализа извршена је помоћу програма Obsonformer из помоћ MMFF94 поља сила. За сваки лиганд је генерисано је

Експериментални део

100 конформација, са максималним бројем од 100 по конформационој анализи и MMFF94 моделом наелектрисања.

Са друге стране Py-Docking апликација користила је сопствене алгоритме за минимизацију молекула.

Коначно, у сврху генерисања рандомизованих конформација за поравнање на основу структуре молекулске мете помоћу програма Glide, експерименталне конформације лиганда подвргнуте су протоколу молекулске динамике SA методом, који је имплементиран у MacroModel на следећи начин [353]. Свака структура је енергетски минимизирана до ниског градијента. Вредности не-везивних van der Waals-ових интеракција мерене су до растојања од 8 Å, док су електростатичке интеракције мерене до удаљености од 20 Å. Свим атомима додељене су насумичне брзине које одговарају температури од 310 К. Затим су изведене три оптимизације молекулском динамиком. Прва је изведена у трајању од 10 ps са временским кораком од 1,5 fs на константној температури од 310 К ради уравнотежења. Следећа оптимизација изведена је у интервалу од 20 ps, током које је систем био спојен на термалним купатилом на 150 К са временском константом од 5 ps. Временска константа представља приближно полу-време еквилибрације молекула у кади; последично, друга оптимизација довела је до тога да се молекул постепено охлади до приближно 150 К. Последња оптимизација охладила је молекул до 50 К у временском интервалу од 20 ps. Финална минимизација енергије спроведена је кроз 250 итерација користећи методу коњугованог градијента. Минимизирање и молекуларна динамика су у свим случајевима изведени имплицитном солватацијом у симулираном воденом раствору коришћењем GB/SA (енг. Generalized Born solvent accessible surface area) кључне речи и OPLS2005 поља сила.

Подешавања програма AutoDock

За све лиганде ригидни корени атом и ротабилне везе дефинисане су помоћу графичког корисничког интерфејса AutoDockTools. Молекулско доковање извршено је помоћу програма AutoDock4.2 користећи координате дефинисане унутар тродимензионалне просторне решетке кубоидне мреже која је добијена преклапањем свих лиганада, на следећи начин: хуз координате (y Å) биле су $X_{\min}/X_{\max} = 90,000/116,000$, $Y_{\min}/Y_{\max} = 13,000/26,000$, $Z_{\min}/Z_{\max} = 84,000/110,000$; подешавање координата је изведено на начин да обухвате минимизираних лиганда у распону од 10 Å у све три димензије. Lamarckian-ов генетски алгоритам (енг. Lamarckian genetic

Докторска дисертација Незрине Куртановић

algorithm) коришћен је за генерисање оријентација или конформација лиганда унутар активног центра. Поступак глобалне оптимизације започет је на узорку од 200 насумично позиционираних конформера, максимално $1,0 \times 10^6$ енергетских процена и у максимално 27 000 генерација. Укупно је генерисано 100 конформација које су сходно вредностима енергија везивања распоређене у кластере са RMSD толеранцијом унутар кластера од 0,5 Å.

Подешавања програма Vina

Симулације доковања изведене су у опсегу енергије од 10 kcal/mol и коефицијентом исцрпности једнаким 100, те RMSD толеранцијом унутар кластера од 0,5 Å користећи идентичне координате као код експеримента извршеног помоћу програма AutoDock4.2. Крајњи резултат био је 20 различитих конформација по лиганду за сваки разматрани рецептор.

Подешавања програма DOCK

Током процеса молекулског доковања помоћу програма DOCK, протеини су сматрани ригидним, док су лиганди сматрани флексибилним и енергетски минимизирани. Доступна површина растварачу сваког од протеина који нису садржали атоме водоника израчуната је помоћу програма DMS [354], користећи пробу са радијусом од 1,4 Å. Биоактивне конформације лиганда описане су помоћу модула SPHGEN и SPHERE_SELECTOR. Тродимензионална просторна решетка унутар активног центра генерисана је помоћним модулом SHOWBOX. Стерне и електростатичке интеракције унутар активног центра израчунате су помоћу програма Grid користећи растојање између тачака просторне решетке од 0,3 Å. Одабране сфере биле на растојању до 8 Å од тешких атома у структури лиганда док је за израчунавање енергија на свакој од тачака просторне решетке коришћена екстензија исте од 8 Å користећи 6^{-9} VDW потенцијале и Columb-интеракције.

Подешавања програма Smina

За програм Smina унутар Py-ConfSearch апликације коришћена су идентична подешавања као за програм AutoDock Vina, било за vina, vinardo [355] или AD4 Scoring функције погодака.

Експериментални део

Подешавања програма PLANTS

Доковање помоћу програма PLANTS унутар Py-ConfSearch апликације ограничено је на сферу радијуса 12 Å, центрирано у централном тежишном делу кристализованог лиганда. Примењена су стандардна подешавања програма уз три различите функције погодака: chemplr, plr и plr95.

Подешавања програма Glide

Програм Glide имплементиран у Schrödinger Suite коришћен је такође за молекулско доковање. Припрема протеина извршена је помоћу Protein Preparation Wizard модула имплементираног у програм Glide. Иницијално су све структуре протеина биле пре-процесиране како би се користиле као молекулске мете за молекулско доковање на следећи начин: (i) додавањем атома водоника; (ii) додељивањем наелектрисања атомима; (iii) уклањањем молекула воде који нису укључени у везивање лиганда; (iv) додавањем недостајућих аминокиселина и елемената секундарне структуре ако је потребно. Претходно обрађени протеини оптимизовани су помоћу модула PROPKA, а затим минимизирани коришћењем OPLS3 поља сила, након чега је уследила конвергенција тешких атома до RMSD 0,3 Å. Затим је искоришћен Receptor Grid Generation Wizard имплементиран у програм Glide за генерисање тродимензионалне (3D) просторне решетке, где су хуз координате (у Å) за прорачун биле $X_{\min}/X_{\max} = 90,000/116,000$, $Y_{\min}/Y_{\max} = 13,000/26,000$, $Z_{\min}/Z_{\max} = 84,000/110,000$; подешавање координата изведено је на начин да обухвати простор око минимизираних лиганата до растојања од 10 Å у све три димензије. Флексибилно доковање озвршено је или помоћу SP (стандардна прецизност, енг. standard precision) мода, за поуздано доковање са високом прецизношћу, или у режиму екстра прецизности (енг. extra precision, XP), где се даље уклањање лажно позитивних резултата постиже опсежнијим узорковањем и напредним рангирањем поза.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Рандомизације експерименталних конформација лиганда за LB поравнања

Током процене способности LB поравнања помоћу парова програма програма Obconformer/Open3DALING и Balloon/ShaEP, иницијална конформациона анализа извршена је помоћу програма Obconformer као за потребе молекулског доковања.

Са друге стране Py-ConfSearch апликација користила је сопствене алгоритме за минимизацију молекула пре поравнања са Py-Align.

Коначно, у сврху генерисања рандомизованих конформација за поравнање на основу структуре молекулске мете помоћу програма FLA, коришћен је идентичан протокол за минимизацију као за програм Glide.

Подешавања програма Obconformer/Open3DALING

Након иницијалне конформационе анализе помоћу програма Obconformer, молекули су потом поравнати на основу позиционирања атома користећи програм Open3DALING. Поравнање је извршено унапред предефинисаним параметрима програма. Потом су геометрије преклопљених конформера оптимизоване методом RMSD критеријума градијента користећи MMFF94 поље сила имплементирано у TKINKER графички кориснички интерфејс, позивањем команди са командне линије програма Open3DALING. Успешно поравнатом конформацијом сматрала се она са критеријумом конвергенције енергије од 0,01 kcal/mol.

Подешавања програма Balloon/ShaEP

Конформациона претрага такође је извршена помоћу програма Balloon и MMFF94 пољем сила. Генерисан је број од 50 конформација за сваки лиганд, са максималном бројем итерација од 1000, 500 генерација и MMFF94 моделима анелектрисања. Поравнање је извршено помоћу програма ShaEP користећи два модула: модул shaer извршио је поравнање комбинацијом поље-граф методе и електронске (просторне) густине (енг. field-graph matching and shape-density), док је модул shaer.onlyshape преклапање извршено на основу електронске густине.

Експериментални део

Подешавања Py-ConfSearch апликације

LB конформациона анализа извршена је употребом Py-ConfSearch модула на свим молекулима из TR користећи дефолтна подешавања за модуле Balloon, RDkit и OpenBabel.

Подешавања Py-Align апликације

Индивидуалне конформације добијене Py-ConfSearch анализом надаље су поравнате употребом Py-Align апликације, односно доступних RDkit и ShaEP метода, те испитивањем свих 16 приступа поравнања.

Подешавања програма Flexible Ligand Alignment

Током процене способности LB поравнања, експерименти су изведени помоћу Flexible Ligand Alignment (FLA) алата, користећи Flexible shape-based alignment (FSBA) и Common scaffold alignment (CSA) методе, заједно са доступним модулима: Largest common Bemis-Murcko scaffold (LCBMC), Maximum common substructure (MCS), и SMARTS, користећи уобичајене поставке.

Генерисање структура моделованих и дизајнираних једињења и предвиђање њихове активности

Структуре једињења унутар тест сетова означених као TS_{MOD1}, TS_{MOD2} и TS_{MOD3} као и структуре дизајнираних једињења, чија ће синтеза и биолошка процена бити представљена у наставку ове докторске дисертације, генерисане су помоћу Chemoaxon msketch модула [356], након чега су оптимизовани молекулском механиком и унапређени додавањем атома водоника на pH 7,4.

Након генерисања свих структура (тест сетова и дизајних једињења), биоактивне конформације једињења добијене су најбољим SB/LB протоколима и учитане у најбоље 3-D QSAR, COMBINER 3-D фармакофорне моделе модел како би се предвидела њихова активност.

Виртуелно скенирање

На основу DA и AA вредности за Glide и FLA, RCCD и RCCA процедуре су примењене на 4411 једињења из National Institute of Health базе података, односно на

Докторска дисертација Незрине Куртановић

сетове NCI Natural Products 3, 486 једињења; NCI Diversity Sets 2 и 3, 1574 и 2351 једињења, респективно, да би се добиле две конформације за свако једињење [357,358]. Тако су креирана два екстерна сета за предвиђање, SP и LB сет чија је активност предвиђена најбољом фармакофорном хипотезом: рангирање је изведено упоређивањем средњих вредности предвиђених pIC_{50} добијених из одабране хипотезе. Ови резултати су затим коришћени, заједно са одговарајућом предвиђеном енергијом слободног везивања помоћу Glide и FLA за састављање листе погодака. Узимајући у обзир ова три фактора, према rank-by-rank стратегији, одабрано је и тестирано 18 најбољих једињења.

Инструменти

Реакције у атмосфери микроталаса изведене су помоћу MICROSYNTH Microwave Synthesis System, произвођача Milestone Inc. 25 Controls Dr. Shelton, CT 06484, USA. Микроталаси су добијени магнетроном при фреквенцији од 2450 MHz, са излазном енергијом у опсегу од 100-500 W. Флеш хроматографија на колони изведена је помоћу Sepacore® Flash System X10 (BUCHI Corporation, USA) на силика гелу, величина пора 60 Å, величина честица мреже 220-440, величина честица 40 µm (Sigma Aldrich). Иницијална провера чистоће добијених једињења рутински је извршена применом TLC хроматографије користећи Merck Kiesegel 60 PF₂₅₄₊₃₆₆ силика гел. TLC тачке откривене су под UV светлом. ¹H NMR спектри снимљени су на 500 MHz док су ¹³C NMR спектри снимљени на 125 MHz помоћу Bruker AV-500 spectrometer (Bruker, USA) у DMSO-*d*₆ као растварачу, користећи TMS (SiMe₄) као интерни стандард. ¹⁵N NMR спектри снимљени су на 51 MHz док су ¹⁷O NMR спектри снимљени на 68 MHz помоћу Bruker AVANCE III spectrometer у DMSO-*d*₆ као растварачу, користећи TMS (SiMe₄) као интерни стандард. Хемијска померања приказана су у ppm јединицама при чему су снимљени пикови окарактерисани следећим скраћеницама: s-синглет, d-дублет, t-триплет, q-квартет, ABq-AB квартет, m-мултиплет. Константе купловања приказане су у херцима. Свако једињење окарактерисано је одговарајућим NMR спектром (¹H NMR, ¹³C NMR, ¹⁵N NMR или ¹⁷O NMR), као и GC/MS [M + H]⁺ молекулским јонима. GC/MS анализе су изведене у гасном хроматограму помоћу Agilent 6890N/5975B gas chromatograph чиме је секундарно потврђена чистоћа једињења. Све тачке топљења синтетисаних једињења забележене су помоћу Kofler hot-stage apparatus (C. Reichert, Vienna, Austria) и нису биле кориговане. На крају, чистоћа једињења већа од 95% потврђена је HPLC хроматографском анализом помоћу

Експериментални део

Agilent 1260 Infinity System (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) који се састојао од G1311C VL кватернерне пумпе, G1329B ALS аутосемплера, а G1316A термостатираног одељка за колону и G1315D детектора низа диода. Колона која је употребљена била је Agilent Zorbax AB-C18 column (5 μ m, 4.6 \times 250 mm) при чему је мобилна фаза била сачињена од воде (А) и метанола (В) са протоком од 1 mL/min. Температура колоне била је 25°C. Ињекциона запремина сваког узорка била је 20 μ L док је хроматограм снимљен на таласној дужини од 254 nm.

Комерцијална једињења

Уколико није другачије назначено, сви реагенси и растварачи добијени су од комерцијалних добављача и коришћени без даљег пречишћавања. Дакле, 2-хидрокси-4-метоксибензамид (CAS No. 3147-45-3), 1-хлорометилбензен (CAS No. 100-44-7), анхидрид сирћетне киселине (CAS No. 108-24-7), триетиламин (121-44-8), *tert*-бутил нитрит (CAS No. 540-80-7), 2,2,2-трифлуороетанол (CAS No. 75-89-8), бензил хлорид (CAS No. 100-44-7), диметил карбонат (CAS No. 616-38-6), метилен хлорид (CAS No. 75-09-2), сребро трифлуорометансулфонат (CAS No. 2923-28-6), 2-(4-хлорофенокси)-*N*-метилетанаминамин (CAS No. 65686-13-7), *N,N*-диизопропилетиламин (CAS No. 7087-68-5), диметилформаид (CAS No. 68-12-2), бор трибромид (CAS No. 10294-33-4), хидроксиламин хидрохлорид (CAS No. 5470-11-1), динатријум хидрогенфосфат (CAS No. 7558-79-4), анхидрид трифлуоросирћетне киселине (CAS No. 407-25-0), водоник-пероксид (CAS No. 7722-84-1), ацетонитрил (CAS No. 75-05-8), (\pm)-епиклорохидрин (CAS No. 106-89-8), литијум бромид (CAS No. 7550-35-8), *bis*(ацетонитрил)дихлоропаладијум(II) (CAS No. 14592-56-4), тетрабутиламонијум бромид (CAS No. 1643-19-2), метил 2-(4-хидроксифенил)ацетат (CAS No. 14199-15-6), ресорцинол (CAS No. 108-46-3), бор трифлуорид диетил етерат (CAS No. 109-63-7), селен диоксид (CAS No. 7446-08-4), 1,4-диоксан (CAS No. 123-91-1), 2-(4-хидроксифенил)сирћетна киселина (CAS No. 156-38-7), 2-(4-аминофенил)сирћетна киселина (CAS No. 1197-55-3), пиролидин-2,5-дион (CAS No. 123-56-8), 2-хлороетанол (CAS No. 107-07-3), 1,2-дихлороетан (CAS No. CAS 107-06-2), 3-хидроксибензоева киселина (CAS No. CAS 99-06-9), пентаметилциклопентаденилродијум(III) хлорид димер (CAS No. 12354 -85-7), бакар(II)ацетат (CAS No. 142-71-2), 1-(2-хидрокси-4-метоксифенил)-2-(4-метоксифенил)етенон (CAS No. 39604-64- 3), *m*-хлоропербензоева киселина (CAS No. 937-14-4), фероценсирћетна киселина (CAS No. 1287-16-7), параформалдехид (CAS No. 30525-89-4), фосфор трибромид (CAS No. 7789-60-8),

Докторска дисертација Незрине Куртановић

етанетиол (CAS No. 75-08-1), алуминијум хлорид (CAS No. 7446-70-0), тетрабутиламонијум јодид (CAS No. 311-28-4), (метоксиметил)трифенилфосфонијум хлорид (CAS No. 4009-98-7), литијум *bis*(триметилсилил)амид (CAS No. 4039-32-1), 1,2-дихлоропропан (CAS No. 78-87-5), триетилсилан (CAS No. 617-86-7), сулфаминска киселина (CAS No. 5329-14-6), 1,5-пентандиол (CAS No. 111-29-5), *tert*-бутилдиметилсилил хлорид (CAS No. 18162-48-6), раствор диметилцинка (CAS No. 544-97-8), (-)-1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен ((-)-DBNE) (EC No. 229-713-7), натријумова со 1-фенил-1*H*-тетразол-5-тиола (CAS No. 15052-19-4), имидазол (CAS No. 288-32-4), 4-(диметиламино)пиридин (CAS No. 1122-58-3), амонијум молибдат тетрахидрат (CAS No. 1122-58-3), 2-метоксиетоксиметил хлорид (CAS No. 3970-21-6), *N,N*-диизопропилетиламин (CAS No. 7087-68-5), калијум-осмат(VI)дихидрат (CAS No. 10022-66-9), 4-метилморфолин *N*-оксид (CAS No. 7529-22-8), натријум(мета)перјодат (CAS No. 7790-28-5), калијум хексаметилдисилазид (CAS No. 40949-94-8), толуен (CAS No. 108-88-3), 2,4,6-трихлорбензоил хлорид (CAS No. 4136-95-2), триетиламин (CAS No. 121-44-8), 4-(диметиламино)пиридин (DMAP) (CAS No. 1122-58-3), *tert*-бутилдиметилсилил трифлуорометан сулфонат (TBSOTf) (CAS No. 69739-34-0), 2,6-лутидин (CAS No. 108-48-5), 3-ацетил-4-хидроксибензоева киселина (Product No. PH000237), 1-етил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид хидрохлорид (EDAC·HCl) (CAS No. 25952-53-8), 1, 2-дихлороетан (CAS No. 107-06-2), *tert*-бутиламонијум флуорид (CAS No. 429-41-4), тетрахидрофуран (CAS No. 109-99-9) добијени су од добављача Sigma Aldrich.

Даље, 2-(2-амино-4-хидроксифенил)сирћетна киселина (CAS No. 744984-13-2), 4-(2,2-диметоксиетил)фенол (CAS No. 74447-40-8), 7-метил-7,8-дихидро-1,7-нафтиридин (CAS No. 36439-05-1), 4-хидрокси-3-метилбензонитрил (CAS No. 15777-70-5), 2-амино-4-метоксибензалдехид (CAS No. 59236-36-1), декахидро-1,8-нафтиридин (CAS No. 1756-68-9), 6,7-дихидро-5*H*-пироло[3,4-*b*]пиридин (CAS No. 147739-88-6) купљени су од Accel Parmtech, 3-хидроксипиридин-2(1*H*)-он (CAS No. 16867-04-2) купљен је од OChem Inc, 4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1*H*)-он (PubChem CID: 19816872) добављен је од стране PubChem, 2-(2,5-дихидро-1*H*-тетразол-5-ил)сирћетна киселина (CAS No. 21743-75-9) купљена је од стране AK Scientific, Inc, 5-фенил-2,5-дихидро-1*H*-тетразол (CAS No. 18039-42-4), 1-(1,4-дихидроксинафтален-2-ил)етанон (CAS No. 40420-48-2) и 3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-он (NSC658201) добављени су од стране DTP/NCI, 6-оксо-1,2,5,6-

Експериментални део

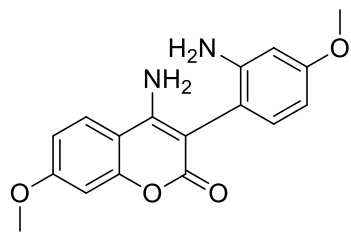
тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (PubChem CID 70598431) добављена је од стране SureChEMBL (ID: SCHEMBL11498473), уреа (CAS No. 57-13-6) је добављена од стране Millipore, пиперидин-1-илметанол (CAS No. 2494-10-2) купљен је у Alfa Chemistry, 4-(2,2-диметоксиетил)анилин (CAS No. 392630-73-8) купљен је у AЕchem Scientific Corporation, 3-хлоро-2-метилпропанска киселина (CAS No. 16674-04-7) добијена од је MolPort, 1,2-дихидроизокинолин (CAS No. 2859-58-7) и 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-метоксифенил)пропан-1-он (CAS No. 59258-25-2) купљени су у Chemieliva Pharmaceutical, 2-хидроксиацетилхлорид (CAS No. 57469-50-8) добављен је од стране Aurora Building Blocks 5. Брефелдин А (CAS No. 20350-15-6) наручен је из Santa Cruz, 2-хлоро-*N*-метилетанамин (CAS No. 4535-90-4) је добијен од Sinfoo Biotech, 2-хлоро-*N,N*-диметилетанамин (CAS No. 107-99-3) је купљен од Allbio Pharm Co., Ltd-a, 2-хлороетансулфонска киселина (CAS No. 18024-00-5) је испоручена од BOC Sciences, 1-(2-хлороетил)пиролидин-2,5-дион (CAS No. 18024-00-5) је добијен од Clearsynth, 1-(2-хлороетил) пиперидин (CAS No. 1932-03-2) и 1-(2-хлороетил)пиролидин (CAS No. 5050-41-9) добијени су од BLD Pharm 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (CAS No. 498-96-4) добављена је од стране од Aurum Pharmatech LLC-a, 6,7-дихидро-5*H*-пироло[3,4-*b*]пиридин (CAS No. 147739-88-6) је купљен од MolCore BioPharmatech, 1,2-дихидроизокинолин (CAS No. 64973-79-1) испоручио је Chemhere; декахидро-1,8-нафтиридин (CAS No. 13993-60-7) добијен је из MolPort.

Синтетички протоколи за припрему једињења 3DQ-1a до 3DQ-1e

Синтетички протоколи за припрему једињења 3DQ-1a

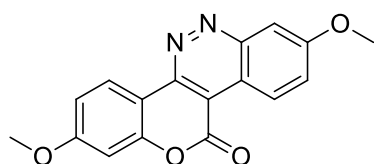
Синтеза једињења 3DQ-A1. Смеша 2-хидрокси-4-метоксибензамида (336 mg, 2 mmol), натријум 2-(2-амино-4-метоксифенил)сирћетне киселине (362 mg, 2 mmol), свеже дестилованог анхидрида сирћетне киселине (600 μ L) и безводног триетиламина (600 μ L) загревана је на 180°C током 18 сати. Након хлађења додат је засићени водени раствор K₂CO₃ (2 mL) и реакциона смеша је мешана на собној температури током 6 сати. Смеша је затим закишељена а преципитат је одвојен филтрацијом и кристалисан из MeOH дајући жуту чврсту супстанцу **3DQ-A1** (500 mg, 80%).

Докторска дисертација Незрине Куртановић



4-амино-3-(2-амино-4-хидроксифенил)-7-хидрокси-2H-хромен-2-он (**3DQ-A1**) ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,64 (s, 1H), 7,20 (s, 1H), 6,84 (s, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,29 (d, $J = 31,2$ Hz, 2H), 6,17 – 6,04 (m, 2H), 5,65 – 5,51 (m, 2H), 3,87 – 3,71 (m, 6H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 165,57 (s), 162,73 (s), 157,31 (s), 155,20 (s), 155,03 (s), 148,55 (s), 129,81 (s), 127,98 (s), 115,91 (s), 111,28 (s), 107,19 (s), 101,39 (d, $J = 1,1$ Hz), 98,90 (s), 81,89 (s), 56,23 – 55,83 (m), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,80 (s), -308,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 312,3199; нађено 312,1110.

Синтеза једињења 3DQ-A2. Балон са округлим дном, који је претходно осушен у сушници, монтиран је изнад магнетне мешалице и напуњен са **3DQ-A1** (400 mg, 1,28 mmol) и $t\text{BuONO}$ (385 μmol) у TFE (0,01 M, 10 mL). Затим је реакциона смеша мешана 12 сати на собној температури. По завршетку реакције, чврсти остатак одвојен је филтрацијом, преостали раствор је концентрован помоћу ротационог вакуум упаривача да би се жељени производ **3DQ-A2** добио пречишћавањем помоћу флеш хроматографије на колони (*n*-хексан/EtOAc = 50:50 v/v као елуент) као жуто-окер чврста супстанца (355 mg, 90%).

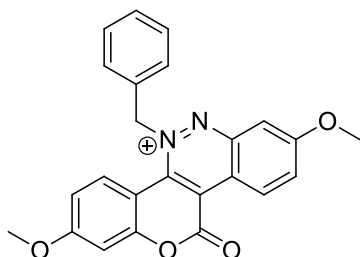


2,8-диметокси-11H-хромен[4,3-с]цинолин-11-он (**3DQ-A2**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) 8,48 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,60 (d, $J = 16,5$ Hz, 2H), 6,82 (s, 1H), 6,71 (s, 1H), 3,88 – 3,72 (m, 6H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 164,04 (s), 163,45 (s), 162,51 (s), 155,07 (s), 150,47 (s), 144,36 (s), 130,44 (s), 129,98 (s), 126,62 (s), 118,85 (s), 116,15 (s), 114,18 (s), 111,62 (s), 110,08 (s), 101,79 (s), 56,23 – 55,83 (m), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ 70,05 (d, $J = 218,1$ Hz). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 334,00 (s), 172,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 308,2882; нађено 308,0797.

Синтеза једињења 3DQ-A2-I. У малој бочици опремљеној магнетићем за мешање под протоком азота, бензо[с]цинолин **3DQ-A2** (300 mg, 970 μmol) растворен је у 2 mL DCM, да би потом у раствор додат AgOTf (248 mg, 970 μmol). Затим је у смешу такође додат и бензил хлорид (123 mg, 970 μmol) у капима, при чему се AgCl таложио.

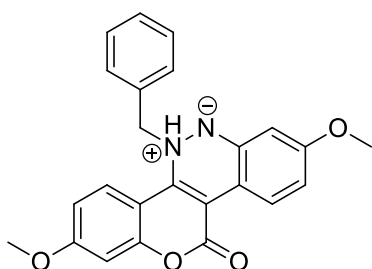
Експериментални део

Бочица је на крају затворена и остављена да стоји на собној температури док се не формирају кристали производа. По добијању кристала, смеша је филтрирана и темељно испрана топлим DCM. Бистри филтрат концентрован је и остављен да поново кристалише у DCM дајући **3DQ-A2-I** у облику бледо наранџастих кристала (360 mg, 93%).



5-бензил-2,8-диметокси-11-оксо-11H-хромен[4,3-с]цинолин-5-ијум (3DQ-A2-I). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,57-5,24 (m, 2H), 4,74-2,76 (m, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 169,77-159,73 (m), 156,19 (s), 145,59 (s), 143,02 (s), 139,96 - 131,25 (m), 131,23 - 123,97 (m), 122,46 (s), 118,49 (s), 115,57 - 106,40 (m), 102,57 (s), 69,83 (s), 62,25 - 49,79 (m). ^{17}O NMR (68 MHz, CDCl_3) δ 334,00 (s), 172,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4^+$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 399,1339, нађено 399,4181.

Синтеза једињења 3DQ-A2-II. *N*-бензил бензоцинолинијум трифлат **3DQ-A2-I** (300 mg, 751 μmol) растворен је у 1 mL DMF. Hünig-ова база *i*-Pr₂NEt додавана је кап по кап све док није примећена промена боје из жуте у дубоко љубичасту због формирања **3DQ-A2-II**.

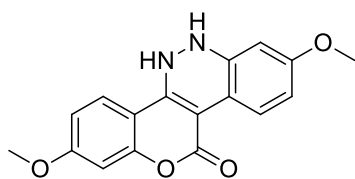


5-бензил-2,8-диметокси-11-оксо-5,11-дихидрохромен[4,3-с]цинолин-5-ијум-6-ид (3DQ-A2-II). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,29 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,08 (dd, $J = 25,4, 8,9$ Hz, 4H), 6,99 (t, $J = 26,7$ Hz, 3H), 6,70 (s, 1H), 4,58 - 4,44 (m, 2H), 3,92 - 3,73 (m, 6H), 2,57 - 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 164,62 (s), 163,37 (s), 162,06 (s), 151,95 (s), 135,34 (s), 131,02 (s), 129,24 - 128,87 (m), 128,16 (s), 126,10 (s), 113,62 (s), 110,83 (d, $J = 12,4$ Hz), 107,65 (s), 102,50 (s), 101,28 (s), 99,52 (s), 56,23 - 55,83 (m), 50,67 (s), 40,17 - 39,96 (m). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 400,1423: нађено 400,4266.

Синтеза једињења 3DQ-A3. Претходна смеша која је садржала **3DQ-A2-II** неутралисана је са 1N HCl (450 μL , 1N) све док није дошло до промене боје из дубоко

Докторска дисертација Незрине Куртановић

љубичасте у наранџасту као резултат стварања синтона **3DQ-A3**, на бази бензо[с]цинолина. **3DQ-A3** је кристалисан из MeOH (217 mg, 93%).

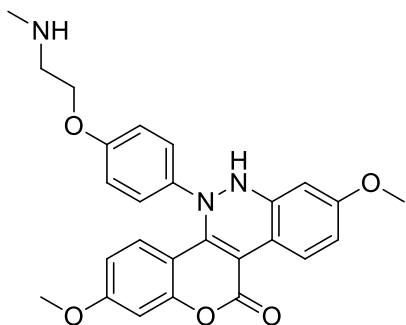


2,8-дихидрокси-5H-хромен[4,3-с]цинолин-11(6H)-он

(**3DQ-A3**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,66 (d, $J = 37,1$ Hz, 4H), 6,86 (s, 1H), 6,82 (d, $J = 34,1$ Hz, 3H), 6,49 (s, 2H), 6,34 (s, 2H), 5,70 (s, 2H), 4,73 (s, 2H), 3,88 – 3,72 (m, 12H),

2,57 – 2,43 (m, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 162,61 (d, $J = 16,4$ Hz), 160,33 (s), 159,50 (s), 151,70 (s), 140,66 (s), 129,10 (s), 127,95 (s), 111,76 (s), 111,16 (d, $J = 7,1$ Hz), 109,59 (s), 101,43 (s), 98,53 (s), 77,11 (s), 56,23 – 55,83 (m), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -92,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 310,3041; нађено 310,0954.

Синтеза једињења **3DQ-Pro-1a** и **3DQ-Pro-1a***. Одређена количина **3DQ-A3** (60 mg, 202 μmol) растворена је у 45 mL топлог етанола. Затим су додати калијум карбонат (27,8 mg, 202 μmol) и еквимоларна концентрација 2-(4-хлорофенокси)-*N*-метилетанамина (37,65 mg, 202 μmol). Смеша је рефлукутована 2 h. Након хлађења, неоргански остатак филтриран је и производ је кристалисао из добијеног раствора. Рутинска TLC анализа сугерисала да је сирови производ меша. Због тога је пречишћен коришћењем флеш хроматографије на колони силика гела ($\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O} = 50:20:10$ v/v/v) да би се добили жељени производи **3DQ-Pro-1a** и **3DQ-Pro-1a*** као браон чврсте супстанце у приносима од 44,2% (41 mg) и 36,4% (34 mg).



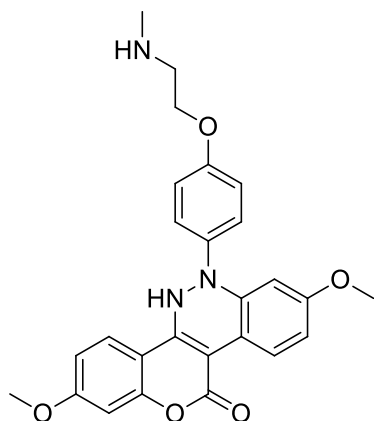
2,8-диметокси-5-(4-(2-(метиламино)етокси)фенил)-

5H-хромен[4,3-с]цинолин-11(6H)-он (**3DQ-Pro-1a**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,66 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H), 6,90 – 6,64 (m, 6H), 6,49 (s, 1H), 6,35 (s, 1H), 5,13 (s, 1H), 4,07 – 3,91 (m, 2H), 3,88 – 3,71 (m, 6H), 3,01 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,61 – 2,43 (m, 9H), 1,84 (s, 1H). ^{13}C NMR (125

MHz, DMSO- d_6) δ 164,45 (s), 162,11 (s), 160,76 (s), 157,40 (s), 152,64 (s), 146,64 (s), 140,55 (s), 137,61 (s), 130,28 (s), 126,86 (s), 125,74 – 125,53 (m), 115,01 – 114,61 (m), 113,05 (s), 111,72 (s), 110,51 (s), 109,92 (s), 101,66 (s), 99,38 (s), 82,17 (s), 67,03 (s), 56,23 – 55,83 (m), 50,93 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,52 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -352,00 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 78,00 (s), 63,00 (s),

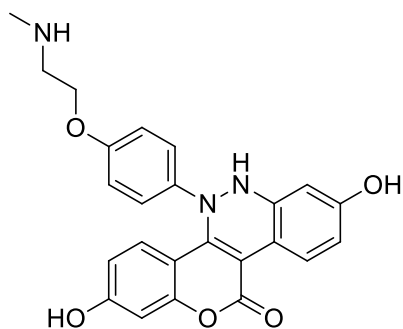
Експериментални део

50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за C₂₆H₂₅N₃O₅: [M + H]⁺: 459,4938 нађено; 459,1794.

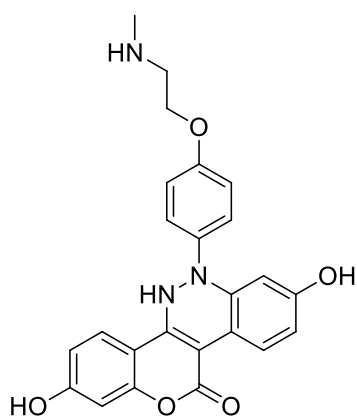


2,8-диметокси-6-(4-(2-(метиламино)етокси)фенил)-5H-хромено[4,3-с]цинолин-11(6H)-он (**3DQ-Pro-1a***). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,64 (d, *J* = 31,9 Hz, 20H), 7,20 – 7,01 (m, 20H), 6,94 – 6,75 (m, 49H), 6,75 – 6,74 (m, 1H), 6,63 (s, 11H), 5,88 (s, 10H), 4,03 – 3,99 (m, 16H), 3,89 – 3,73 (m, 60H), 3,01 (d, *J* = 1,7 Hz, 18H), 2,61 – 2,43 (m, 90H), 1,87 (s, 10H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162,67 (d, *J* = 3,6 Hz), 160,85 (s), 158,98 (s), 157,51 (s), 151,35 (s), 140,94 (s), 137,01 (s), 129,41 (s), 127,06 (s), 121,12 – 120,72 (m), 115,82 – 115,61 (m), 115,44 (s), 111,89 (s), 111,38 (s), 111,07 (s), 101,59 (s), 100,81 (s), 81,44 (s), 67,03 (s), 56,23 – 55,83 (m), 50,93 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,52 (s). ¹⁵N NMR (51 MHz, DMSO-*d*₆) δ -92,10 (s), -352,00 (s). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 78,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за C₂₆H₂₅N₃O₅ [M + H]⁺: 459,4938 нађено; 459,1794.

Синтеза једињења **3DQ-1a** и **3DQ-1a***. У атмосфери аргона, раствору (**3DQ-1a** 30 mg, 66 μmol) или **3DQ-1a*** (20 mg, 44 μmol) у сувом дихлорометану на 0°C додаван је бор трибромид (2 еквивалента по метокси функција) кап по кап. Добијена смеша је затим рефлуктована 3 сата и сипана у смешу лед/вода након чега је охлађена на собну температуру. Водени слој је екстрахован етил ацетатом. Комбиновани органски слојеви су испрани сланим раствором, осушени преко безводног Na₂SO₄ и затим филтрирани и концентровани у вакууму. Добијени производи, **3DQ-1a** (25,62 mg, 90%) и **3DQ-1a*** (17,08 mg, 90%), пречишћени су хроматографијом на колони силика гела (Et₂O:EtOAc = 75:25 v/v) у виду чврстих супстанци наранцасте боје.



2,8-дихидрокси-5-(4-(2-(метиламино)етокси)фенил)-5H-хромен[4,3-с]цинолин-11(6H)-он (**3DQ-1a**). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,56 (d, $J = 5,7$ Hz, 48H), 6,85 (s, 2H), 6,85 – 6,68 (m, 120H), 6,67 (s, 25H), 6,37 (s, 26H), 6,25 (s, 23H), 5,39 (s, 24H), 5,06 (s, 24H), 4,83 (s, 24H), 4,05 – 3,89 (m, 48H), 3,02 (d, $J = 23,9$ Hz, 50H), 2,86 – 2,73 (m, 143H), 2,61 – 2,48 (m, 72H), 2,06 (s, 24H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162,11 (s), 161,52 (s), 161,08 (s), 157,40 (s), 152,18 (s), 146,64 (s), 140,98 (s), 137,61 (s), 129,93 (s), 126,71 (s), 125,74 – 125,53 (m), 115,01 – 114,61 (m), 112,66 (s), 111,85 (s), 111,39 (s), 109,35 (s), 103,65 (s), 103,10 (s), 82,17 (s), 67,03 (s), 50,93 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,52 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -352,00 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 431,1481; нађено 431,4406,



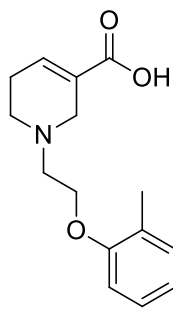
2,8-дихидрокси-6-(4-(2-(метиламино)етокси)фенил)-5H-хромен[4,3-с]цинолин-11(6H)-он (**3DQ-1a***). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,56 (s, 18H), 7,51 (s, 18H), 7,19 – 6,99 (m, 37H), 6,95 – 6,83 (m, 34H), 6,76 (s, 4H), 6,76 – 6,63 (m, 53H), 6,52 (s, 21H), 5,94 (s, 18H), 5,44 (s, 18H), 5,03 (s, 18H), 4,04 – 4,00 (m, 29H), 3,02 (d, $J = 3,5$ Hz, 33H), 2,61 – 2,47 (m, 54H), 1,99 – 1,82 (m, 127H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 204,31 (s), 162,68 (s), 162,44 (s), 160,55 (s), 158,98 (s), 157,51 (s), 150,99 (s), 140,94 (s), 136,64 (s), 129,11 (s), 127,33 (s), 121,12 – 120,72 (m), 117,43 (s), 115,82 – 115,61 (m), 112,53 (s), 112,12 (s), 108,56 (s), 104,52 (s), 103,35 (s), 81,44 (s), 67,03 (s), 50,93 (s), 36,52 (s), 31,16 – 30,76 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -92,10 (s), -352,00 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 78,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$: [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 431,1481 нађено; 431,4406.

Синтетички протоколи за припрему једињења **3DQ-2a**

Синтеза једињења 3DQ-R2a. У балону са округлим дном (25 mL), опремљеном магнетном мешалицом и кондензатором, припремљена је смеша 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине (127,14 mg, 1 mmol) и 2-(4-хлоро-2-метилфенокси)ацеталдехида (184,62 mg, 1 mmol) у 2,2,2-трифлуороетанолу (5

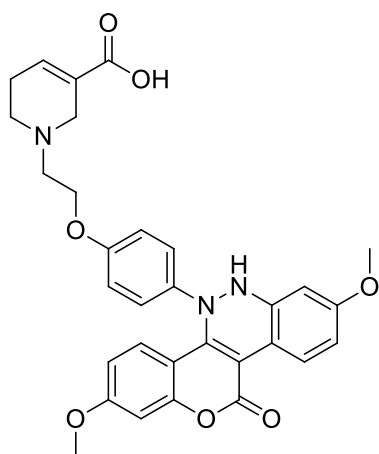
Експериментални део

mL). Затим је додат NaBH₄ (2 mmol) и смеша је мешана под рефлуksom. По завршетку реакције, смеша је филтрирана и остатак је испран помоћу TFE (2 mL). Растварач је дестилован и добијен је чисти производ **3DQ-2a** као жута чврста супстанца (236,08 mg, 88%).



1-(2-(4-хлоро-2-метилфенокси)етил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (3DQ-R2a). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,32 (d, *J* = 5,0 Hz, 7H), 7,24 (t, *J* = 35,0 Hz, 31H), 7,16 – 7,07 (m, 4H), 6,87 (s, 14H), 4,20 (s, 1H), 4,20 – 4,05 (m, 40H), 3,46 (s, 14H), 2,83 (d, *J* = 1,7 Hz, 5H), 2,83 – 2,65 (m, 38H), 2,61 (s, 12H), 2,57 – 2,46 (m, 82H), 2,46 – 2,32 (m, 44H), 2,32 – 2,14 (m, 29H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166,47 (s), 155,18 (s), 142,15 (s), 130,74 (s), 130,25 (s), 127,77 (d, *J* = 13,0 Hz), 126,73 (s), 114,60 (s), 67,45 (s), 54,64 (s), 53,79 (s), 48,52 (s), 40,17 – 39,96 (m), 26,10 (s), 16,00 (s). ¹⁵N NMR (51 MHz, DMSO-*d*₆) δ -330,10 (s). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 337,20 (s), 253,90 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS *m/z* израчунато за C₁₅H₁₈ClNO₃ [M + H]⁺: 295,1507; нађено 297,7632.

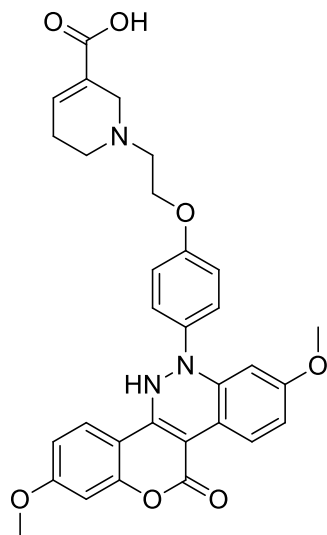
*Синтеза једињења 3DQ-Pro-2a и 3DQ-Pro-2a**. Жељени производи, **3DQ-Pro-2a** и **3DQ-Pro-2a***, добијени су у приносима од 46% (51,72 mg), односно 41% (46,22 mg) као светло смеђе чврсте материје, коришћењем идентичног поступка као и за **3DQ-Pro-1a** и **3DQ-Pro-1a***, применом **3DQ-Pro-2a** (59,73 mg, 202 μmol).



1-(2-(4-(2,8-диметокси-11-оксо-6,11-дихидро-5H-хромено[4,3-с]пиридин-5-ил)фенокси)етил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбонска киселина (3DQ-Pro-2a). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,68 (s, 10H), 7,52 (s, 10H), 7,32 (s, 10H), 6,86 (s, 1H), 6,86 – 6,65 (m, 51H), 6,63 (s, 9H), 6,48 (s, 10H), 6,30 (s, 10H), 5,00 (s, 10H), 4,16 (s, 11H), 4,09 – 3,98 (m, 19H), 3,87 – 3,71 (m, 59H), 3,17 (s, 10H), 2,98 (d, *J* = 2,8 Hz, 20H), 2,63 (s, 12H), 2,54 – 2,43 (m, 67H), 2,35 (s, 2H), 2,35 – 2,20 (m, 20H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166,47 (s), 164,45 (s), 162,11 (s), 160,76 (s), 157,40 (s), 152,64 (s), 146,64 (s), 142,15 (s), 140,55 (s), 137,61 (s), 130,28 (s), 126,80 (d, *J* = 16,9 Hz), 125,74 – 125,53 (m), 115,01 – 114,61 (m), 113,05 (s), 111,72 (s), 110,51 (s), 109,92 (s), 101,66 (s), 99,38 (s), 82,17 (s), 67,36 (s), 56,23 – 55,83 (m), 54,64 (s), 53,79 (s), 48,52 (s), 40,17 – 39,96

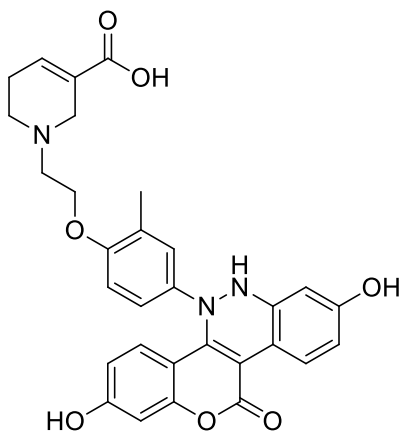
Докторска дисертација Незрине Куртановић

(m), 26,10 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,35 – 336,84 (m), 253,90 (s), 216,30 (s), 78,00 (s), 63,00 (s), 50,70. MS m/z израчунато за $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 555,2132; нађено 55,2084.



1-(2-(4-(2,8-диметокси-11-оксо-5H-хромено[4,3-с]цинолин-6(11H)-ил)фенокси)етил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбонска киселина (3DQ-Pro-2a^{})*. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,93 (s, 43H), 7,65 (d, $J = 43,7$ Hz, 86H), 7,58 – 7,50 (m, 3H), 7,31 (s, 48H), 7,22 – 7,08 (m, 86H), 7,03 – 6,83 (m, 126H), 6,76 (d, $J = 6,2$ Hz, 96H), 6,75 – 6,70 (m, 9H), 6,64 (s, 55H), 5,82 (s, 43H), 4,38 (s, 44H), 4,18 – 4,01 (m, 88H), 3,88 – 3,71 (m, 261H), 3,39 (s, 44H), 2,96 (s, 45H), 2,79 (s, 46H), 2,57 (d, $J = 42,8$ Hz, 97H), 2,52 – 2,43 (m, 255H), 2,37 – 2,17 (m, 90H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,47 (s), 162,67 (d, $J = 3,6$ Hz), 160,85 (s), 158,98 (s), 157,51 (s), 151,35 (s), 142,15 (s), 140,94 (s), 137,01 (s), 129,41 (s), 127,06 (s), 126,73 (s), 121,12 – 120,72 (m), 115,82 – 115,61 (m), 115,44 (s), 111,89 (s), 111,38 (s), 111,07 (s), 101,59 (s), 100,81 (s), 81,44 (s), 67,36 (s), 56,23 – 55,83 (m), 54,64 (s), 53,79 (s), 48,52 (s), 40,17 – 39,96 (m), 26,10 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -92,10 (s), -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,35 – 336,84 (m), 253,90 (s), 216,30 (s), 78,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 555,2136; нађено 55,2067.

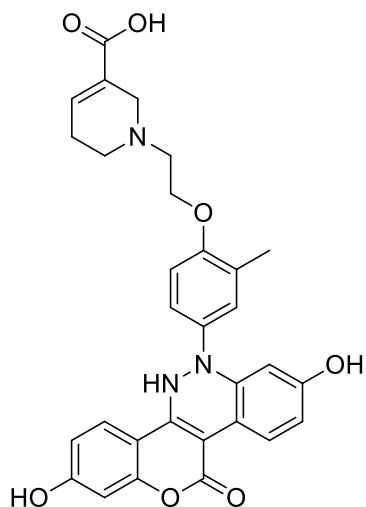
Синтеза једињења 3DQ-2a и 3DQ-2a^{}*. Једињења **3DQ-Pro-2a** (36,64 mg, 66 μmol) и **3DQ-Pro-2a^{*}** (24,43 mg, 44 μmol) подвргнута су истом протоколу као и производи **3DQ-1a** и **3DQ-1a^{*}**, дајући **3DQ-2a** (33,93 mg, 95%) и **3DQ-2a^{*}** (22,62 mg, 95%) као бледо наранџасте чврсте материје.



1-(2-(4-(2,8-дихидрокси-11-оксо-6,11-дихидро-5H-хромено[4,3-с]цинолин-5-ил)-2-метилфенокси)етил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (3DQ-2a). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,74 (s, 4H), 7,67 (d, $J = 44,1$ Hz, 90H), 7,31 (s, 47H), 6,80 (s, 45H), 6,75 (s, 43H), 6,67 (d, $J = 36,9$ Hz, 93H), 6,43 (s, 48H), 6,19 (d, $J = 15,4$ Hz, 93H), 5,39 (s, 46H), 5,06 (s, 46H), 4,49 (s, 46H),

Експериментални део

4,11 (s, 44H), 4,09 – 3,93 (m, 96H), 3,33 (s, 46H), 2,90 – 2,69 (m, 136H), 2,62 (s, 8H), 2,57 – 2,43 (m, 302H), 2,43 – 2,34 (m, 24H), 2,20 (s, 39H), 2,20 – 2,07 (m, 195H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,47 (s), 162,11 (s), 161,52 (s), 161,08 (s), 157,47 (s), 152,18 (s), 146,64 (s), 142,15 (s), 140,98 (s), 136,32 (s), 129,93 (s), 126,72 (d, $J = 2,8$ Hz), 126,00 (s), 123,99 (s), 122,23 (s), 116,95 (s), 112,66 (s), 111,85 (s), 111,39 (s), 109,35 (s), 103,65 (s), 103,10 (s), 82,17 (s), 67,45 (s), 54,64 (s), 53,79 (s), 48,52 (s), 40,17 – 39,96 (m), 26,10 (s), 16,00 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,35 – 336,84 (m), 253,90 (s), 216,30 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 541,1823; нађено 541,1836.



1-(2-(4-(2,8-дихидрокси-11-оксо-5H-хромено[4,3- c]цинолин-6(1H)-ил)-2-метилфенокси)етил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (3DQ-2a^{}).*

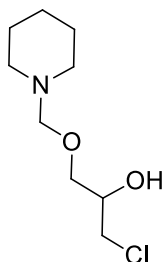
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,62 (s, 15H), 7,47 (s, 16H), 7,31 (s, 16H), 7,07 (s, 16H), 6,96 (s, 14H), 6,78 (d, $J = 52,2$ Hz, 27H), 6,68 (d, $J = 11,2$ Hz, 36H), 6,53 (s, 16H), 5,86 (s, 15H), 5,46 (s, 15H), 5,04 (s, 15H), 4,48 (s, 15H), 4,18 – 4,02 (m, 30H), 3,37 (s, 15H), 2,77 (d, $J = 40,1$ Hz, 29H), 2,72 – 2,71 (m, 2H), 2,69 (s, 16H), 2,63 – 2,43 (m, 108H), 2,43 – 2,29 (m, 47H), 2,29 – 2,09 (m, 32H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 166,47 (s), 162,68 (s), 162,44 (s), 160,55 (s), 158,98 (s), 157,28 (s), 150,99 (s), 142,15 (s), 141,03 (s), 136,64 (s), 129,11 (s), 128,23 (s), 127,33 (s), 126,73 (s), 119,44 (s), 118,08 (s), 117,43 (s), 115,02 (s), 112,53 (s), 112,12 (s), 108,56 (s), 104,52 (s), 103,35 (s), 81,44 (s), 67,45 (s), 54,64 (s), 53,79 (s), 48,52 (s), 40,17 – 39,96 (m), 26,10 (s), 16,00 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -92,10 (s), -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,35 – 336,84 (m), 253,90 (s), 216,30 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 541,1843; нађено 541,1873.

Синтетички протоколи за припрему једињења 3DQ-3a

Синтеза једињења 3DQ-Pro-R3a. Једињење 3DQ-Pro-R3a синтетисано је мешањем комерцијално доступног пиперидин-1-илметанола (44,2 mg, 385 μmol) са (\pm)-епихлорохидрином (34,7 mg, 385 μmol), при чему је реакциона смеша држана на 0°C током 5 мин. Реакциона смеша је затим екстрахована три пута са DCM. Комбиновани органски слојеви су испрани водом и сланим раствором, сушени преко анхидрованога

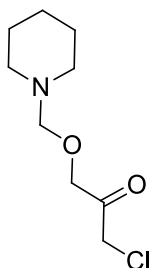
Докторска дисертација Незрине Куртановић

натријум сулфата и остатак је пречишћен хроматографијом на колони елуирањем са системом растварача *n*-хексан: ЕтОАс: = 85: 15 v/v дајући полутечни **3DQ-Pro R3a** жуте боје (78 mg, 97,5%).



1-хлоро-3-(пиперидин-1-илметокси)пропан-2-ол (**3DQ-Pro-R3a**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 4,98 (s, 1H), 4,51 – 4,37 (m, 2H), 3,97 (s, 1H), 3,67 (s, 1H), 3,45 (d, J = 22,1 Hz, 2H), 3,28 (s, 1H), 2,72 – 2,55 (m, 2H), 2,55 – 2,43 (m, 6H), 2,33 – 2,16 (m, 2H), 1,73 – 1,41 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 88,99 (s), 71,73 (s), 69,58 (s), 52,05 – 51,66 (m), 45,86 (s), 40,17 – 39,96 (m), 24,75 – 24,35 (m), 23,41 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -326,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 18,00 (s), 13,00 (s), 10,80 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{ClNO}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 207,6977; нађено 207,1026.

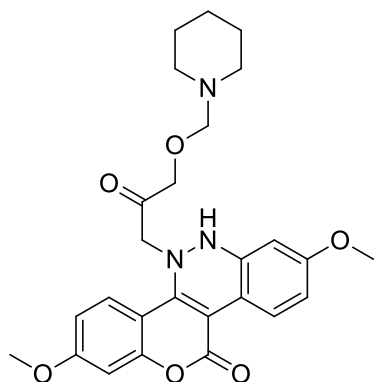
Синтеза једињења 3DQ-R3a. Раствори H_2O_2 (675 μmol) и DmpzHFC (3.4 μmol) додати су у **3DQ-Pro-R3a** (70 mg, 337 μmol). Смеша је помешана и остављена на собној температури 2 мин. По завршетку реакције, у реакциону смешу додат је безводни Na_2SO_4 да би затим производ **3DQ-R3a** био екстрахован са дихлорометаном (3 x 5 mL). Испаравањем органског растварача и пречишћавањем хроматографијом на колони добијен је **3DQ-R3a** као жута чврста супстанца са добрим приносом (65,8 mg, 95%).



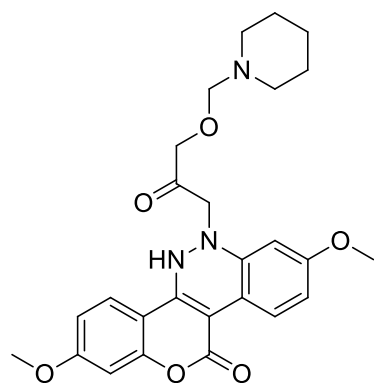
1-хлоро-3-(пиперидин-1-илметокси) пропан-2-он (**3DQ-R3a**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 4,64 – 4,50 (m, 1H), 4,50 – 4,37 (m, 1H), 4,35 – 4,21 (m, 1H), 2,73 – 2,56 (m, 1H), 2,56 – 2,43 (m, 3H), 2,35 – 2,18 (m, 1H), 1,73 – 1,40 (m, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,58 (s), 88,48 (s), 73,73 (s), 52,05 – 51,66 (m), 45,15 (s), 40,17 – 39,96 (m), 24,75 – 24,35 (m), 23,41 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -326,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 18,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{ClNO}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 205,6818; нађено 205,0870.

*Синтеза једињења 3DQ-Pro-3a и 3DQ-Pro-3a**. Жељени производи **3DQ-Pro-3a** (44,55 mg, 46%), односно **3DQ-Pro-3a*** (39,7 mg, 41%), добијени су у облику наранџастих чврстих супстанци коришћењем идентичног поступка као код **3DQ-Pro-1a** и **3DQ-Pro-1a***, применом **3DQ-R3a** (41,5 mg, 202 μmol) као полазног једињења.

Експериментални део



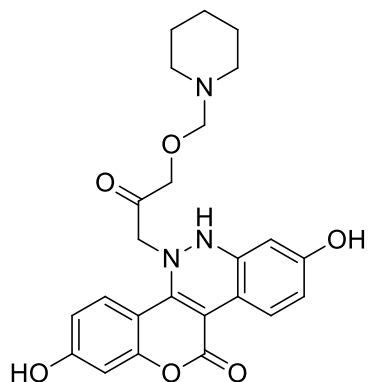
2,8-диметокси-5-(2-оксо-3-(пиперидин-1-илметокси)пропил)-5H-хромен[4,3-с]цинолин-11(6H)-он (**3DQ-Pro-3a**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,67 (d, $J = 4,9$ Hz, 2H), 6,86 (s, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,53 (d, $J = 22,6$ Hz, 2H), 6,04 (s, 1H), 5,47 (s, 1H), 4,53 – 4,34 (m, 5H), 3,90 – 3,72 (m, 6H), 2,57 – 2,38 (m, 8H), 2,25 – 2,08 (m, 2H), 1,68 – 1,37 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 206,08 (s), 162,61 (d, $J = 18,4$ Hz), 160,85 (s), 160,05 (s), 151,35 (s), 135,07 (s), 129,41 (s), 128,82 (s), 111,38 (s), 111,07 (s), 110,61 (s), 110,21 (s), 101,59 (s), 96,01 (s), 88,59 (s), 77,94 (s), 75,20 (s), 62,88 (s), 56,23 – 55,83 (m), 52,13 – 51,82 (m), 40,17 – 39,96 (m), 24,68 – 24,37 (m), 23,42 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -244,00 (s), -326,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 18,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$ [M + H] $^+$: 479,5250; нађено 479,2056.



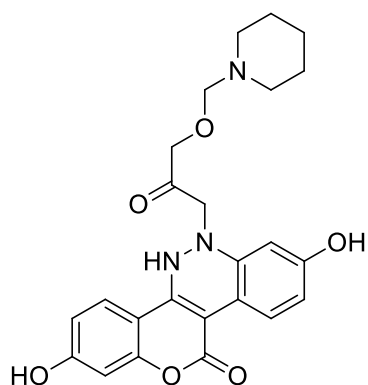
2,8-диметокси-6-(2-оксо-3-(пиперидин-1-илметокси)пропил)-5H-хромен[4,3-с]цинолин-11(6H)-он (**3DQ-Pro-3a***). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,67 (d, $J = 4,9$ Hz, 2H), 6,86 (s, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,53 (d, $J = 22,6$ Hz, 2H), 6,04 (s, 1H), 5,47 (s, 1H), 4,53 – 4,34 (m, 5H), 3,90 – 3,72 (m, 6H), 2,57 – 2,38 (m, 8H), 2,25 – 2,08 (m, 2H), 1,68 – 1,37 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 7,67 (d, $J = 4,9$ Hz, 2H), 6,86 (s, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,53 (d, $J = 22,6$ Hz, 2H), 6,04 (s, 1H), 5,47 (s, 1H), 4,53 – 4,34 (m, 5H), 3,90 – 3,72 (m, 6H), 2,57 – 2,38 (m, 8H), 2,25 – 2,08 (m, 2H), 1,68 – 1,37 (m, 6H). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -92,10 (s), -326,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 18,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$ [M + H] $^+$: 479,5250; нађено 479,2056.

Синтеза једињења **3DQ-3a** и **3DQ-3a***. Једињења **3DQ-Pro-3a** (31,6 mg, 66 μmol) или **3DQ-Pro-3a*** (21 mg, 44 μmol) подвргнута су идентичном поступку као и препарати **3DQ-1a** и **3DQ-1a***, дајући **3DQ-3a** (28,31 mg, 95%) и **3DQ-3a*** (18,9 mg, 95%) као бледо наранџасте чврсте супстанце.

Докторска дисертација Незрине Куртановић



2,8-дихидрокси-5-(2-оксо-3-(пиперидин-1-илметокси)пропил)-5H-хромен[4,3-с]цинолин-11(6H)-он (**3DQ-3a**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) 7,49 (d, $J = 45,3$ Hz, 29H), 7,43 – 7,34 (m, 3H), 6,73 (d, $J = 2,0$ Hz, 32H), 6,47 (s, 17H), 6,41 (s, 15H), 5,45 (s, 16H), 5,27 (s, 16H), 5,05 (s, 16H), 4,61 – 4,51 (m, 31H), 4,51 – 4,37 (m, 49H), 3,93 (s, 16H), 2,79 – 2,62 (m, 33H), 2,57 – 2,43 (m, 95H), 2,40 – 2,23 (m, 33H), 1,80 – 1,47 (m, 98H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 208,51 (s), 162,11 (s), 161,58 (s), 160,25 (s), 151,30 (s), 149,15 (s), 140,86 (s), 130,22 (s), 127,80 (s), 112,87 (s), 112,13 (s), 111,92 (s), 109,38 (s), 103,98 (s), 103,59 (s), 88,59 (s), 78,19 (s), 75,20 (s), 59,09 (s), 52,13 – 51,82 (m), 40,17 – 39,96 (m), 24,68 – 24,37 (m), 23,42 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -271,80 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 18,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 492,4774; нађено 492,1533.



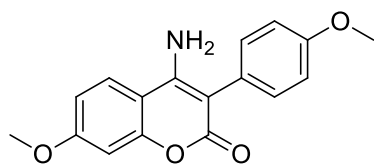
2,8-дихидрокси-6-(2-оксо-3-(пиперидин-1-илметокси)пропил)-5H-хромен[4,3-с]цинолин-11(6H)-он (**3DQ-3a***). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,56 (d, $J = 39,2$ Hz, 6H), 6,74 (s, 2H), 6,66 (s, 4H), 6,42 (d, $J = 31,1$ Hz, 6H), 5,84 (s, 3H), 5,72 (s, 3H), 5,46 (s, 3H), 5,12 (s, 3H), 4,51 – 4,35 (m, 12H), 4,19 (s, 3H), 2,57 – 2,48 (m, 17H), 2,48 – 2,37 (m, 7H), 2,25 – 2,08 (m, 6H), 1,66 – 1,35 (m, 18H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 206,08 (s), 162,68 (s), 162,44 (s), 160,00 (d, $J = 11,8$ Hz), 150,99 (s), 134,32 (s), 129,08 (d, $J = 8,4$ Hz), 113,06 (s), 112,53 (s), 110,29 (s), 108,56 (s), 103,35 (s), 100,93 (s), 88,59 (s), 77,94 (s), 75,20 (s), 62,88 (s), 52,13 – 51,82 (m), 40,17 – 39,96 (m), 24,68 – 24,37 (m), 23,42 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -92,10 (s), -326,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 18,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 492,4774; нађено 492,1533.

Синтетички протоколи за припрему једињења **3DQ-4a**

Синтеза једињења **3DQ-A4**. Поступак сличан оном који је раније коришћен за синтезу **3DQ-A1** примењен је и за синтезу **3DQ-A4** (модификација се огледа у коришћењу пет пута нижих концентрација/запремина реактаната). Тако је кондензацијом 2-хидрокси-4-метоксибензамида (66,9 mg, 400 μmol) са 2-(4-

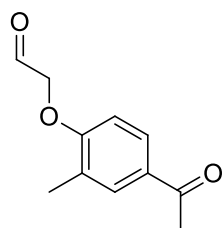
Експериментални део

метоксифенил)сирћетном киселином (66,5 mg, 400 μmol) добијен **3DQ-A4** као жута чврста супстанца (95 mg, 80,12 %).



4-амино-7-метокси-3-(4-метоксифенил)-2H-хромен-2-он (3DQ-A4). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,62 (s, 5H), 7,49 – 7,29 (m, 98H), 6,95 (s, 5H), 6,95 – 6,85 (m, 95H), 6,80 (d, $J = 24,4$ Hz, 97H), 5,68 – 5,55 (m, 96H), 3,86 – 3,73 (m, 288H), 2,57 – 2,43 (m, 288H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 165,46 (s), 162,73 (s), 159,17 (s), 156,07 (s), 155,20 (s), 128,88 – 128,66 (m), 128,55 (s), 127,98 (s), 113,21 – 113,00 (m), 111,28 (s), 107,19 (s), 101,39 (s), 99,45 (s), 56,23 – 55,83 (m), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -287,80 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 337,20 (s), 216,30 (s), 63,00 (s), 60,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 297,3053; нађено 297,1001.

Синтеза једињења 3DQ-Pro(Pro-R4a). У Schlenk-ову тубу додати су 2-(4-хлоро-2-метилфенокси)ацеталдехид 166,16 mg, 900 μmol), $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (3,8 mg, 5 mol%), ZnO (32 mg, 1,3 еквивалената), ТВАВ (144 mg, 1,5 еквивалената), триалкиламин 1 (0,3 mmol) and DMSO (3 mL). Затим је епрувета мешана на 100°C на уљаном купатилу, у атмосфери ваздуха током 6 сати, до потпуне потрошње полазног материјала. По завршетку реакције, реакциона смеша је охлађена до собне температуре, разблажена у диетил етру и испрана сланим раствором. Водена фаза је поново екстрахована диетил етром. Комбиновани органски екстракти осушени су преко Na_2SO_4 и концентровани у вакууму а резултујући остатак пречишћен је хроматографијом на колони силика гела (n -хексан: $\text{EtOAc} = 60:40$ v/v) да би се добио **3DQ-Pro(Pro-R4a)** као бледо жута чврста супстанца (140 mg, 81%).

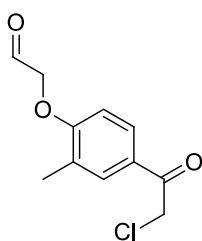


2-(4-ацетил-2-метилфенокси)ацеталдехид (3DQ-Pro(Pro-R4a)). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9,65 (s, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 6,95 (s, 1H), 5,01 – 4,82 (m, 2H), 2,60 – 2,43 (m, 9H), 2,41 – 2,27 (m, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 197,37 (s), 176,90 (s), 160,01 (s), 131,49 (s), 127,82 (s), 126,62 (s), 125,23 (s), 115,34 (s), 71,44 (s), 40,17 – 39,96 (m), 27,79 (s), 16,00 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 56,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 192,0786; нађено 192,2112.

Синтеза једињења 3DQ-Pro-R4a. У балон опремљен рефлуксним кондензатором, мешалицом и цревом за довод гаса додат је раствор **3DQ-Pro(Pro-R4a)** (125 mg, 650 μmol) у 625 mg сирћетне киселине. Након мерења балона са

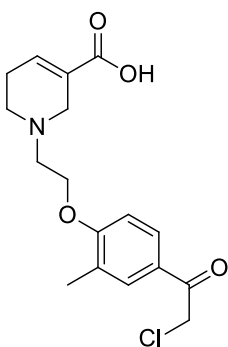
Докторска дисертација Незрине Куртановић

реактантима исти је постављен на ледено купатило да би потом уз снажно мешање био пропуштен брзи млаз хлора кроз раствор. Хлор је пропуштан док није упијена потребна количина гаса а реакциона смеша је држана на собној температури док течност није постала безбојна. На крају је реакциона смеша сипана у ледену воду где се производ **3DQ-Pro (Pro-R4a)** (140 mg, 95%) издвојио у облику уљане жуте течности. Након филтрирања и испирања дестилованом водом производ је прекристалисан из EtOH.



2-(4-(2-хлороацетил)-2-метилфенокси)ацеталдехид (**3DQ-Pro-R4a**). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,65 (s, 1H), 7,64 (d, $J = 12,6$ Hz, 2H), 6,98 (s, 1H), 5,14 – 4,95 (m, 2H), 4,61 – 4,48 (m, 2H), 2,57 – 2,43 (m, 6H), 2,40 – 2,27 (m, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 193,88 (s), 176,90 (s), 162,80 (s), 129,72 (s), 128,66 (s), 128,17 (s), 127,17 (s), 113,99 (s), 71,44 (s), 49,36 (s), 40,17 – 39,96 (m), 16,00 (s). $^{17}\text{O NMR}$ (68 MHz, DMSO- d_6) δ 56,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClO}_3$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 226,0397; нађено 226,6562.

Синтеза једињења 3DQ-R4a. Идентичан поступак који се претходно користио за синтезу **3DQ-R2a** примењен је и за синтезу **3DQ-R4a** (137,13 mg, 90%) као жуте чврсте супстанце, користећи **3DQ-Pro-R4a** (109 mg, 452 μmol) као полазно једињење.

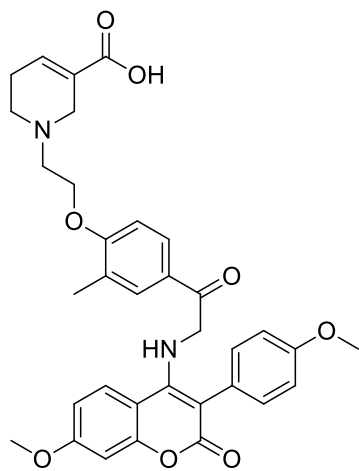


1-(2-(4-(2-хлороацетил)-2-метилфенокси)етил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (**3DQ-R4a**) $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,67 (d, $J = 33,0$ Hz, 5H), 7,63 – 7,54 (m, 1H), 7,31 (s, 3H), 6,98 (s, 3H), 4,61 – 4,47 (m, 6H), 4,06 (s, 1H), 4,06 – 3,91 (m, 8H), 2,98 (s, 3H), 2,88 (s, 3H), 2,68 (s, 3H), 2,64 – 2,34 (m, 25H), 2,32 – 2,08 (m, 15H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 193,88 (s), 166,47 (s), 162,78 (s), 142,15 (s), 129,97 (s), 128,63 (s), 128,13 (s), 126,73 (s), 126,55 (s), 113,79 (s), 67,45 (s), 54,64 (s), 53,79 (s), 49,36 (s), 48,52 (s), 40,17 – 39,96 (m), 26,10 (s), 16,00 (s). $^{15}\text{N NMR}$ (51 MHz, DMSO- d_6) δ -330,10 (s). $^{17}\text{O NMR}$ (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,20 (s), 253,90 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClNO}_4$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 333,1103; нађено 333,8055.

Синтеза једињења 3DQ-Pro-4a. Једињење **3DQ-Pro-4a** (103,94 mg, 86%), добијено је као наранџаста чврста супстанца коришћењем идентичног поступка као за

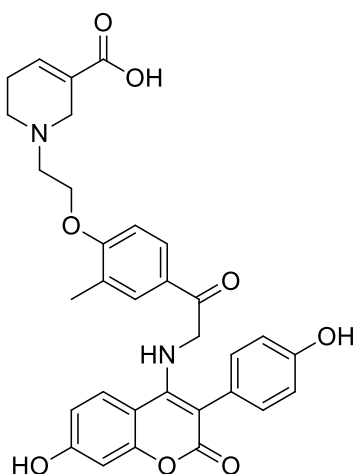
Експериментални део

3DQ-Pro-1a, употребом **3DQ-A4** (60 mg, 202 μmol) и **3DQ-R4a** (68,10 mg, 202 μmol) као полазних једињења.



1-(2-(4-(2-(7-метокси-3-(4-метоксифенил)-2-оксо-2H-хромен-4-ил)амино)ацетил)-2-метилфенокси)етил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (3DQ-Pro-4a). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,48-5,78 (m, 11H), 5,52-3,01 (m, 12H), 2,88-1,54 (m, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 194,37 (s), 164,78 (s), 163,02 - 156,82 (m), 154,89 (s), 149,76 (s), 127,98 (ddd, $J = 373,4$, 181,0, 116,8 Hz), 119,13 - 106,44 (m), 101,11 (d, $J = 265,0$ Hz), 76,04 (s), 63,46 (s), 60,23 - 53,42 (m), 51,87 (s), 16,00 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -271,80 (s), -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 337,35 - 336,84 (m), 253,90 (s), 216,30 (s), 78,00 (s), 63,00 (s), 60,40 (s), 13,00 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 337,35 - 336,84 (m), 253,90 (s), 216,30 (s), 78,00 (s), 63,00 (s), 60,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 598,2346; нађено 598,2389.

Синтеза једињења 3DQ-4a. Једињење **3DQ-Pro-4a** (39,48 mg, 66 μmol) подвргнуто је идентичном протоколу који је примењен и за препарат **3DQ-1a**, дајући **3DQ-4a** (35,75 mg, 95%) у облику бледо-смеђе чврсте супстанце.



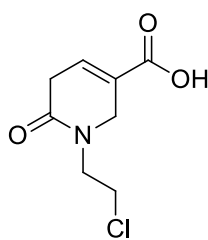
1-(2-(4-(2-(7-метокси-3-(4-метоксифенил)-2-оксо-2H-хромен-4-ил)амини)ацетил)-2-метилфенокси)етил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (3DQ-4a). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12,78 (s, 4H), 12,41 (s, 4H), 8,63 (s, 4H), 7,74 (s, 4H), 7,56 (d, $J = 1,5$ Hz, 8H), 7,31 (s, 4H), 7,28 - 7,16 (m, 8H), 7,05 (s, 4H), 6,91 - 6,71 (m, 10H), 6,69 (d, $J = 27,2$ Hz, 6H), 5,33 (s, 4H), 4,33 (d, $J = 23,3$ Hz, 8H), 4,23 (s, 1H), 4,21 (s, 4H), 4,14 - 3,98 (m, 8H), 3,23 (s, 4H), 2,96 (s, 4H), 2,79 (s, 4H), 2,57 (s, 5H), 2,55 - 2,43 (m, 28H), 2,42 - 2,29 (m, 13H), 2,29 - 2,16 (m, 8H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 194,37 (s), 166,47 (s), 164,78 (s), 160,41 (s), 160,20 (s), 157,66 (s), 155,00 (s), 149,76 (s), 142,15 (s), 130,10 - 129,88 (m), 129,26 (s), 128,71 (s), 127,94 (s), 126,77 (d, $J = 11,3$ Hz), 125,72 (s), 124,95 (s), 115,22 (s), 114,54 - 114,33 (m), 112,53 (s), 110,25 (s), 103,40 (s),

Докторска дисертација Незрине Куртановић

100,05 (s), 67,45 (s), 54,64 (s), 53,79 (s), 51,87 (s), 48,52 (s), 40,17 – 39,96 (m), 26,10 (s), 16,00 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -271,80 (s), -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) 337,35 – 336,84 (m), 253,90 (s), 216,30 (s), 93,30 (s), 88,50 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 570,2043; нађено 570,5911.

Синтетички протоколи за припрему једињења 3DQ-1b, 3DQ-2b и 3DQ-3b

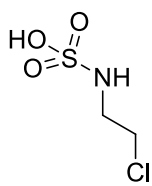
Синтеза једињења 3DQ-Pro(Pro-RR1) и 3DQ-Pro(Pro-RR2). Одређена количина 1,2-дихлороетана (61,85 mg, 625 μmol) растворена је у 45 mL апсолутног ацетона. Затим су додати калијум карбонат (25,4 mg, 2 mmol), калијум јодид (103,8 g, 625 μmol) и 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбонска киселина (88,20mg, 625 μmol) или сулфаминска киселина (61,24 mg, 625 μmol). Смеша је рефлугована 72h. После хлађења, производ (3DQ-Pro(Pro-RR1) или 3DQ-Pro(Pro-RR2), 120,90 mg, 95%, 94,76 mg, 95%, респективно) кристалисао је као бела чврсте супстанца из добијеног раствора.



1-(2-хлороетил)-6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна

киселина (3DQ-Pro(Pro-RR1)). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,24 (s, 1H), 7,44 (s, 1H), 4,20 (s, 1H), 3,85 (s, 1H), 3,76 – 3,72 (m, 2H), 3,61 (s, 1H), 3,18 (s, 1H), 2,94 – 2,76 (m, 2H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 167,89 (s), 166,47 (s), 130,74 (s), 124,96 (s),

49,61 (s), 42,77 (s), 41,63 (s), 40,17 – 39,96 (m), 33,68 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 346,00 (s), 337,20 (s), 253,90 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 203,0317; нађено 203,0343.



(2-хлороетил)сулфаминска киселина ((3DQ-Pro(Pro-RR2)). ^1H NMR (500

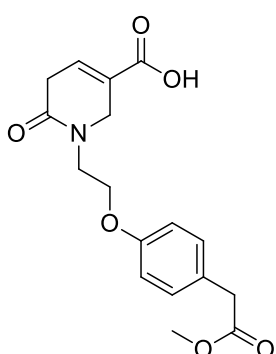
MHz, DMSO- d_6) δ 12,23 (s, 2H), 4,85 (s, 2H), 3,55 – 3,51 (m, 3H), 3,07 – 3,02 (m, 3H), 2,57 – 2,43 (m, 11H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 42,78 (s), 41,09 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -114,90 (s). ^{17}O

NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 150,00 (s), 143,37 – 142,60 (m), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_8\text{H}_6\text{ClNO}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 158,9813; нађено 158,9877.

Синтеза једињења 3DQ-Pro-RR1 и 3DQ-Pro-RR2. Смеша безводног DMF-а (4 mL) и фино млевеног безводног K_2CO_3 (565 mg, 5 mmol) додат је метил 2-(4-хидроксифенил)ацетат (415.5 mg, 2,5 mmol), било за синтезу 3DQ-Pro-RR1 или 3DQ-Pro-RR2, да би потом смеша била загревана до 100°C. Постепено додавање било 3DQ-Pro(Pro-RR1) (509,05 mg, 2,5 mmol) или 3DQ-Pro(Pro-RR2) (398,95 mg, 2,5 mmol)

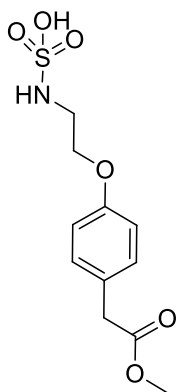
Експериментални део

извршено је током 10 минута. Дозвољено је да реакција траје 1,5 сат на 100°C. Након филтрирања филтрат је упарен ради уклањања вишка DMF до добијања смеђег уљастог остатка. Талог из филтрације растворен је у 10 mL воде и екстрахован два пута са 5 mL етилацетата. Са друге стране, уљани остатак растворен је добијеним екстрактима етил ацетата који је затим испран коришћењем неколико порција воденог раствора NaCl. Раствор етилацетата је осушен и упарен да би се добило смеђе уље чија је TLC анализа из етилацетат као елуент дала једну тачку на громаторграму. Производи (**3DQ-Pro-RR1** или **3DQ-Pro-RR2**, 791,68 mg, 95%; 687,09 mg, 95%; респективно) пречишћени су на колони силицијум диоксида (*n*-хексан: EtOAc = 9: 1 v/v).



1-(2-(4-(2-метокси-2-оксоетил)фенокси)етил)-6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (**3DQ-Pro-RR1**).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,54 – 7,35 (m, 39H), 7,35 – 7,26 (m, 2H), 6,94 – 6,75 (m, 27H), 4,26 – 4,05 (m, 41H), 3,95 (d, J = 10,8 Hz, 28H), 3,82 – 3,69 (m, 40H), 3,50 – 3,36 (m, 27H), 3,23 (s, 14H), 2,94 – 2,76 (m, 27H), 2,57 – 2,43 (m, 80H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172,77 (s), 167,89 (s), 166,47 (s), 157,70 (s), 130,74 (s), 130,31 – 129,91 (m), 127,95 (s), 124,96 (s), 114,60 – 114,39 (m), 66,18 (s), 51,82 (s), 46,03 (s), 42,77 (s), 40,85 (s), 40,17 – 39,96 (m), 33,68 (s). $^{15}\text{N NMR}$ (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s). $^{17}\text{O NMR}$ (68 MHz, DMSO- d_6) δ 364,20 (s), 346,00 (s), 337,20 (s), 253,90 (s), 136,60 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 333,1249; нађено 333,3465.

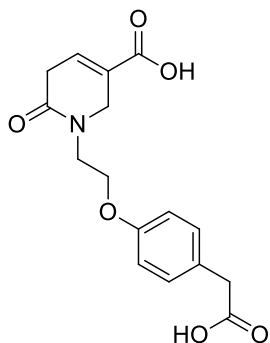


(2-(4-(2-метокси-2-оксоетил)фенокси)етил)сулфаминска киселина (**3DQ-Pro-RR2**). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,02-6,26 (m, 4H), 4,78-1,66 (m, 14H), 1,62-0,36 (m, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172,77 (s), 157,80 (s), 135,42-123,65 (m), 118,92-110,66 (m), 70,91 (s), 61,36 (s), 51,82 (s), 41,35 (t, J = 46,7 Hz), 12,23 (s). $^{15}\text{N NMR}$ (51 MHz, DMSO- d_6) δ -334,50 (s). $^{17}\text{O NMR}$ (68 MHz, DMSO- d_6) δ 364,20 (s), 136,60 (s), 78,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 289,0614; нађено 289,0621.

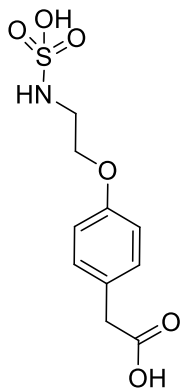
Синтеза једињења 3DQ-RR1 и 3DQ-RR2. Раствору **3DQ-Pro-RR1** или **3DQ-Pro-RR2** (666,67 и 578,60 mg, респективно, 2 mmol) у анхидрованом DMF (6 mmol, 0,6 mL) додат је LiCl (6 mmol). Смеша је подвргнута микроталасном зрачењу (545 W, 160°C) у

Докторска дисертација Незрине Куртановић

периоду од 30 min. Након завршетка реакције, 10 mL HCl (0,1 M) додато је у реакциону смешу на 0°C, раствор је потом филтриран да би се добио чврст производ или производ екстрахован са етилацетатом (3 × 15 mL), па је комбиновани раствор осушен преко анхидрованог Na₂SO₄ и упарен под редукованим притиском да се добије чврст остатак. Чврсте суспензије смеђе боје **3DQ-RR1** и **3DQ-RR2** пречишћене су рекристализацијом у 95% етанолу (606,31 mg, 95%; 550,10 mg, 95%; респективно).



1-(2-(4-(карбоксиметил)фенокси)етил)-6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (3DQ-RR1). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,99 (s, 2H), 12,86 (s, 2H), 7,53 – 7,33 (m, 6H), 6,99 – 6,79 (m, 4H), 4,24 – 4,14 (m, 5H), 4,06 (s, 3H), 3,86 (s, 2H), 3,57 – 3,44 (m, 4H), 3,23 (s, 2H), 2,94 – 2,76 (m, 4H), 2,57 – 2,43 (m, 12H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174,99 (s), 156,90 (s), 129,63 (t, *J* = 68,0 Hz), 120,35 – 108,11 (m), 70,82 (s), 54,21 (s), 44,14 (s), 34,26 (s), 16,41 (s). ¹⁵N NMR (51 MHz, DMSO-*d*₆) δ -287,10 (s). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 346,00 (s), 337,20 (s), 271,06 – 270,29 (m), 253,90 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS *m/z* израчунато за C₁₆H₁₇NO₆ [M + H]⁺: 319,1183; нађено 319,3108.

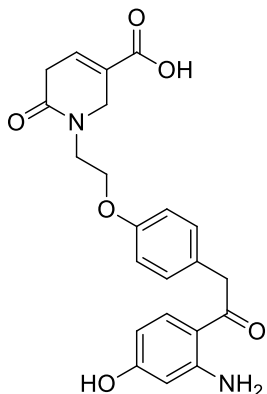


2-(4-(2-(сулфамино)етокси)фенил)сирћетна киселина (3DQ-RR2). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,80 (s, 5H), 7,42 – 7,23 (m, 10H), 6,98 – 6,78 (m, 10H), 4,80 (s, 5H), 4,13 – 4,09 (m, 8H), 3,49 – 3,35 (m, 10H), 3,17 (d, *J* = 12,0 Hz, 9H), 2,57 – 2,43 (m, 30H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174,99 (s), 156,90 (s), 135,42 – 123,92 (m), 118,55 – 110,30 (m), 70,91 (s), 61,36 (s), 42,45 (t, *J* = 159,2 Hz), 12,23 (s). ¹⁵N NMR (51 MHz, DMSO-*d*₆) δ -114,90 (s). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 271,06 – 270,29 (m), 150,00 (s), 143,37 – 142,60 (m), 78,00 (s), 13,00 (s). MS *m/z* израчунато за C₁₀H₁₃NO₆S [M + H]⁺: 275,0549; нађено 275,2865.

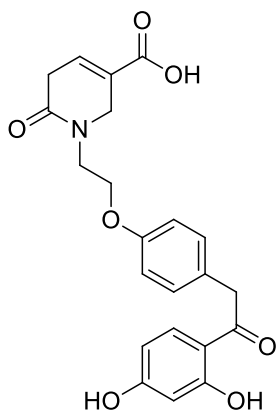
Синтеза једињења 3DQ-RB1, 3DQ-RB2 и 3DQ-RB3. Реактанти 3-аминофенол (98 mg, 896 μmol) и **3DQ-RR1** (285,92 mg, 896 μmol) за потребе синтезе **3DQ-RB1**, или ресорцинол (99 mg, 896 μmol) и **3DQ-RR1** или **3DQ-RR2** (285,92 и 246,45 mg, односно 896 μmol) за потребе синтезе **3DQ-RB2** односно **3DQ-RB3**, растворени су у свеже дестилованом BF₃·OEt (0,32 mol еквивалената) под аргоном. Смеша је мешана и загревана на воденом купатилу један сат на 85°C. Деоксибензоини (**3DQ-RB1**, **3DQ-RB2** или **3DQ-RB3**; 334,42 mg, 91%; 327,85 mg, 89%; 302,58 mg, 92%, респективно)

Експериментални део

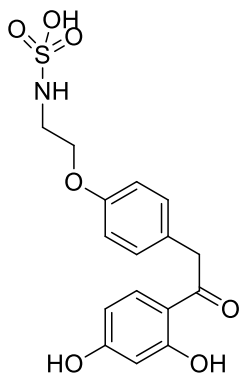
директно су добијени као наранџасти кристали кристализацијом из реакционе смеше и изоловани темељним испирањем сакупљеног материјала воденим раствором NaOAc (12 g/cm^3) и рекристализацијом.



1-(2-(4-(2-(2-амино-4-хидроксифенил)-2-оксоетил)фенокси)етил)-6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбонска киселина (3DQ-RB1). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,35 (s, 11H), 7,47 (s, 8H), 7,47 – 7,27 (m, 38H), 7,06 – 6,87 (m, 26H), 6,87 – 6,79 (m, 20H), 6,29 (d, $J = 15,7$ Hz, 23H), 4,31 (s, 2H), 4,23 (dd, $J = 46,2, 16,7$ Hz, 42H), 4,19 – 4,16 (m, 17H), 4,19 – 4,05 (m, 41H), 3,76 (s, 9H), 3,37 (s, 9H), 2,94 – 2,76 (m, 23H), 2,57 – 2,43 (m, 67H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,00 (s), 167,89 (s), 166,47 (s), 162,82 (s), 156,93 (s), 152,83 (s), 130,73 (d, $J = 2,6$ Hz), 130,38 – 129,98 (m), 127,50 (s), 124,96 (s), 115,71 – 115,31 (m), 110,06 (s), 106,18 (s), 102,96 (s), 66,18 (s), 47,52 (s), 46,03 (s), 42,77 (s), 40,17 – 39,96 (m), 33,68 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s), -308,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 346,00 (s), 337,20 (s), 253,90 (s), 88,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 410,1536; нађено 410,4271.



1-(2-(4-(2-(2,4-дихидроксифенил)-2-оксоетил)фенокси)етил)-6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбонска киселина (3DQ-RB2). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,48 (s, 6H), 8,35 (s, 6H), 7,47 (s, 4H), 7,47 – 7,27 (m, 20H), 7,07 – 6,87 (m, 12H), 6,43 (d, $J = 3,0$ Hz, 12H), 4,31 (s, 1H), 4,27 (d, $J = 32,9$ Hz, 12H), 4,20 – 4,16 (m, 10H), 4,16 – 4,06 (m, 13H), 3,77 (s, 5H), 3,37 (s, 5H), 2,94 – 2,76 (m, 12H), 2,57 – 2,43 (m, 35H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 202,22 (s), 167,89 (s), 166,47 (s), 164,55 (s), 164,20 (s), 156,93 (s), 131,68 (s), 130,74 (s), 130,38 – 129,98 (m), 127,50 (s), 124,96 (s), 115,71 – 115,31 (m), 114,11 (s), 108,44 (s), 103,37 (s), 66,18 (s), 47,52 (s), 46,03 (s), 42,77 (s), 40,17 – 39,96 (m), 33,68 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 346,00 (s), 337,20 (s), 253,90 (s), 93,30 (s), 91,50 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 411,1302; нађено 411,4027.



2-(4-(2-(2,4-дихидроксифенил)-2-

оксоетил)фенокси)етил)сулфаминска киселина (**3DQ-RB3**). ^1H

NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,10 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,35 (s, 1H),

7,47 – 7,28 (m, 3H), 6,98 – 6,78 (m, 2H), 6,43 (d, $J = 16,6$ Hz, 2H),

5,06 (s, 1H), 4,28 – 4,10 (m, 4H), 3,19 (d, $J = 31,6$ Hz, 2H), 2,57 – 2,43

(m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 202,22 (s), 164,55 (s),

164,20 (s), 156,93 (s), 131,68 (s), 130,38 – 129,98 (m), 127,50 (s),

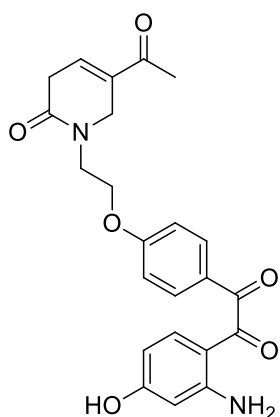
115,71 – 115,31 (m), 114,11 (s), 108,44 (s), 103,37 (s), 67,10 (s), 47,52

(s), 40,97 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -114,90 (s). ^{17}O NMR (68

MHz, DMSO- d_6) δ 150,00 (s), 143,37 – 142,60 (m), 93,30 (s), 91,50 (s), 78,00 (s), 13,00 (s).

MS m/z израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_7\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 336,0719; нађено 367,3703.

Синтеза једињења 3DQ-R1b, 3DQ-R2b и 3DQ-R3b. У трограли балон са округлим дном од 25 mL додати су 1,4-диоксан (380 μL), селен диоксид (70 mg, 632 μmol) и вода (20 μL). Раствор је мешан и рефлукуван на 110°C све док чврста супстанца није прешла у раствор, након чега су додати **3DQ-RB1**, **3DQ-RB2** или **3DQ-RB3** (259,21 mg; 259,83 mg; 231,99 mg, 632 μmol , респективно). Добијена смеша је рефлукувана уз даље мешање током четири сата. Из врућег раствора декантован је сталожени селен док су диоксан и вода (у односу 19:1) уклоњени дестилацијом кроз кратку колону. Производи **3DQ-R1b**, **3DQ-R2b** или **3DQ-R3b** (240,12 mg, 90%; 237,43 mg, 89%; 212,10 mg, 88%, респективно) су добијени као жути кристали из фракција које су кључале на 95–97°C, након дестилације под смањеним притиском и накнадне рекристализације из MeOH.



1-(4-(2-(3-ацетил-6-оксо-5,6-дихидропиридин-1(2H)-

ил)етокси)фенил)-2-(2-амино-4-хидроксифенил)етан-1,2-дион

(**3DQ-R1b**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,76 (s, 39H), 7,89 –

7,70 (m, 80H), 7,47 (t, $J = 8,8$ Hz, 120H), 7,23 – 7,05 (m, 107H),

7,05 – 6,96 (m, 14H), 6,43 (s, 4H), 6,39 (d, $J = 27,9$ Hz, 76H), 4,30

– 4,13 (m, 79H), 3,81 (d, $J = 7,0$ Hz, 80H), 3,56 (s, 31H), 3,46 (s,

50H), 2,94 – 2,76 (m, 80H), 2,57 – 2,43 (m, 236H), 2,35 – 2,21 (m,

119H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 196,58 (s), 192,77 (s),

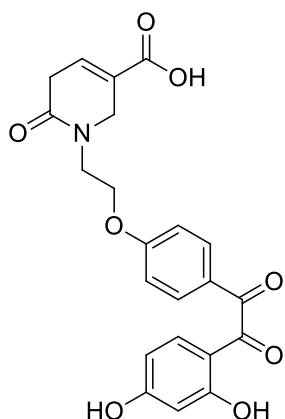
167,89 (s), 166,47 (s), 164,89 (s), 162,22 (s), 155,43 (s), 132,25 – 132,04 (m), 131,79 (s),

130,74 (s), 128,89 (s), 124,96 (s), 114,39 – 114,17 (m), 107,23 (s), 105,72 (s), 101,81 (s),

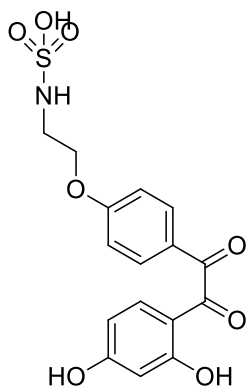
66,18 (s), 46,03 (s), 42,77 (s), 40,17 – 39,96 (m), 33,68 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ

Експериментални део

-287,10 (s), -308,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 473,80 (s), 346,00 (s), 88,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 422,1572; нађено 422,4363.



1-(2-(4-(2-(2,4-дихидроксифенил)-2-оксоацетил)фенокси)етил)-6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (3DQ-R2b). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,60 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,82 – 7,62 (m, 2H), 7,46 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,11 – 6,91 (m, 2H), 6,54 (d, $J = 38,1$ Hz, 2H), 4,31 – 4,17 (m, 2H), 4,09 (s, 1H), 3,80 (s, 1H), 3,58 (s, 1H), 3,24 (s, 1H), 2,94 – 2,76 (m, 2H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 195,28 (s), 192,77 (s), 167,89 (s), 166,47 (s), 165,67 (s), 164,89 (s), 163,80 (s), 132,50 (s), 132,25 – 132,04 (m), 130,74 (s), 128,89 (s), 124,96 (s), 114,39 – 114,17 (m), 111,60 (s), 108,22 (s), 102,62 (s), 66,18 (s), 46,03 (s), 42,77 (s), 40,17 – 39,96 (m), 33,68 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 346,00 (s), 337,20 (s), 253,90 (s), 95,80 (s), 93,30 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 425,1137; нађено 425,3920.

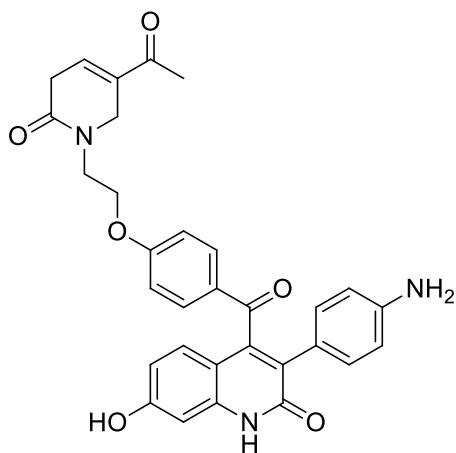


(2-(4-(2-(2,4-дихидроксифенил)-2-оксоацетил)фенокси)етил)сулфаминска киселина (3DQ-R3b). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,43 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,85 – 7,65 (m, 2H), 7,45 (s, 1H), 7,12 – 6,92 (m, 2H), 6,49 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H), 6,03 (s, 1H), 4,20 – 4,04 (m, 2H), 3,18 (d, $J = 17,5$ Hz, 2H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 195,28 (s), 192,77 (s), 165,67 (s), 164,89 (s), 163,80 (s), 132,50 (s), 132,25 – 132,04 (m), 128,89 (s), 114,39 – 114,17 (m), 111,60 (s), 108,22 (s), 102,62 (s), 67,10 (s), 40,97 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -114,90 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 150,00 (s), 143,37 – 142,60 (m), 95,80 (s), 93,30 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_8\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 381,0554; нађено 381,3696.

4-(4-(2-(3-ацетил-6-оксо-5,6-дихидропиридин-1(2H)-ил)етокси)бензоил)-3-(4-аминофенил)-7-хидроксикинолин-2(1H)-он (3DQ-1b), *5-ацетил-1-(2-(4-(3-(4-аминофенил)-7-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-4-карбонил)фенокси)етил)-1,6-дихидропиридин-2(3H)-он (3DQ-2b)* и *(2-(4-(3-(4-аминофенил)-7-хидрокси-2-оксо-2H-*

Докторска дисертација Незрине Куртановић

хромен-4-карбонил)фенокси)етил)сулфаминска киселина (**3DQ-3b**). У мешани раствор **3DQ-R1b** (102,59 mg, 243 μmol), **3DQ-R2b** (103,30 mg, 243 μmol) или **3DQ-R3b** (92,67 mg, 243 μmol) у безводном ацетону (20 mL) додат је безводни K_2CO_3 (34,55 mg, 250 μmol) па је лагано додавана 2-(4-аминофенил)сирћетна киселина (36,73 mg, 243 μmol). Реакциона смеша је затим снажно мешана на 80°C током 4 сата. По завршетку реакције, вишак растварача је уклоњен под вакуумом након чега је додат хладан 5% водени раствор HCl (30 mL). Чврсти талог (**3DQ-1b**, **3DQ-2b** или **3DQ-3b**, 118,79 mg, 91%; 117,90 mg, 90%; 107,29 mg, 89% респективно) је филтриран, испран водом, осушен и кристалисан из диетил етра, након чега су се добио производ у виду светло жутих кристала.

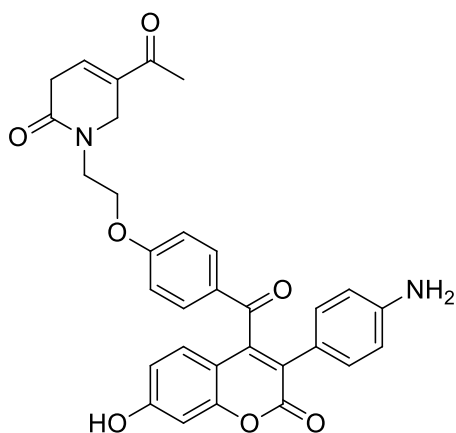


4-(4-(2-(3-ацетил-6-оксо-5,6-дихидропиридин-1(2H)-ил)етокси)бензоил)-3-(4-аминофенил)-7-

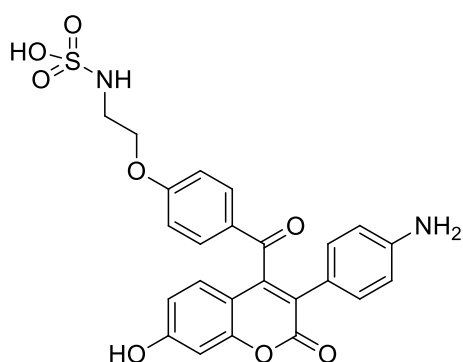
хидроксикинолин-2(1H)-он (**3DQ-1b**). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,07 (s, 3H), 7,80 – 7,61 (m, 6H), 7,50 (s, 3H), 7,31 – 7,17 (m, 6H), 7,15 (s, 3H), 7,06 – 6,91 (m, 6H), 6,83 (s, 3H), 6,70 (s, 4H), 6,60 – 6,45 (m, 6H), 5,25 (s, 3H), 5,00 – 4,87 (m, 6H), 4,37 (s, 3H), 4,23 – 4,07 (m, 6H), 3,89 (s, 1H), 3,84 (d, $J = 41,5$ Hz, 5H), 3,25 (s, 3H), 2,94 – 2,76 (m, 6H), 2,57 – 2,43 (m,

18H), 2,40 – 2,27 (m, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 197,63 (s), 196,34 (s), 167,89 (s), 163,75 (s), 163,20 (s), 159,14 (s), 151,79 (s), 138,83 (d, $J = 21,1$ Hz), 138,73 – 138,54 (m), 134,45 (s), 133,19 (s), 132,28 – 131,97 (m), 131,05 (s), 130,44 – 130,04 (m), 128,83 (s), 121,76 (s), 114,36 (s), 113,98 – 113,77 (m), 112,54 – 112,33 (m), 111,09 (s), 103,00 (s), 66,18 (s), 46,33 (s), 46,03 (s), 40,17 – 39,96 (m), 33,68 (s), 27,20 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -242,70 (s), -287,10 (s), -310,30 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 469,30 (s), 96,15 (d, $J = 386,2$ Hz), 78,00 (s), 15,30 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 537,1916; нађено 537,5698.

Експериментални део



5-ацетил-1-(2-(4-(3-(4-аминофенил)-7-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-4-карбонил)фенокси)етил)-1,6-дихидропиридин-2(3H)-он (**3DQ-2b**) ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,68 – 7,57 (m, 30H), 7,47 (s, 29H), 7,26 (s, 2H), 7,26 – 7,06 (m, 57H), 7,06 – 6,86 (m, 39H), 6,64 (dd, $J = 48,6, 15,3$ Hz, 77H), 6,58 – 6,55 (m, 5H), 6,58 – 6,50 (m, 6H), 5,73 (s, 19H), 5,43 – 5,29 (m, 38H), 4,26 – 4,07 (m, 58H), 3,96 (d, $J = 19,6$ Hz, 39H), 3,28 (s, 19H), 2,94 – 2,76 (m, 38H), 2,41 – 2,28 (m, 57H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 197,63 (s), 196,34 (s), 167,89 (s), 163,20 (s), 160,53 (s), 159,60 (s), 155,18 (s), 152,93 (s), 144,68 (s), 133,73 (s), 133,19 (s), 132,28 – 131,97 (m), 131,05 (s), 128,99 (s), 128,77 – 128,56 (m), 119,48 (s), 115,09 (s), 113,98 – 113,77 (m), 113,50 – 113,28 (m), 112,22 (s), 103,71 (s), 66,18 (s), 46,33 (s), 46,03 (s), 33,68 (s), 27,20 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s), -310,30 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 473,80 (s), 469,30 (s), 346,00 (s), 337,20 (s), 216,30 (s), 93,30 (s), 78,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 538,1782; нађено 538,1755.



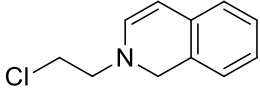
(2-(4-(3-(4-аминофенил)-7-хидрокси-2-оксо-2H-хромен-4-карбонил)фенокси)етил)сулфаминска киселина (**3DQ-3b**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 197,63 (s), 163,20 (s), 160,53 (s), 159,60 (s), 155,18 (s), 152,93 (s), 144,68 (s), 133,73 (s), 132,28 – 131,97 (m), 128,99 (s), 128,77 – 128,56 (m), 119,48 (s), 115,09 (s), 113,98 – 113,77 (m), 113,50 – 113,28 (m), 112,22 (s), 103,71 (s), 67,10 (s), 40,97 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,28 (s), 177,02 (s), 163,36 (s), 161,63 – 152,77 (m), 136,37 (s), 135,18 – 125,78 (m), 123,38 (s), 119,51 – 107,64 (m), 103,98 (s), 98,51 (s), 73,50 (s), 56,34 (s), 40,01 (s), 14,68 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -114,90 (s), -310,30 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 469,30 (s), 337,20 (s), 216,30 (s), 150,00 (s), 143,37 – 142,60 (m), 93,30 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 469,0947; нађено 469,4971.

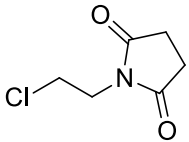
Синтетички протоколи за припрему једињења **3DQ-1c** и **3DQ-2c**

Синтеза једињења **3DQ-C1** и **3DQ-C2**. Одређена количина 2-хлороетан-1-ола (50 mg, 625 μmol) растворена је у 45 mL апсолутног ацетона. Затим су додати калијум

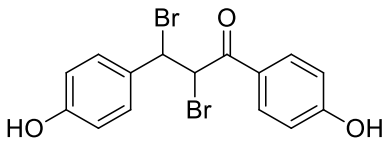
Докторска дисертација Незрине Куртановић

карбонат (25,4 mg, 2 mmol), калијум јодид (103,8 mg, 625 μmol) и 1,2-дихидроизокинолин (за потребе синтезе **3DQ-C1**, 82,5 mg, 625 μmol) или пиролидин-2,5-дион (за потребе синтезе **3DQ-C2**, 62 mg, 625 μmol). Смеша је рефлугована 72 h. После хлађења, производ (**3DQ-C1** или **3DQ-C2**, 115 mg, 95%, 95,6 mg, 95 %, респективно) је кристалисао из добијеног раствора као бела чврста супстанца.

 2-(2-хлороетил)-1,2-дихидроизокинолин (**3DQ-C1**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,40 (s, 2H), 7,23 – 7,09 (m, 6H), 7,07 (s, 2H), 5,32 (s, 2H), 4,51 – 4,37 (m, 4H), 3,63 – 3,59 (m, 3H), 2,94 (d, $J = 4,9$ Hz, 4H), 2,57 – 2,43 (m, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 140,38 (s), 133,01 (s), 132,42 (s), 128,16 (s), 127,21 (s), 126,58 (s), 125,59 (s), 102,97 (s), 52,74 (s), 51,86 (s), 41,07 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClN}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 193,0658; нађено 193,6727.

 1-(2-хлороетил)пиролидин-2,5-дион (**3DQ-C2**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 3,77 – 3,59 (m, 1H), 3,58 – 3,39 (m, 1H), 2,75 – 2,61 (m, 2H), 2,57 – 2,43 (m, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 178,38 – 178,16 (m), 43,37 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,35 (s), 28,32 – 28,01 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -231,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 371,37 – 370,60 (m), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_6\text{H}_8\text{ClNO}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 161,5862; нађено 161,0244.

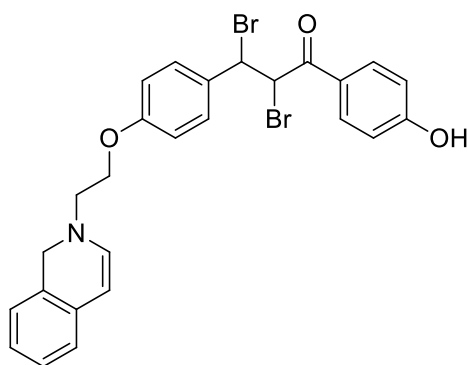
Синтеза једињења 3DQ-C3. У атмосфери аргона раствору 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-метоксифенил)пропан-1-она (428 mg, 1 mmol) у сувом дихлорометану на 0°C, додат је бор трибромид (501 mg, 2 mmol) кап по кап. Добијена смеша је затим рефлугована 3 сата и сипана у смешу лед/вода након што је охлађена на собну температуру. Водени слој је екстрахован етил ацетатом. Комбиновани органски слојеви су испрани сланим раствором, осушени преко безводног Na_2SO_4 , а затим филтрирани и концентровани у вакууму. Резултујући производ **3DQ-C3** (380 mg, 95%) пречишћен је хроматографијом на колони ($\text{Et}_2\text{O}:\text{EtOAc} = 50:50$ v/v) у облику смеђе чврсте супстанце.

 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-хидроксифенил)пропан-1-он (**3DQ-C3**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,16 (s, 7H), 7,61 – 7,41 (m, 14H), 7,32 – 7,13 (m, 14H), 7,01 – 6,90 (m, 12H), 6,90 – 6,70 (m, 16H), 5,76 (s, 1H), 5,71 (d, $J = 34,8$ Hz, 13H), 3,99 (s, 7H), 2,57 – 2,43 (m, 41H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 191,40 (s), 162,91 (s), 156,75 (s), 133,00 (s),

Експериментални део

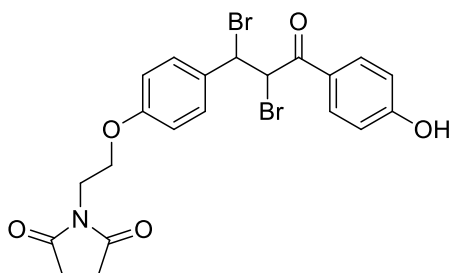
130,66 – 130,27 (m), 128,83 (s), 126,48 – 126,08 (m), 116,81 – 116,43 (m), 116,43 – 116,10 (m), 50,07 (s), 49,60 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 88,50 (s), 80,50 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{BrO}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 397.9153; нађено 400.0620.

Синтеза једињења **3DQ-C3-1**, **3DQ-C3-2**, **3DQ-C3-3** и **3DQ-C3-4**. Смеси безводног DMF-а (4 mL) и фино млевеног безводног K_2CO_3 (565 mg, 5 mmol) додат је реактант **3DQ-C3** (150 mg, 375 μmol), за потребе синтезе **3DQ-C3-1** и **3DQ-C3-3**, односно **3DQ-C3-2** и **3DQ-C3-4**, да би потом било извршено загревање до 100°C . Постепено додавање **3DQ-C1** (72.6 mg, 375 μmol) (за потребе синтезе **3DQ-C3-1** и **3DQ-C3-3**), или **3DQ-C2** (60.4 mg, 375 μmol) (за потребе синтезе **3DQ-C3-2** и **3DQ-C3-4**) вршено је током 10 мин. Потом је реакција остављена да се одвија током 1,5 сата на 100°C . Након филтрације филтрат је упарен да би се уклонио већи део DMF-а, до добијања жутог остатка. Талог из филтрације растворен је у 10 mL воде и екстрахован два пута са 5 mL етилацетата. Рутинска TLC квантификација (TLC: Et₂O: EtOAc = 70:30 v/v као елуент) сугерисала је да је сирови производ меша. Због тога је извршено пречишћавање флеш хроматографијом на силика гелу (Et₂O:EtOAc = 50:50 v/v) да би се добили **3DQ-C3-1** (100 mg, 48%) и **3DQ-C3-3** (104,4 mg, 50%), или **3DQ-C3-2** (86,7 mg, 44%) и **3DQ-C3-4** (102,4 mg 52%). Жути кристали (**3DQ-C3-1**, **3DQ-C3-2**, **3DQ-C3-3** или **3DQ-C3-4**) добијени су из метанола.



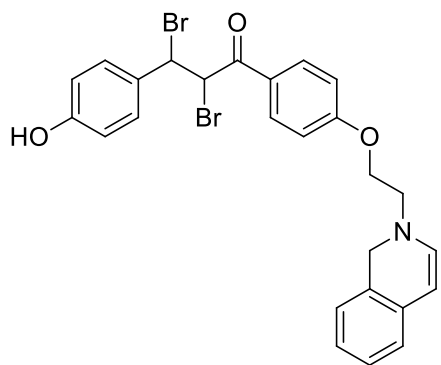
2,3-дибромо-1-(4-хидроксифенил)-3-(4-(2-(изохинолин-2(1H)-ил)етокси)фенил)пропан-1-он (**3DQ-C3-1**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,69 – 7,48 (m, 6H), 7,34 (t, $J = 8,5$ Hz, 9H), 7,16 – 7,06 (m, 9H), 7,06 – 6,95 (m, 8H), 6,95 – 6,75 (m, 6H), 5,71 (d, $J = 34,8$ Hz, 5H), 5,67 – 5,60 (m, 1H), 5,39 (s, 3H), 4,55 (s, 3H), 4,42 (s, 3H), 4,25 – 4,09 (m, 6H), 3,38 (s, 3H), 2,98 (s, 3H), 2,57 – 2,43 (m, 17H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 191,40 (s), 162,91 (s), 157,07 (s), 140,38 (s), 134,88 (s), 133,01 (s), 132,42 (s), 130,66 – 130,27 (m), 128,83 (s), 128,16 (s), 127,21 (s), 126,58 (s), 125,70 – 125,23 (m), 116,81 – 116,42 (m), 115,32 – 114,92 (m), 102,97 (s), 66,99 (s), 51,86 (s), 50,60 (s), 50,07 (s), 49,60 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -281,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 88,50 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 555,0045; нађено 557,2737.

Докторска дисертација Незрине Куртановић



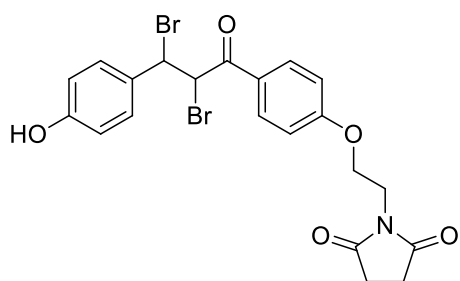
1-(2-(4-(1,2-дибромо-3-(4-хидроксифенил)-3-оксoproпил)фенокси)етил)пиролидин-2,5-дион (3DQ-C3-2). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,95 – 6,22 (m, 9H), 5,71 (d, J = 34,8 Hz, 2H), 4,91 – 1,82 (m, 8H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 191,40

(s), 178,36 – 178,14 (m), 162,91 (s), 157,07 (s), 134,88 (s), 130,66 – 130,27 (m), 128,83 (s), 125,63 – 125,23 (m), 116,81 – 116,42 (m), 115,32 – 114,92 (m), 67,16 (s), 50,07 (s), 49,60 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,01 (s), 28,61 – 28,21 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ - 231,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 371,37 – 370,60 (m), 88,50 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{NO}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 524,9610; нађено 525,1873.



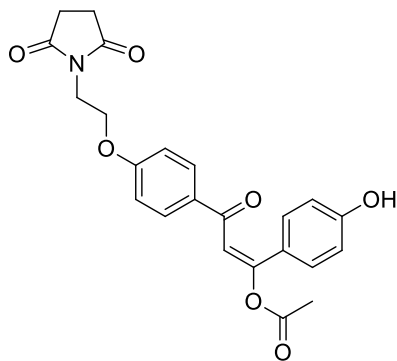
2,3-дибромо-3-(4-хидроксифенил)-1-(4-(2-(изохинолин-2(1H)-ил)етокси)фенил)пропан-1-он (3DQ-C3-3). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,25 (s, 1H), 7,94 – 7,74 (m, 2H), 7,38 (s, 1H), 7,32 – 6,98 (m, 8H), 6,89 – 6,70 (m, 2H), 5,74 (s, 1H), 5,67 (s, 1H), 5,32 (s, 1H), 4,50 (s, 1H), 4,43 (s, 1H), 4,20 – 4,16 (m, 2H), 3,53 (s, 1H), 2,73 (s, 1H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz,

DMSO- d_6) δ 191,40 (s), 163,56 (s), 156,75 (s), 140,38 (s), 133,01 (d, J = 0,8 Hz), 132,42 (s), 130,75 (s), 129,75 – 129,54 (m), 128,16 (s), 127,21 (s), 126,58 (s), 126,40 – 126,08 (m), 125,59 (s), 116,49 – 116,10 (m), 115,31 – 115,10 (m), 102,97 (s), 66,99 (s), 51,86 (s), 50,60 (s), 50,07 (s), 49,60 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) -287,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 80,50 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 557,0024; нађено 557,2737.



1-(2-(4-(2,3-дибромо-3-(4-хидроксифенил)пропаноил)фенокси)етил)пиролидин-2,5-дион (3DQ-C3-4). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,29 (s, 1H), 7,94 – 7,73 (m, 2H), 7,23 – 7,08 (m, 2H), 7,08 – 6,91 (m, 2H), 6,91 – 6,72 (m, 2H), 5,74 (s, 1H), 5,67 (s, 1H), 4,34 – 4,18 (m, 2H),

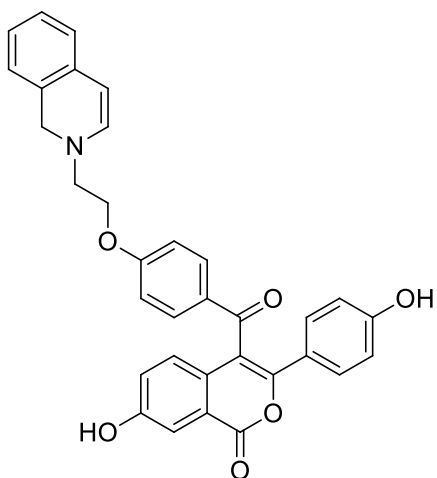
3,74 – 3,58 (m, 2H), 2,83 – 2,69 (m, 4H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 191,40 (s), 178,36 – 178,14 (m), 163,56 (s), 156,75 (s), 133,00 (s), 130,75 (s), 129,75 – 129,54 (m), 126,48 – 126,08 (m), 116,49 – 116,10 (m), 115,31 – 115,10 (m), 67,16 (s), 50,07 (s), 49,60 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,01 (s), 28,61 – 28,21 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO-



(*E*)-3-(4-(2-(2,5-диоксопиролидин-1-ил)етокси)фенил)-1-(4-хидроксифенил)-3-оксопроп-1-енил ацетат (**3DQ-Pro-2c**). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,42 (s, 1H), 7,93 – 7,74 (m, 2H), 7,17 – 6,95 (m, 5H), 6,82 – 6,62 (m, 2H), 4,23 – 4,07 (m, 2H), 3,72 – 3,56 (m, 2H), 2,82 – 2,68 (m, 4H), 2,57 – 2,43 (m, 6H), 2,20 – 2,06 (m, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz,

$\text{DMSO-}d_6$) δ 185,50 (s), 178,36 – 178,14 (m), 169,79 (s), 167,64 (s), 163,58 (s), 161,47 (s), 132,07 (s), 130,71 – 130,49 (m), 129,19 – 128,79 (m), 123,12 (s), 115,86 – 115,46 (m), 114,66 – 114,45 (m), 111,33 (s), 67,16 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,01 (s), 28,61 – 28,21 (m), 20,91 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -231,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 438,00 (s), 393,00 (s), 371,37 – 370,60 (m), 140,00 (s), 88,50 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{NO}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 423,4153; нађено 423,131.

Синтеза једињења **3DQ-1c** и **3DQ-2c**. У Erlenmeyer-ов суд од 25 mL, додати су 3-хидроксибензојева киселина (3,5 mg, 25 μmol), $[\text{RhCp}^*\text{Cl}_2]_2$ (0,04 mmol, 5 mol%), CuO (4 mg, 50 μmol), AcOK (4,90 mg, 50 μmol), LiCl (1,05 mg, 25 μmol), KI (830 μg , 5 μmol), **3DQ-Pro-1c** (45,5 mg, 100 μmol) или **3DQ-Pro-2c** (42,3 mg, 100 μmol), *tert*-амил алкохол (500 μL) и толуен (1 mL). Затим је суд запечаћен поклопцем обложеним тефлоном и реакциона смеша је мешана на 120°C током 48 сати. После тога, реакциона смеша је концентрована у вакууму. Остатак је пречишћен хроматографијом на колони (Et_2O : EtOAc = 40:20 v/v) да би се добили светложути чврсти производи **3DQ-1c** (50 mg, 95%) или **3DQ-2c** (48 mg, 95%).

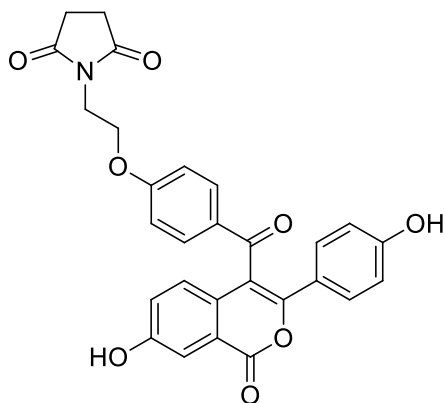


7-хидрокси-3-(4-(4-(2-(изохинолин-2(1H)-ил)етокси)бензоил)-1H-изохромен-1-он (**3DQ-1c**). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,33 (s, 56H), 7,84 – 7,65 (m, 114H), 7,52 (s, 5H), 7,51 (s, 57H), 7,47 (d, J = 32,4 Hz, 119H), 7,38 – 7,17 (m, 167H), 7,17 – 6,88 (m, 401H), 6,83 – 6,63 (m, 115H), 5,29 (s, 57H), 4,88 (s, 56H), 4,43 (d, J = 18,7 Hz, 113H), 4,19 – 4,15 (m, 90H), 3,43 (s, 45H), 2,56 (s, 51H), 2,54 – 2,43 (m, 334H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 193,45 (s), 163,20 (s),

161,68 (s), 160,77 (s), 159,41 (s), 154,43 (s), 140,38 (s), 133,01 (s), 132,49 (d, J = 18,1 Hz), 132,28 – 131,97 (m), 129,78 – 129,38 (m), 128,12 (d, J = 9,1 Hz), 127,21 (s), 126,58 (s),

Експериментални део

125,59 (s), 125,40 (s), 123,55 (s), 123,22 (s), 122,55 (s), 117,45 (s), 115,30 – 115,09 (m), 113,98 – 113,77 (m), 102,97 (s), 66,99 (s), 51,86 (s), 50,60 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -281,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 469,30 (s), 336,20 (s), 262,00 (s), 88,50 (s), 80,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{33}\text{H}_{25}\text{NO}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 531,1682; нађено 531,5547.



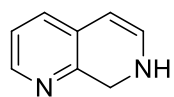
1-(2-(4-(7-хидрокси-3-(4-хидроксифенил)-1-оксо-1H-изохромен-4-карбонил)фенокси)етил)пиролидин-2,5-дион (3DQ-2c). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,46 (s, 5H), 7,89 – 7,69 (m, 10H), 7,54 (s, 5H), 7,42 – 7,21 (m, 15H), 7,09 (s, 5H), 7,07 – 6,93 (m, 10H), 6,85 – 6,65 (m, 10H), 4,92 (s, 5H), 4,31 – 4,14 (m, 10H), 3,56 – 3,40 (m, 10H), 2,84 – 2,70 (m, 48H), 2,70 – 2,67 (m, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 193,45 (s), 178,36 –

178,14 (m), 163,20 (s), 161,68 (s), 160,77 (s), 159,41 (s), 154,43 (s), 132,56 (s), 132,28 – 131,97 (m), 129,78 – 129,38 (m), 128,08 (s), 125,40 (s), 123,55 (s), 123,22 (s), 122,55 (s), 117,45 (s), 115,30 – 115,09 (m), 113,98 – 113,77 (m), 67,16 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,01 (s), 28,61 – 28,21 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -231,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 469,30 (s), 371,37 – 370,60 (m), 336,20 (s), 262,00 (s), 88,50 (s), 80,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{NO}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 499,4682; нађено 499,1267.

Синтетички протоколи за припрему једињења 3DQ-1d и 3DQ-2d

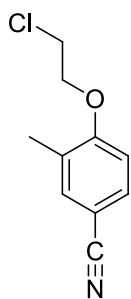
Синтеза једињења 3DQ-R1d. Мешаном раствору 7-метил-7,8-дихидро-1,7-нафтиридина (100 mg, 684 μmol) у CHCl_3 (20 mL) на -5°C у атмосфери N_2 постепено је додаван *m*-CPBA (118 mg, 684 μmol) током 5 минута. Реакциона смеша је остављена да се меша још 15 минута. Додата је концентрована HCl (60 μL) и фероценсирћетна киселина (12 mol%). Реакциона смеша остављена је да се загреје на собну температуру да би потом звагревање било вршено на 50°C до потпуне потрошње интермедијерног *N*-оксида (надгледано TLC хроматографијом, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH} = 85:15:1$ v/v/v), што је резултовало синтезом 3DQ-R1d (85 mg, 95%) као наранџасте чврсте супстанце.

Докторска дисертација Незрине Куртановић



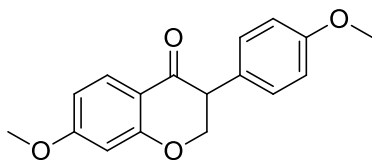
7,8-дихидро-1,7-нафтиридин (**3DQ-R1d**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,31 (s, 1H), 8,02 (d, $J = 19,1$ Hz, 2H), 7,50 (s, 1H), 7,13 (s, 1H), 5,17 (s, 1H), 4,79 – 4,65 (m, 2H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 148,30 (s), 142,88 (s), 140,37 (s), 129,73 (s), 124,87 (s), 119,30 (s), 94,32 (s), 48,60 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -47,00 (s), -257,80 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 132,1625; нађено 132,0687.

Синтеза једињења **3DQ-RD3**. Реактант **3DQ-RD3** (463,24 mg 95%) припремљен је као жуто уље коришћењем идентичног поступка као и за припрему **3DQ-Pro-RR1**, **3DQ-Pro-RR2** или **3DQ-Pro-RR3**, кондензацијом 4-хидрокси-3-метилбензонитрила (323,8 mg, 2.5 mmol) са 1,2-дихлороетаном (269 mg, 2.5 mmol).



4-(2-хлороетокси)-3-метилбензонитрил (**3DQ-RD3**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,41 (d, $J = 19,7$ Hz, 4H), 7,03 (s, 2H), 4,22 – 4,18 (m, 3H), 3,83 – 3,79 (m, 3H), 2,57 – 2,43 (m, 12H), 2,40 – 2,26 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159,95 (s), 134,21 (s), 129,43 (s), 127,10 (s), 119,29 (s), 116,40 (s), 108,59 (s), 69,11 (s), 43,63 (s), 40,17 – 39,96 (m), 16,00 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -122,70 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{ClNO}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 195,0451; нађено 195,0451.

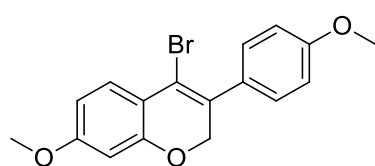
Синтеза једињења **3DQ-D1**. Реактанти 1-(2-хидрокси-4-етоксифенил)-2-(4-метоксифенил)етенон (545 mg, 2 mmol), параформалдехид (0,12 g, еквивалент 4 mmol формалдехида) и 25% водени раствор диметиламина (0,38 mL, 2 mmol), загревани су у врелом етанолу (25 mL) током 3 сата на воденом купатилу. Затим је етанол упарен у вакууму, додата је вода (10 mL) и смеша је закишељена хлороводоничном киселином. Нерастворни безбојни талог **3DQ-D1** (540 mg, 95%) изолован је усисавањем и прекристалисан је из метанола.



7-метокси-3-(4-метоксифенил)хроман-4-он (**3DQ-D1**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,79 (s, 1H), 7,44 – 7,24 (m, 2H), 7,01 – 6,81 (m, 2H), 6,72 (d, $J = 1,7$ Hz, 2H), 4,61 (s, 1H), 4,41 (s, 1H), 4,17 (s, 1H), 3,89 – 3,72 (m, 6H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 191,21 (s), 165,09 (s), 161,58 (s), 157,87 (s), 129,37 – 129,01 (m), 126,39 (s), 114,59 (s), 114,28 – 113,88 (m), 108,57 (s), 101,18 (s), 70,33 (s), 56,23 – 55,83 (m), 48,77 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 65,00 (s), 48,00 (s), 46,20 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 284,3065; нађено 284,1049.

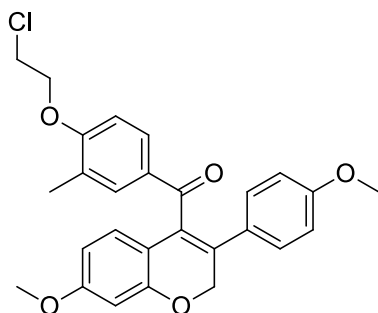
Експериментални део

Синтеза једињења 3DQ-D2. Раствору изофлавона **3DQ-D1** (500 mg, 1,76 mmol) у сувом бензену (5 ml) пажљиво је додат фосфор трибромид (1,63 g, 6 mmol), а резултујући раствор мешан је 2 сата на 85°C. Потом је смеша охлађена и сипана опрезно на смрвљени лед (200 g). Водени раствор екстрахован је помоћу бензена (3 x 5 mL) и комбиновани органски слојеви испрани су zasiћеним воденим раствором натријум бикарбоната (4 x 5 mL) и сланим раствором (2 x 20 mL), осушени преко Na₂SO₄ и упарени при смањеном притиску. Безбојно уље кристализовало се из метанола на 0°C стајањем током 12 сати као бела чврста супстанца **3DQ-D2** (519 mg, 85%).



4-бромо-7-метокси-3-(4-метоксифенил)-2H-хромен (3DQ-D2). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,49 – 7,24 (m, 3H), 7,08 – 6,89 (m, 2H), 6,58 (d, *J* = 20.0 Hz, 2H), 4,75 – 4,62 (m, 2H), 3,86 – 3,70 (m, 6H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,58 (s), 159,35 (s), 158,81 (s), 133,33 (s), 128,80 (s), 127,34 – 127,13 (m), 126,82 (s), 124,10 (s), 118,45 (s), 114,32 – 113,92 (m), 107,33 (s), 100,90 (s), 66,05 (s), 56,23 – 55,83 (m), 40,17 – 39,96 (m). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 68,00 (s), 65,00 (s), 60,40 (s), 13,00 (s). MS *m/z* израчунато за C₁₇H₁₅BrO₄ [M + H]⁺: 347,2032; нађено 346,0205.

Синтеза једињења 3DQ-D3. Мешаном раствору **3DQ-D2** (347,2 mg, 1 mmol) у сувом диетил-етру (5 mL) на 0°C у атмосфери азота, додат је 1,6 М *n*-бутиллитијум у хексану (5 mL, 1,6 mmol) у једној порцији помоћу шприца. Наранцасти раствор мешан је на 0°C током 1,5 сата, након чега је раствор **3DQ-RD3** (255 mg, 1,3 mmol) у безводном етру (10 mL) додаван полако у једној порцији помоћу шприца. Раствор је мешан током 1,5 сата на 10°C. По завршетку реакције, реакциона смеша сипана је у воду и екстрахована етил ацетатом (30 mL x 4), осушена изнад Na₂SO₄ и концентрована под смањеним притиском, дајући браон получврсти **3DQ-D3**, који је пречишћен хроматографијом на колони (*n*-хексан: ЕтОАс = 10:1 v/v) (349 mg, 75%).

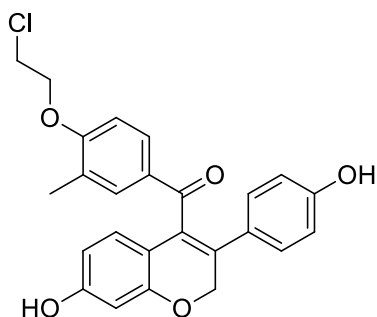


(4-(2-хлоретокси)-3-метилфенил)(7-метокси-3-(4-метоксифенил)-2H-хромен-4-ил)метанон (3DQ-D3). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,69 (d, *J* = 14.8 Hz, 4H), 7,48 – 7,28 (m, 4H), 7,23 (s, 2H), 7,04 (s, 2H), 6,93 – 6,79 (m, 4H), 6,62 (d, *J* = 12,9 Hz, 4H), 4,94 – 4,81 (m, 4H), 4,19 – 4,15 (m, 3H), 3,86 – 3,72 (m, 12H), 3,70 – 3,66 (m, 3H), 2,57

Докторска дисертација Незрине Куртановић

– 2,43 (m, 12H), 2,37 – 2,23 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 198,36 (s), 161,91 (s), 161,36 (s), 158,38 (s), 157,48 (s), 146,08 (s), 142,25 (s), 132,74 (s), 130,94 (s), 128,99 (s), 128,19 – 127,98 (m), 127,44 (d, $J = 11.2$ Hz), 123,46 (s), 114,54 (s), 114,10 (s), 113,27 – 113,05 (m), 107,72 (s), 100,71 (s), 72,06 (s), 69,11 (s), 56,23 – 55,83 (m), 43,63 (s), 40,17 – 39,96 (m), 16,00 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 469,30 (s), 78,00 (s), 68,00 (s), 65,00 (s), 60,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{ClO}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 464,9374; нађено 464,1391.

Синтеза једињења **3DQ-Pro-1d,2d**. Реактант **3DQ-D3** (350 mg, 750 μmol) подвргнут је идентичном протоколу као и препарати **3DQ-1a** и **3DQ-1a***, дајући **3DQ-Pro-1d,2d** (311 mg, 95%) у облику жућкасте чврсте супстанце.

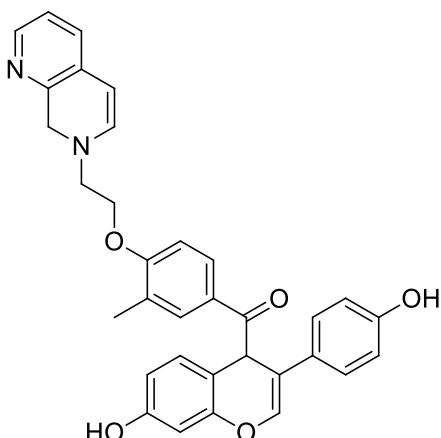


(4-(2-хлороетокси)-3-метилфенил)(7-хидрокси-3-(4-хидроксифенил)-2H-хромен-4-ил)метанон (**3DQ-Pro-1d,2d**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,41 (s, 26H), 7,66 (d, $J = 10,2$ Hz, 53H), 7,23 (s, 2H), 7,23 – 7,08 (m, 76H), 7,05 (s, 26H), 6,86 – 6,66 (m, 53H), 6,50 (d, $J = 12,8$ Hz, 53H), 5,13 (s, 26H), 4,88 – 4,74 (m, 52H), 4,20 – 4,16 (m, 42H), 3,87 – 3,83 (m, 42H), 2,57 – 2,43 (m, 156H), 2,40 – 2,26 (m, 79H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 198,36 (s), 161,91 (s), 158,62 (s), 157,75 (s), 157,17 (s), 146,08 (s), 142,25 (s), 132,74 (s), 130,94 (s), 129,16 – 128,95 (m), 127,63 (d, $J = 5.8$ Hz), 127,40 (s), 123,46 (s), 114,72 – 114,32 (m), 114,10 (s), 113,84 (s), 109,76 (s), 102,10 (s), 72,06 (s), 69,11 (s), 43,63 (s), 40,17 – 39,96 (m), 16,00 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 469,30 (s), 93,30 (s), 88,50 (s), 78,00 (s), 68,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{ClO}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 436,8842; нађено 436,1078.

(4-(2-(1,7-нафтиридин-7(8H)-ил)етокси)-3-метилфенил)(7-хидрокси-3-(4-хидроксифенил)-4H-хромен-4-ил)метанон (**3DQ-1d**) и (4-(2(5H-пироло[3,4- b] пиридин-6(7H)-ил)етокси)-3-метилфенил)(7-хидрокси-3-(4-хидроксифенил)-4H-хромен-4-ил)метанон (**3DQ-2d**). Мешаном раствору **3DQ-Pro-1d,2d** (218 mg, 500 μmol) у сувом DMF-у (10 ml) додат је ТВАИ (3 mg) и 7,8-дихидро-1,7-нафтиридин (66 mg, 500 μmol) или 6,7-дихидро-5H-пироло[3,4- b]пиридин (60 mg, 500 μmol), за потребе синтезе **3DQ-1d** односно **3DQ-2d**, респективно, након чега је добијени раствор мешан на 80°C током 6 сати. По завршетку реакције, реакциона смеша сипана је у ледену воду, чврсти талог је филтриран и после вакуумског сушења кристализован из хексана дајући **3DQ-1d** (253

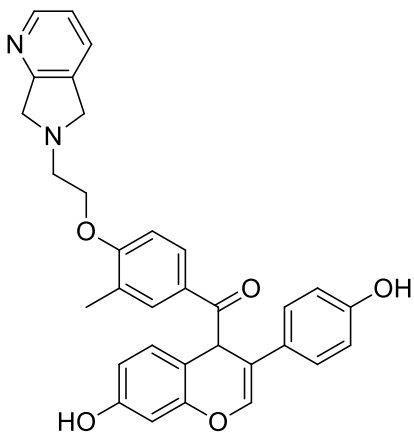
Експериментални део

mg, 95%) или **3DQ-2d** (247 mg, 95%), као беле чврсте супстанце.



(4-(2-(1,7-нафтиридин-7(8H)-ил)етокси)-3-метилфенил)(7-хидрокси-3-(4-хидроксифенил)-4H-хромен-4-ил)метанон (3DQ-1d). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,19 (d, $J = 26,4$ Hz, 78H), 8,15 – 8,06 (m, 4H), 7,69 (s, 25H), 7,59 (d, $J = 27,8$ Hz, 97H), 7,45 (s, 17H), 7,44 (s, 29H), 7,19 (s, 33H), 7,17 – 7,06 (m, 59H), 6,99 (d, $J = 48,8$ Hz, 112H), 6,77 – 6,60 (m, 123H), 6,37 (d, $J = 3,8$ Hz, 82H), 5,32 (s, 41H), 5,13 (s, 43H), 4,75 (t, $J = 3,9$ Hz, 123H), 4,32 – 4,16 (m, 81H), 3,51 (s,

41H), 2,61 (s, 56H), 2,52 – 2,43 (m, 232H), 2,32 – 2,19 (m, 122H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 195,96 (s), 161,43 (s), 158,47 (s), 156,65 (s), 152,69 (s), 147,72 (s), 143,65 (s), 142,38 (s), 139,78 (s), 130,17 (d, $J = 7,6$ Hz), 129,40 (s), 129,05 – 128,84 (m), 128,53 (s), 127,21 (s), 126,59 (s), 124,28 (s), 123,75 (s), 120,12 (s), 115,10 (s), 114,98 – 114,78 (m), 113,75 (s), 113,26 (s), 108,50 (s), 102,47 (s), 101,14 (s), 67,17 (s), 52,64 (s), 50,60 (s), 45,04 (s), 40,17 – 39,96 (m), 16,00 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -47,00 (s), -287,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 162,00 (s), 93,30 (s), 88,50 (s), 78,00 (s), 13,00 (s), MS m/z израчунато за $\text{C}_{33}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 532,1998; нађено 532,5858.



(4-(2-(5H-пироло[3,4-b]пиридин-6(7H)-ил)етокси)-3-метилфенил)(7-хидрокси-3-(4-хидроксифенил)-4H-хромен-4-ил)метанон (3DQ-2d). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,90 (s, 17H), 8,47 (s, 17H), 7,82 – 7,64 (m, 48H), 7,64 – 7,55 (m, 3H), 7,32 (s, 14H), 7,26 – 7,03 (m, 52H), 6,93 (s, 19H), 6,82 – 6,67 (m, 49H), 6,67 – 6,61 (m, 2H), 6,50 (s, 1H), 6,45 (d, $J = 27,2$ Hz, 33H), 5,45 (s, 17H), 4,93 (s, 17H), 4,18 – 4,03 (m, 50H), 4,05 – 4,03 (m,

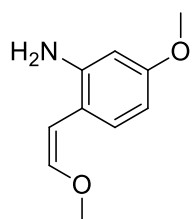
11H), 3,98 (s, 30H), 3,72 (s, 17H), 3,39 (s, 17H), 3,01 (s, 17H), 2,65 (s, 19H), 2,57 – 2,43 (m, 101H), 2,39 – 2,25 (m, 51H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 195,96 (s), 162,61 (s), 161,43 (s), 158,47 (s), 156,65 (s), 152,69 (s), 146,33 (s), 143,65 (s), 130,94 (s), 130,20 (s), 129,40 (s), 129,05 – 128,84 (m), 128,53 (s), 127,21 (s), 126,56 (d, $J = 6,7$ Hz), 124,28 (s), 121,84 (s), 115,10 (s), 114,99 – 114,78 (m), 113,75 (s), 113,26 (s), 108,50 (s), 102,47 (s), 67,45 (s), 63,36 (s), 61,31 (s), 55,49 (s), 45,04 (s), 40,17 – 39,96 (m), 16,00 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -47,00 (s), -315,50 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 162,00 (s), 93,30

Докторска дисертација Незрине Куртановић

(s), 88,50 (s), 78,00 (s), 13,00 (s), MS m/z израчунато за $C_{32}H_{28}N_2O_5$ $[M + H]^+$: 520,1998; нађено 520,5751.

Синтетички протоколи за припрему једињења **3DQ-1e**

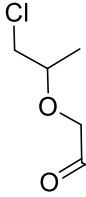
Синтеза једињења 3DQ-Pro-E1. Раствор *n*-BuLi (4,1 mL, 1,6 M у хексану, 6,5 mmol) додат је раствору $(Me_3Si)_2NH$ (1,05 g, 6,5 mmol) у 40 mL THF на 0°C како би се припремио литијум *bis*(триметилсилил)амида (LiHDMS) као катализатор. Потом је метоксиметилтрифенилфосфонијум хлорид (2,25 g, 16,5 mmol) додаван полако кроз левак након чега је вршено мешање тамноцрвеног раствора на 0°C током 45 минута. Потом је додат 2-амино-4-метоксибензалдехид (756 mg, 5 mmol) у 20 mL THF помоћу шприца. Смеша је мешана на 0°C током 2 сата након чега је прелучена у 150 mL пентана, да би резултујући раствор филтриран кроз силика гел. Уклањање растварача дало је **3DQ-Pro-E1** (806 mg, 90%) као 1:1 смешу изомера која је коришћена без даљег пречишћавања.

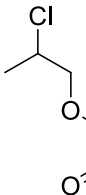


(*Z*)-5-метокси-2-(2-метоксивинил)анилин (**3DQ-Pro-E1**). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,14 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 6,21 (d, $J = 22,4$ Hz, 2H), 5,62 (s, 1H), 5,48 – 5,35 (m, 2H), 3,86 – 3,72 (m, 3H), 3,57 – 3,44 (m, 3H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 158,52 (s), 150,23 (s), 150,06 (s), 129,13 (s), 109,54 (s), 102,68 (s), 99,35 (s), 95,93 (s), 55,97 (d, $J = 17,2$ Hz), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -308,40 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 50,70 (s), 22,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $C_{10}H_{13}NO_2$ $[M + H]^+$: 179,2157; нађено 179,0946.

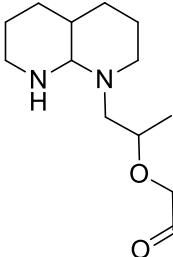
Синтеза једињења 3DQ-RPro-1E и 3DQ-RPro-1E*. Реагенси **3DQ-RPro-1E** и **3DQ-RPro-1E*** добијени су у облику бледо жутих уља применом идентичног поступка као за **3DQ-Pro-RR1**, **3DQ-Pro-RR2**, или за **3DQ-Pro-RR3**, почев од 2-хидроксиацетил хлорида (236 mg, 2,5 mmol) и 1,2-дихлоропропана (282 mg, 2,5 mmol). Протокол је праћен све док рутинска TLC анализа ($CH_2Cl_2:EtOAc = 9.5:0.5$ v/v) није показала два производа: **3DQ-RPro-1E** (220 mg, 52%) и **3DQ-RPro-1E*** (194 mg, 46%), који су раздвојени помоћу флеш хроматографије на колони ($CH_2Cl_2:EtOAc = 9:1$ v/v).

Експериментални део

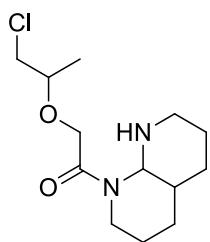

 2-(1-хлоропропан-2-илокси)ацетил хлорид (**3DQ-RPro-1E**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 4,99 – 4,85 (m, 2H), 4,11 (s, 1H), 3,71 (s, 1H), 3,43 (s, 1H), 2,57 – 2,43 (m, 6H), 1,36 – 1,17 (m, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 167,23 (s), 76,13 (s), 71,57 (s), 48,08 (s), 40,17 – 39,96 (m), 18,92 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 18,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_5\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 171,0218; нађено 169,9901.


 2-(2-хлоропропокси) ацетил хлорид (**3DQ-RPro-1E***). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 4,75 – 4,62 (m, 2H), 3,76 (d, $J = 24,6$ Hz, 2H), 3,52 (s, 1H), 2,57 – 2,43 (m, 6H), 1,66 – 1,47 (m, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 168,69 (s), 76,26 (s), 72,78 (s), 57,94 (s), 40,17 – 39,96 (m), 21,27 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 30,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_5\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 171,0218; нађено 169,9901.

Синтеза једињења **3DQ-Pro-1E** и **3DQ-Pro-1E***. Реагенси **3DQ-Pro-1E** и **3DQ-Pro-1E*** добијени су у облику сивих чврстих материја коришћењем идентичног поступка као за **3DQ-1d** или **3DQ-2d**, почевши од **3DQ-RPro-1E** (170 mg, 1 mmol) и декахидро-1,8-нафтиридина (140,3 mg, 1 mmol). Протокол је праћен све док није добијен талог чврсте супстанце, након чега је рутинска TLC анализа показала да **3DQ-Pro-1E** (132 mg, 48%) или **3DQ-Pro-1E*** (126,4 mg, 46%) као беле чврсте супстанце могу да се добију раздвајањем помоћу флеш хроматографије на колони (*n*-hexane:EtOAc = 9:1 v/v).

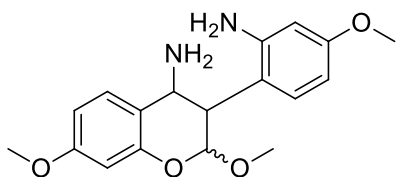

 2-(1-(октахидро-1,8-нафтиридин-1(2H)-ил)пропан-2-илокси)ацетил хлорид (**3DQ-Pro-1E**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 5,04 – 4,90 (m, 8H), 4,41 (s, 4H), 3,51 (s, 4H), 2,97 (s, 3H), 2,94 (d, $J = 11,2$ Hz, 2H), 2,86 (d, $J = 44,4$ Hz, 10H), 2,55 (s, 1H), 2,55 – 2,29 (m, 40H), 1,86 – 1,50 (m, 25H), 1,55 (ddd, $J = 95,4, 55,0, 37,4$ Hz, 34H), 1,84 – 1,22 (m, 49H), 1,86 – 1,22 (m, 49H), 1,86 – 1,14 (m, 50H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 167,23 (s), 73,08 (s), 71,57 (s), 65,50 (s), 57,05 (s), 50,17 (s), 43,97 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,16 (s), 27,90 (d, $J = 0,5$ Hz), 24,53 (s), 23,23 (s), 18,19 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -330,65 (d, $J = 431,0$ Hz). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 18,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 274,7869; нађено 274,1448.

Докторска дисертација Незрине Куртановић



2-(1-хлоропропан-2-илокси)-1-(октахидро-1,8-нафтиридин-1(2H)-ил)етенон (**3DQ-Pro-1E***). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 4,48 – 4,34 (m, 24H), 4,16 (s, 13H), 3,89 (d, $J = 25,4$ Hz, 25H), 3,70 (s, 13H), 3,46 (d, $J = 22,1$ Hz, 25H), 3,15 (s, 13H), 2,94 (d, $J = 4,7$ Hz, 4H), 2,87 (d, $J = 51,0$ Hz, 22H), 2,57 – 2,43 (m, 72H), 1,91 – 1,69 (m, 21H), 1,66 – 1,58 (m, 30H), 1,51 (d, $J = 15,0$ Hz, 16H), 1,49 – 1,04 (m, 69H), 1,21 (s, 11H), 1,21 (s, 11H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 173,14 (s), 76,13 (s), 69,00 (s), 62,69 (s), 48,08 (s), 43,97 (s), 40,73 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,67 (s), 27,90 (d, $J = 0,5$ Hz), 24,53 (s), 23,32 (s), 18,92 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s), -334,90 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 346,00 (s), 18,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 274,7869; нађено 274,1448.

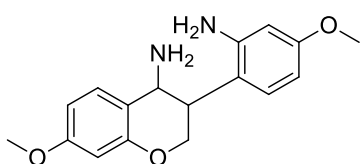
Синтеза једињења **3DQ-E1**. Жута чврста супстанца **3DQ-E1** (529 mg, 80%), добијена је употребом идентичног поступка као за **3DQ-A1**, кондензацијом 2-хидрокси-4-метоксибензамида (336 mg, 2 mmol) са **3DQ-Pro-E1** (358,4 mg, 2 mmol).



3-(2-амино-4-метоксифенил)-2,7-диметоксихроман-4-амин (**3DQ-E1**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,30 (s, 3H), 7,10 (s, 3H), 6,61 (d, $J = 36,0$ Hz, 6H), 6,46 (s, 3H), 6,26 (s, 3H), 5,84 – 5,71 (m, 6H), 4,90 (s, 3H), 4,19 (s, 3H), 3,83 – 3,65 (m, 20H), 3,42 – 3,28 (m, 9H), 2,51 (s, 4H), 2,50 – 2,35 (m, 17H), 2,12 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159,74 (s), 159,31 (s), 156,28 (s), 149,32 (s), 134,15 (s), 128,93 (s), 120,89 (s), 112,60 (s), 110,25 (s), 101,90 (s), 101,56 (s), 100,72 (s), 98,30 (s), 56,23 – 55,91 (m), 55,81 (s), 50,85 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -322,70 (s), -342,50 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 99,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 330,3783; нађено 330,1580.

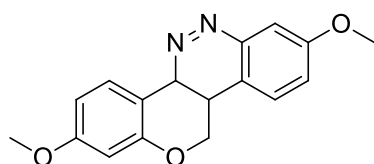
Синтеза једињења **3DQ-E2**. Мешаном раствору **3DQ-E1** (499 mg, 1,51 mmol) и триетилсилана (0,15 mL, 5,75 mmol) у сувом CH_2Cl_2 (30 mL) и охлађеном на 0°C додат је $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (930 μL , 3,40 mmol) кап по кап. Реакциона смеша је затим остављена да се лагано загрева током периода од 30 минута. Реакција је потом стопирана засићеним воденим раствором NaHCO_3 (2 mL) и извршена је екстракција етил ацетатом (3 x 10 mL). Комбиновани органски екстракти испрани су сланим раствором, осушени безводним Na_2SO_4 и филтрирани. Након испаравања растварача под смањеним притиском и пречишћавања флеш хроматографијом на колони (n -hexane:EtOAc = 50:1 v/v) добијен је изофлаван **3DQ-E2** (417 mg, 92%) у облику беле чврсте супстанце која је прекристализована из кључалог раствора хексан-метиленхлорида.

Експериментални део



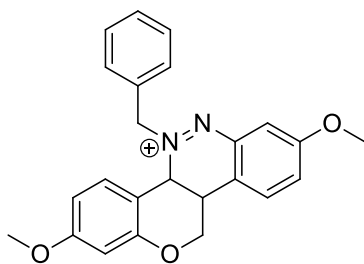
3-(2-амино-4-метоксифенил)-7-метоксихроман-4-амин (**3DQ-E2**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,29 (s, 1H), 7,13 (s, 1H), 6,64 (s, 1H), 6,53 (s, 1H), 6,48 (s, 1H), 6,27 (s, 1H), 5,81 – 5,67 (m, 2H), 4,21 (d, $J = 15,3$ Hz, 2H), 3,96 (s, 1H), 3,88 – 3,72 (m, 6H), 3,58 (s, 1H), 2,57 – 2,43 (m, 6H), 2,35 (s, 1H), 2,11 (s, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 160,65 (s), 158,93 (s), 154,51 (s), 146,24 (s), 129,68 (s), 129,37 (s), 118,82 (s), 114,10 (s), 109,96 (s), 103,34 (s), 100,96 (s), 98,74 (s), 67,98 (s), 56,23 – 55,83 (m), 48,95 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -322,70 (s), -342,50 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 63,00 (s), 50,70 (s), 48,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 300,3523; нађено 300,1474.

Синтеза једињења 3DQ-E3. Једињење **3DQ-E3** (341 mg, 90%) добијено је као жута чврста супстанца коришћењем идентичног поступка као за **3DQ-A2**, почевши од **3DQ-E2** (384 mg, 1,28 mmol).



2,8-диметокси-10b,11-дихидро-4bH-хромено[4,3-с]цинолин (**3DQ-E3**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,78 (s, 1H), 7,23 (d, $J = 32,8$ Hz, 2H), 7,16 (s, 1H), 6,56 (d, $J = 21,7$ Hz, 2H), 4,81 (s, 1H), 4,22 (s, 1H), 3,96 (s, 1H), 3,85 – 3,66 (m, 6H), 2,83 (s, 1H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 162,31 (s), 158,63 (s), 152,13 (s), 149,06 (s), 131,11 (s), 126,88 (s), 125,48 (s), 116,83 (s), 116,06 (s), 107,25 (s), 106,51 (s), 102,49 (s), 68,09 (s), 56,23 – 55,83 (m), 44,59 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ 156,40 (s), 26,70 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 63,15 – 62,59 (m), 48,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 296,3205; нађено 296,1161.

Синтеза једињења 3DQ-E3-I. Једињење **3DQ-E3-I** (347 mg, 93%) у облику бледо наранџастих кристала добијено је коришћењем идентичног поступка као за **3DQ-A2-I**, полазећи од **3DQ-E3** (287 mg, 970 μmol).

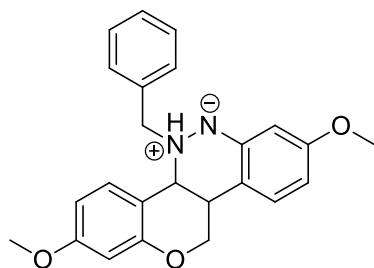


5-бензил-2,8-диметокси-10b,11-дихидро-4bH-хромено[4,3-с]цинолин-5-ијум (**3DQ-E3-I**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,41 – 7,02 (m, 55H), 7,02 – 6,96 (m, 1H), 6,89 (s, 8H), 6,58 (s, 2H), 6,52 (t, $J = 18,0$ Hz, 22H), 4,72 (s, 8H), 4,23 (s, 8H), 3,98 (s, 9H), 3,84 – 3,75 (m, 38H), 3,71 (s, 15H), 3,62 (d, $J = 24,4$ Hz, 18H), 2,57 – 2,43 (m, 46H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 162,81 (s), 159,51 (s), 153,41 (s), 142,75 (s), 134,57 (s), 133,47 (s), 129,46 – 129,08 (m), 129,02 (s),

Докторска дисертација Незрине Куртановић

126,98 (s), 126,03 (s), 115,65 (s), 114,85 (s), 107,14 (s), 107,03 (d, $J = 21,5$ Hz), 102,49 (s), 71,83 (s), 67,86 (s), 56,23 – 55,83 (m), 43,02 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 63,15 – 62,59 (m), 48,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3^+$: $[\text{M} + \text{H}]^+$: 387,1703, нађено 387,4505

Синтеза једињења 3DQ-E3-II. Једињење **3DQ-E3-II** добијено је из тамно љубичастог раствора користећи идентичну процедуру као за **3DQ-A2-II**, почев од **3DQ-E3-I** (289 mg, 751 μmol).

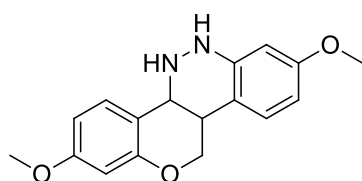


5-бензил-2,8-диметокси-4b,5,10b,11-

тетрахидрохромено[4,3-с]цинолин-5-иум-6-ид (3DQ-E3-

II). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,31 (s, 2H), 7,17 (dt, $J = 8,2, 3,1$ Hz, 5H), 7,09 (s, 1H), 6,86 (s, 1H), 6,65 (d, $J = 23,8$ Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 4,48 (t, $J = 21,4$ Hz, 3H), 4,20 (s, 1H), 3,96 (s, 1H), 3,85 – 3,70 (m, 6H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 162,35 (s), 159,26 (s), 152,02 (s), 135,51 (s), 133,92 (s), 129,29 – 128,97 (m), 127,81 (s), 126,02 (s), 122,04 (s), 113,88 (s), 108,75 (s), 106,42 (s), 102,86 (s), 102,51 (s), 68,12 (s), 56,23 – 55,83 (m), 54,00 (s), 42,30 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 63,00 (s), 50,70 (s), 48,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$: $[\text{M} + \text{H}]^+$: 388,1787, нађено 388,4590.

Синтеза једињења 3DQ-E4. Једињење **3DQ-E4** (208 mg, 93%) добијено је као наранџасти кристал коришћењем идентичног поступка као за **3DQ-A3**, почевши од **3DQ-E3-II**.



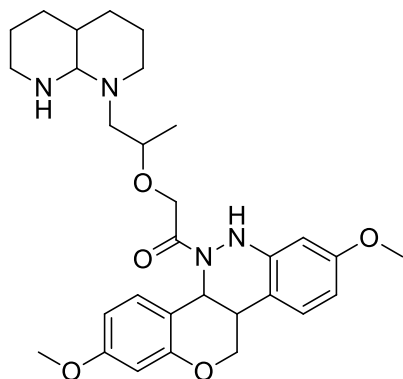
2,8-диметокси-5,6,10b,11-тетрахидро-4bH-хромено[4,3-

с]цинолин (3DQ-E4). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,28

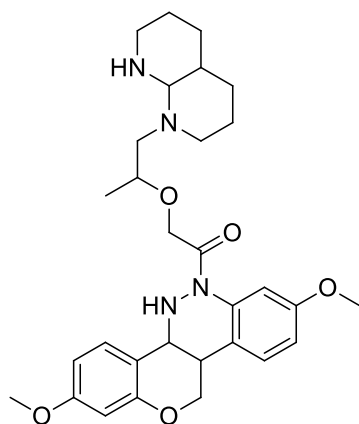
(s, 1H), 7,13 (s, 1H), 6,60 (d, $J = 11,3$ Hz, 2H), 6,47 (s, 1H), 5,92 (s, 1H), 4,39 (s, 1H), 4,22 (s, 1H), 3,96 (s, 1H), 3,92 – 3,66 (m, 7H), 3,10 (s, 1H), 2,94 (s, 1H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 161,07 (s), 158,89 (s), 151,01 (s), 139,45 (s), 132,03 (s), 126,77 (s), 114,68 (s), 114,42 (s), 108,79 (s), 108,27 (s), 102,25 (s), 97,96 (s), 68,13 (s), 56,23 – 55,83 (m), 55,07 (s), 43,53 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -298,90 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 63,00 (s), 50,70 (s), 48,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 298,3364; нађено 298,1317.

Експериментални део

Синтеза једињења **3DQ-Pro-1e** и **3DQ-Pro-1e***. Жељени производи **3DQ-Pro-1e** и **3DQ-Pro-1e*** добијени су као смеђе чврсте супстанце у приносу од 44% (47,7 mg), односно 40% (43,9 mg), коришћењем идентичног поступка као за **3DQ-Pro-1a** и **3DQ-Pro-1a***, почев од **3DQ-Pro-1E** (55,50 mg, 202 μ mol) и **3DQ-E4** (60,26 mg, 202 μ mol).

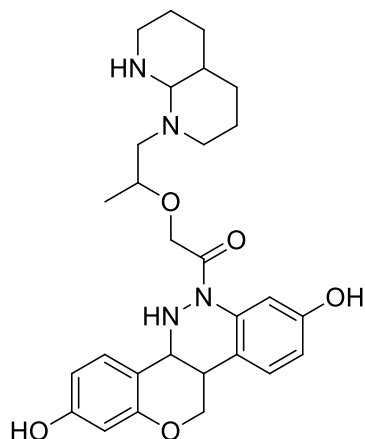


1-(2,8-диметокси-10b,11-дихидро-4bH-хромено[4,3-с]цинолин-5(6H)-ил)-2-((1-(октахидро-1,8-нафттиридин-1(2H)-ил)пропан-2-ил)окси)етанон (3DQ-Pro-1e). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,23 (s, 8H), 7,11 (s, 9H), 6,99 (s, 10H), 6,56 (s, 8H), 6,47 (s, 10H), 6,35 (s, 10H), 6,00 (s, 9H), 5,16 (s, 9H), 4,30 (t, $J = 32,5$ Hz, 26H), 4,19 (s, 1H), 4,19 – 3,91 (m, 31H), 3,87 (d, $J = 17,8$ Hz, 14H), 3,85 – 3,71 (m, 58H), 3,12 – 2,69 (m, 29H), 2,87 (d, $J = 50,8$ Hz, 19H), 2,87 (d, $J = 50,8$ Hz, 18H), 2,62 (d, $J = 45,2$ Hz, 18H), 2,56 – 2,43 (m, 55H), 1,95 (s, 9H), 1,55 (ddd, $J = 131,5, 86,0, 64,7$ Hz, 71H), 1,53 (d, $J = 8,5$ Hz, 20H), 1,46 (dd, $J = 74,9, 56,5$ Hz, 36H), 1,38 (d, $J = 104,6$ Hz, 14H), 1,19 (s, 8H), 1,11 – 0,94 (m, 27H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 167,62 (s), 162,21 (s), 159,15 (s), 151,94 (s), 139,30 (s), 132,84 (s), 126,85 (s), 115,78 (s), 114,86 (s), 109,21 (s), 108,27 (s), 102,68 (s), 98,53 (s), 73,08 (s), 67,79 (s), 67,07 (s), 65,50 (s), 60,45 (s), 56,52 (s), 56,23 – 55,83 (m), 50,34 (s), 43,97 (s), 42,79 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,03 (s), 27,79 (d, $J = 0,5$ Hz), 24,54 (s), 23,25 (s), 18,22 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -244,00 (s), -330,65 (d, $J = 431,0$ Hz). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 346,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 48,00 (s), 18,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 550,6459; нађено 550,2791



1-(2,8-диметокси-10b,11-дихидро-4bH-хромено[4,3-с]цинолин-6(5H)-ил)-2-((1-(октахидро-1,8-нафттиридин-1(2H)-ил)пропан-2-илокси)етанон (3DQ-Pro-1e)*. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,21 (d, $J = 37,3$ Hz, 55H), 6,62 (s, 27H), 6,52 (s, 28H), 6,39 (s, 29H), 6,05 (s, 27H), 4,39 (s, 28H), 4,47 – 4,08 (m, 141H), 3,97 (s, 28H), 3,93 – 3,70 (m, 195H), 3,42 (s, 28H), 3,15 (s, 29H), 2,91 (d, $J = 17,0$ Hz, 53H), 2,84 (d, $J = 4,5$ Hz, 6H), 2,80 (d, $J = 32,4$ Hz, 47H), 2,70 – 2,25 (m, 254H), 2,37 (s, 106H), 2,37 (s, 106H), 1,70 (s, 24H), 1,69 – 1,58 (m, 84H), 1,57 – 1,44 (m, 80H), 1,27 (s, 4H), 1,27 – 1,03 (m, 138H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 168,21 (s), 162,45 (s), 158,87 (s), 150,91 (s), 136,19 (s),

Експериментални део

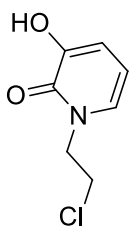


*1-(2,8-дихидрокси-10b,11-дихидро-4bH-хромено[4,3-*c*]цинолин-6(5H)-ил)-2-(1-(октахидро-1,8-нафтиридин-1(2H)-ил)пропан-2-илокси)етенон (3DQ-1e^{*})*. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,73 (s, 3H), 7,17 (s, 3H), 6,99 (s, 3H), 6,58 (s, 3H), 6,48 (s, 3H), 6,24 (s, 3H), 5,91 (s, 3H), 4,80 (s, 3H), 4,51 (s, 1H), 4,47 (t, *J* = 29,0 Hz, 7H), 4,07 (dd, *J* = 102,4, 23,2 Hz, 11H), 3,96 (d, *J* = 4,0 Hz, 5H), 3,96 (d, *J* = 4,0 Hz, 5H), 3,36 (s, 3H), 3,04 (s, 3H), 2,99 (d, *J* = 11,0 Hz, 5H), 2,87 (d, *J* = 45,0 Hz, 5H), 2,57 – 2,44 (m, 19H), 2,44 – 2,37 (m, 1H), 2,16 (s, 3H), 1,91 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 1,90 – 1,26 (m, 24H), 1,66 – 1,26 (m, 17H), 1,49 (s, 2H), 1,66 – 0,29 (m, 29H), 1,51 – 0,29 (m, 17H), 1,47 – 1,03 (m, 15H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168,21 (s), 159,14 (s), 158,44 (s), 150,92 (s), 136,17 (s), 132,49 (s), 128,79 (s), 115,89 (s), 114,85 (s), 112,22 (s), 110,46 (s), 105,38 (s), 103,71 (s), 73,08 (s), 68,13 (s), 65,92 (s), 65,50 (s), 56,52 (s), 55,35 (s), 50,34 (s), 43,97 (s), 43,10 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,03 (s), 27,79 (d, *J* = 0,5 Hz), 24,54 (s), 23,25 (s), 18,22 (s). ¹⁵N NMR (51 MHz, DMSO-*d*₆) δ -298,90 (s), -330,65 (d, *J* = 431,0 Hz). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 346,00 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 48,00 (s), 18,00 (s), 13,00 (s). MS *m/z* израчунато за C₂₈H₃₆N₄O₅ [M + H]⁺: 508,2686; нађено 508,6092.

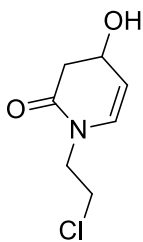
Синтетички протоколи за припрему једињења CBE-1 до CBE-6

Синтеза једињења **CBE-RR1**, **CBE-RR2**, **CBE-RR3**, **CBE-RR4**, **CBE-RR5** и **CBE-RR6**. Одређена количина 1,2-дихлороетана (61,85 mg, 625 μmol) растворена је у 45 mL апсолутног ацетона. Затим су додати калијум карбонат (25,4 mg, 2 mmol), калијум јодид (103,8 g, 625 μmol) и 3-хидроксипиридин-2(1H)-оном (69,44 mg, 625 μmol), 4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1H)-он (70,70 mg, 625 μmol), 5-фенил-2,5-дихидро-1H-тетразол (92,61 mg, 625 μmol), 2-(2,5-дихидро-1H-тетразол-5-ил)сирћетна киселина (81,32 mg, 625 μmol), 1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина (79,46 mg, 625 μmol) или 6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина (88,20 mg, 625 μmol). Смеша је рефлукутована 72h. После хлађења, производ (**CBE-RR1**, **CBE-RR2**, **CBE-RR3**, **CBE-RR4**, **CBE-RR5**, или **CBE-RR6**), 95,48 mg, 88%, 97,68 mg, 89%, 114,55 mg, 87%, 109,54 mg, 91%, 104,30 mg, 88%, 110,72 mg, 87%, респективно, кристалисао је као бела чврста супстанца из добијеног раствора.

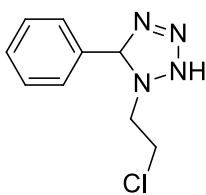
Докторска дисертација Незрине Куртановић



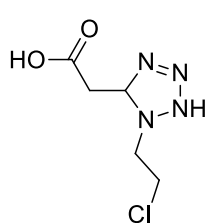
1-(2-хлороетил)-3-хидроксипиридин-2(1H)-он (**CBE-RR1**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,92 (s, 1H), 6,35 (s, 1H), 5,84 (s, 1H), 5,78 (s, 1H), 3,83 – 3,61 (m, 3H), 3,37 (s, 1H), 2,57 – 2,43 (m, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 160,50 (s), 155,75 (s), 135,69 (s), 115,03 (s), 111,34 (s), 47,65 (s), 42,85 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -227,80 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 306,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_7\text{H}_8\text{ClNO}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 173,6024; нађено 173,0213.



1-(2-хлороетил)-4-хидрокси-3,4-дихидроксипиридин-2(1H)-он (**CBE-RR2**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 6,66 (s, 9H), 5,85 (s, 9H), 5,26 (s, 9H), 4,58 (s, 9H), 3,83 – 3,60 (m, 27H), 3,37 (s, 9H), 2,57 (s, 1H), 2,74 – 2,32 (m, 64H), 2,06 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 168,72 (s), 128,34 (s), 111,52 (s), 66,93 (s), 47,05 (s), 42,85 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,66 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -227,80 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 371,00 (s), 32,30 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 174,0421; нађено 175,6128.

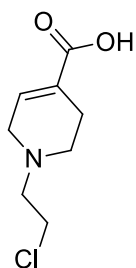


1-(2-хлороетил)-5-фенил-2,5-дихидро-1H-тетразол (**CBE-RR3**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,46 – 7,07 (m, 6H), 5,71 (s, 1H), 4,96 (s, 1H), 3,52 – 3,48 (m, 2H), 3,18 (s, 1H), 2,58 (s, 1H), 2,56 – 2,43 (m, 7H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 133,07 (s), 129,18 (s), 129,00 – 128,66 (m), 126,17 – 125,77 (m), 55,17 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,43 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -29,19 – -30,05 (m), -271,30 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClN}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 210,0762; нађено 210,6639.

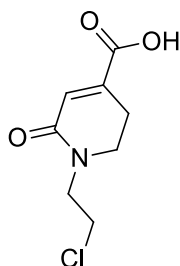


2-(1-(2-хлороетил)-2,5-дихидро-1H-тетразол-5-ил)сирћетна киселина (**CBE-RR4**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,35 (s, 1H), 7,63 (s, 1H), 4,61 (s, 1H), 3,68 – 3,64 (m, 2H), 3,07 (s, 1H), 2,86 (s, 1H), 2,81 (s, 1H), 2,58 – 2,28 (m, 8H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 170,48 (s), 53,04 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,43 (s), 36,59 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -29,19 – -30,05 (m), -271,30 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 254,17 – 253,40 (m), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_5\text{H}_9\text{ClN}_4\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 192,0431; нађено 192,0444.

Експериментални део



1-(2-хлороетил)-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина (CBE-RR5). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,31 (s, 6H), 3,62 – 3,58 (m, 10H), 3,58 – 3,46 (m, 12H), 2,83 (s, 5H), 2,73 (s, 7H), 2,55 – 2,43 (m, 47H), 2,43 – 2,25 (m, 13H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 168,78 (s), 134,05 (s), 128,27 (s), 55,91 (s), 53,34 (s), 52,61 (s), 40,27 (s), 40,17 – 39,96 (m), 27,71 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,20 (s), 253,90 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 189,0632; нађено 189,0644.

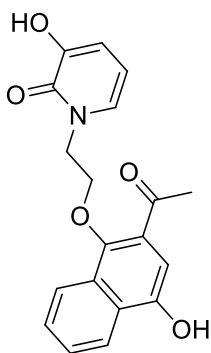


1-(2-хлороетил)-6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина (CBE-RR6). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,02 (s, 5H), 6,82 (s, 5H), 3,84 – 3,67 (m, 10H), 3,38 (d, $J = 33,7$ Hz, 10H), 3,19 (s, 4H), 3,06 (s, 5H), 2,80 – 2,76 (m, 8H), 2,57 – 2,43 (m, 30H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 167,57 (s), 159,80 (s), 140,77 (s), 127,41 (s), 48,17 (s), 44,70 (s), 41,63 (s), 40,17 – 39,96 (m), 27,20 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -263,70 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 337,20 (s), 306,00 (s), 253,90 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 203,0324; нађено 203,0421.

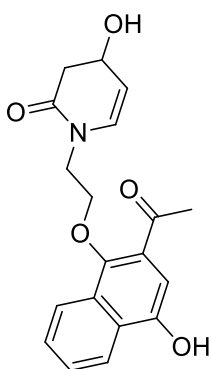
Синтеза једињења **CBE-R1**, **CBE-R2**, **CBE-R3**, **CBE-R4**, **CBE-R5** и **CBE-R6**.

Смеси безводног DMF-а (2 mL) и фино млевеног безводног K_2CO_3 (125,15 mg, 920 μmol) додат је 1-(1,4-дихидрокси-нафтален-2-ил)етанон (93,02 mg, 460 μmol), да би потом било извршено загревање до 100°C . Постепено додавање било **CBE-RR1** (80,00 mg, 460 μmol), **CBE-RR2** (80,78 mg, 460 μmol), **CBE-RR3** (96,90 mg, 460 μmol), **CBE-RR4** (88,60 mg, 460 μmol), **CBE-RR5** (87,23 mg, 460 μmol) или **CBE-RR6** (64,91 mg, 460 μmol) извршено је током 10 минута. Дозвољено је да реакција траје 1,5 сат на 100°C . Након филтрирања филтрат је упарен ради уклањања вишка DMF до добијања смеђег уљастог остатка. Талог из филтрације растворен је у 10 mL воде и екстрахован два пута са 5 mL етилацетата. Са друге стране, уљани остатак растворен је добијеним екстрактима етил ацетата који је затим испран коришћењем неколико порција воденог раствора NaCl. Раствор етилацетата осушен је и упарен да би се добило смеђе уље чија је TLC анализа из етилацетата као елуента дала једну тачку на хроматограму. Производи (**CBE-R1**, **CBE-R2**, **CBE-R3**, **CBE-R4**, **CBE-R5**, или **CBE-RR6**, 134,25 mg, 86%; 128,72 mg, 82%; 145,44 mg, 86%; 130,22 mg, 79%; 134,41 mg, 81%; 134,23 mg, 79%; респективно) пречишћени су на колони силицијум диоксида (*n*-hexane: EtOAc = 9: 1 v/v).

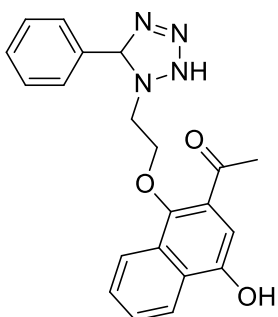
Докторска дисертација Незрине Куртановић



1-(2-((2-ацетил-4-хидроксиафтаден-1-ил)окси)етил)-3-хидроксипиридин-2(1H)-он (CBE-R1). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,58 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,87 (s, 1H), 7,36 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,49 (s, 1H), 6,43 (s, 1H), 5,87 (d, $J = 4,8$ Hz, 2H), 4,84 (s, 1H), 4,27 – 4,06 (m, 2H), 3,96 (s, 1H), 3,85 (s, 1H), 2,58 – 2,39 (m, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 160,50 (s), 155,75 (s), 152,66 (s), 151,46 (s), 135,69 (s), 126,67 (s), 126,08 (s), 125,80 (d, $J = 1,3$ Hz), 124,17 (s), 123,59 (s), 122,97 (s), 115,03 (s), 111,34 (s), 104,55 (s), 68,36 (s), 44,66 (s), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s). $^{15}\text{N NMR}$ (51 MHz, DMSO- d_6) δ -227,80 (s). $^{17}\text{O NMR}$ (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 306,00 (s), 95,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 339,11; нађено 339,34.



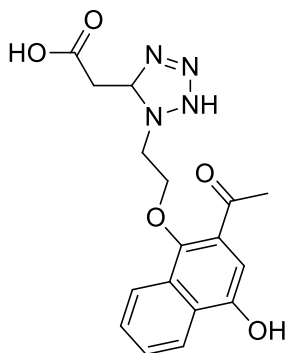
1-(2-((2-ацетил-4-хидроксиафтаден-1-ил)окси)етил)-4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1H)-он (CBE-R2). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,09 (s, 9H), 7,82 (s, 9H), 7,42 (d, $J = 4,6$ Hz, 2H), 7,37 (d, $J = 46,5$ Hz, 14H), 6,67 (s, 10H), 6,57 (d, $J = 9,5$ Hz, 17H), 5,76 (s, 9H), 5,23 (s, 9H), 4,58 (s, 9H), 4,19 – 4,15 (m, 14H), 3,86 (s, 7H), 3,51 (s, 7H), 2,66 (s, 8H), 2,64 – 2,50 (m, 66H), 2,50 – 2,43 (m, 16H), 1,86 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 168,72 (s), 152,66 (s), 151,46 (s), 128,34 (s), 126,67 (s), 126,08 (s), 125,80 (d, $J = 1,3$ Hz), 124,17 (s), 123,59 (s), 122,97 (s), 111,52 (s), 104,55 (s), 68,36 (s), 66,93 (s), 43,97 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,66 (s), 28,28 (s). $^{15}\text{N NMR}$ (51 MHz, DMSO- d_6) δ -227,80 (s). $^{17}\text{O NMR}$ (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 371,00 (s), 95,00 (s), 78,00 (s), 32,30 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 341,14; нађено 341,38.



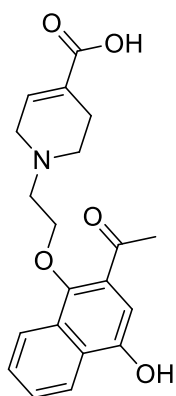
1-(4-хидрокси-1-(2-(5-фенил-2,5-дихидро-1H-тетразол-1-ил)етокси)нафтаден-2-ил)етанон (CBE-R3). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,18 (s, 5H), 8,10 (s, 5H), 7,92 (s, 5H), 7,45 (s, 5H), 7,47 – 7,10 (m, 35H), 6,79 (s, 5H), 4,87 (s, 5H), 4,53 (s, 5H), 4,05 – 4,01 (m, 8H), 2,95 (s, 4H), 2,74 (s, 4H), 2,60 – 2,42 (m, 45H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 152,66 (s), 151,46 (s), 133,07 (s), 129,18 (s), 129,06 – 128,66 (m), 126,67 (s), 126,28 – 125,79 (m), 125,79 – 125,68 (m), 124,17 (s), 123,59 (s), 122,97 (s), 104,55 (s), 65,71 (s), 53,07 (s), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s). $^{15}\text{N NMR}$ (51 MHz, DMSO- d_6) δ -29,19 – -30,05 (m), -271,30 (s). $^{17}\text{O NMR}$ (68

Експериментални део

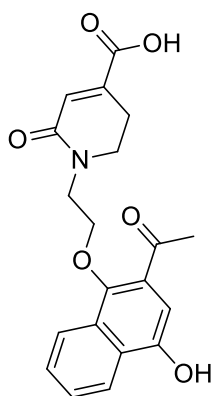
MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 95,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $C_{21}H_{20}N_4O_3$ [M + H]⁺: 376,14; нађено 376,47.



2-(1-(2-((2-ацетил-4-хидроксиафтален-1-ил)окси)етил)-2,5-дихидро-1H-тетразол-5-ил)сирћетна киселина (**CBE-R4**). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 170,48 (s), 152,66 (s), 151,46 (s), 126,67 (s), 126,08 (s), 125,80 (d, $J = 1,3$ Hz), 124,17 (s), 123,59 (s), 122,97 (s), 104,55 (s), 65,71 (s), 52,52 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,59 (s), 28,28 (s). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 170,48 (s), 152,66 (s), 151,46 (s), 126,67 (s), 126,08 (s), 125,80 (d, $J = 1,3$ Hz), 124,17 (s), 123,59 (s), 122,97 (s), 104,55 (s), 65,71 (s), 52,52 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,59 (s), 28,28 (s). ¹⁵N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -29,19 – -30,05 (m), -271,30 (s). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 254,17 – 253,40 (m), 95,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $C_{17}H_{18}N_4O_5$ [M + H]⁺: 358,14; нађено 358,38.



1-(2-((2-ацетил-4-хидроксиафтален-1-ил)окси)етил)-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина (**CBE-R5**). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,99 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,43 – 7,11 (m, 3H), 6,59 (s, 1H), 5,81 (s, 1H), 4,19 – 4,02 (m, 2H), 3,65 – 3,47 (m, 2H), 3,15 (s, 1H), 2,87 (s, 1H), 2,70 – 2,43 (m, 12H), 2,39 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 168,78 (s), 152,66 (s), 151,46 (s), 134,05 (s), 128,27 (s), 126,67 (s), 126,08 (s), 125,80 (d, $J = 1,3$ Hz), 124,17 (s), 123,59 (s), 122,97 (s), 104,55 (s), 69,24 (s), 53,91 (s), 53,34 (s), 52,61 (s), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s), 27,71 (s). ¹⁵N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -330,10 (s). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 337,20 (s), 253,90 (s), 95,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $C_{20}H_{21}NO_5$ [M + H]⁺: 355,14; нађено 355,62.

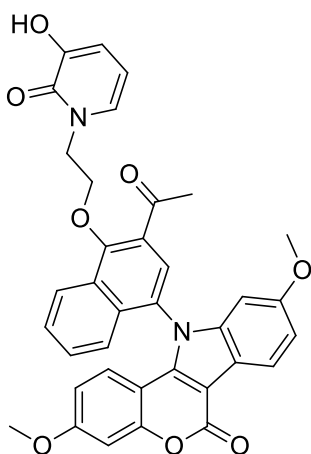


1-(2-((2-ацетил-4-хидроксиафтален-1-ил)окси)етил)-6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина (**CBE-R6**). ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,97 (s, 1H), 9,67 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,37 (d, $J = 29,5$ Hz, 2H), 7,20 (s, 1H), 6,76 (s, 1H), 4,31 – 4,14 (m, 2H), 3,37 (d, $J = 13,7$ Hz, 2H), 3,20 (s, 1H), 3,15 (s, 1H), 3,07 – 2,95 (m, 2H), 2,57 – 2,43 (m, 6H), 2,43 – 2,33 (m, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 167,57 (s), 159,80 (s), 152,66 (s), 151,46 (s), 140,77 (s), 127,41 (s), 126,67 (s), 126,08 (s), 125,80 (d, $J = 1,3$ Hz), 124,17 (s),

Докторска дисертација Незрине Куртановић

123,59 (s), 122,97 (s), 104,55 (s), 67,89 (s), 44,73 (d, $J = 7,3$ Hz), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s), 27,20 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -263,70 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 337,20 (s), 306,00 (s), 253,90 (s), 95,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 369,14; нађено 369,39.

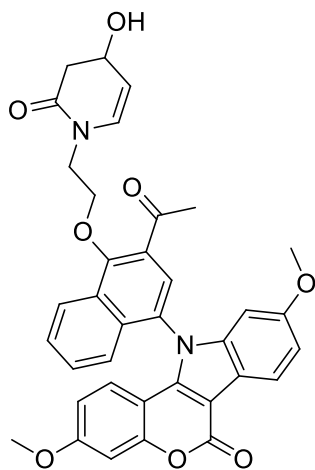
Синтеза једињења **Pro-CBE-1**, **Pro-CBE-2**, **Pro-CBE-3**, **Pro-CBE-4**, **Pro-CBE-5** и **Pro-CBE-6**. Одређена количина 3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-она (77,79 mg, 300 μmol) растворена је у 45 mL апсолутног ацетона. Затим су додати калијум карбонат (12,7 mg, 1 mmol), калијум јодид (49,80 mg, 300 μmol) и **CBE-R1** (101,80 mg, 300 μmol), **CBE-R2** (102,41 mg, 300 μmol), **CBE-R3** (112,92 mg, 300 μmol), **CBE-R4** (107,51 mg, 300 μmol), **CBE-R5** (106,61 mg, 300 μmol) или **CBE-R6** (110,81 mg, 300 μmol). Смеша је рефлугована 72h. После хлађења, производ (**Pro-CBE-1**, **Pro-CBE-2**, **Pro-CBE-3**, **Pro-CBE-4**, **Pro-CBE-5** или **Pro-CBE-6**, 155,28 mg, 84%, 161,46 mg, 87%, 166,69 mg, 85%, 154,45 mg, 81%, 165,12 mg, 87%, 161,01 mg, 83%, респективно, кристалисао је као бела чврста супстанца из добијеног раствора.



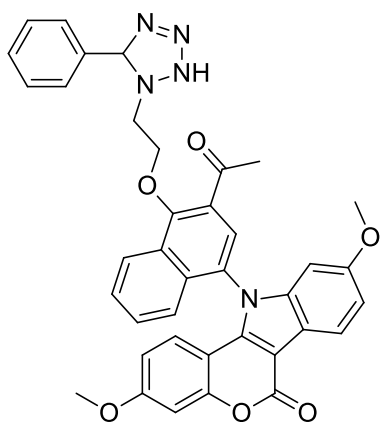
11-(3-ацетил-4-(2-(3-хидрокси-2-оксопиридин-1(2*H*)-*yl*)етокси)нафтаген-1-ил)-3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-он (**Pro-CBE-1**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,67 (s, 6H), 8,56 (s, 6H), 8,13 (s, 6H), 7,99 (s, 6H), 20,00 – 7,14 (m, 66H), 7,84 (s, 6H), 7,79 (s, 6H), 7,59 (s, 6H), 7,41 (d, $J = 34,9$ Hz, 11H), 7,41 (d, $J = 34,9$ Hz, 11H), 6,92 (s, 6H), 6,15 (s, 6H), 5,90 (d, $J = 47,5$ Hz, 12H), 4,34 – 4,18 (m, 12H), 3,85 (s, 3H), 3,85 – 3,71 (m, 37H), 3,64 (s, 1H), 3,58 (s, 6H), 2,64 – 2,50 (m, 37H), 2,50 – 2,43 (m, 15H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6)

δ 201,33 (s), 161,84 (s), 160,83 (s), 160,50 (s), 159,30 (s), 157,63 (s), 155,75 (s), 154,77 (s), 142,65 (s), 135,69 (s), 134,54 (s), 133,05 (s), 131,78 (s), 129,27 (s), 128,86 (s), 127,89 (s), 126,92 (s), 126,38 (s), 126,09 (s), 124,18 (s), 121,22 (s), 118,50 (s), 117,94 (s), 115,03 (s), 113,65 (s), 111,34 (s), 110,95 (s), 109,09 (s), 102,66 (s), 95,00 (s), 92,45 (s), 68,36 (s), 56,23 – 55,83 (m), 44,66 (s), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -227,80 (s), -249,90 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 334,00 (s), 306,00 (s), 172,00 (s), 78,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{36}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 616,18; нађено 616,62.

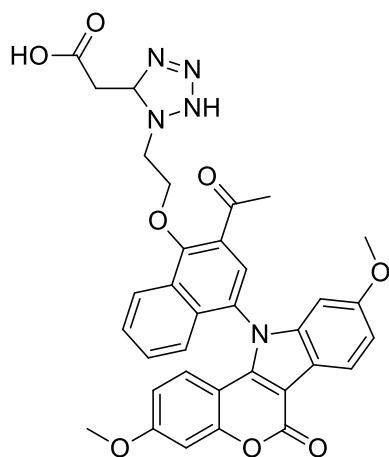
Експериментални део



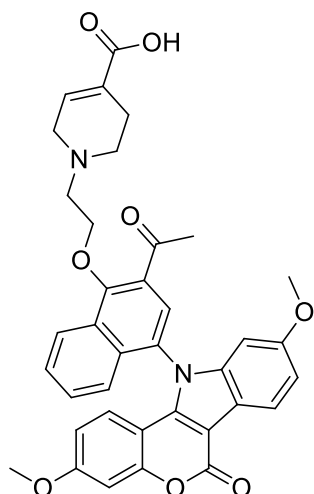
11-(3-ацетил-4-(2-(4-хидрокси-2-оксо-3,4-дихидропиридин-1(2H)-ил)етокси)нафтаден-1-ил)-3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11H)-он (**Pro-CBE-2**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,72 (s, 2H), 8,18 (s, 2H), 7,92 (d, $J = 40,4$ Hz, 4H), 7,75 (s, 2H), 7,67 – 7,29 (m, 6H), 7,17 (s, 2H), 6,90 (d, $J = 37,5$ Hz, 4H), 6,69 (s, 2H), 5,24 (s, 2H), 4,58 (s, 2H), 4,40 (s, 2H), 4,38 – 4,22 (m, 4H), 3,87 – 3,70 (m, 12H), 3,57 (d, $J = 10,6$ Hz, 4H), 2,61 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 2,60 – 2,43 (m, 19H), 2,02 (s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 168,72 (s), 161,84 (s), 160,83 (s), 159,30 (s), 157,63 (s), 154,77 (s), 142,65 (s), 134,54 (s), 133,05 (s), 131,78 (s), 129,27 (s), 128,86 (s), 128,34 (s), 127,89 (s), 126,92 (s), 126,38 (s), 126,09 (s), 124,18 (s), 121,22 (s), 118,50 (s), 117,94 (s), 113,65 (s), 111,52 (s), 110,95 (s), 109,09 (s), 102,66 (s), 95,00 (s), 92,45 (s), 68,36 (s), 66,93 (s), 56,23 – 55,83 (m), 43,97 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,66 (s), 28,28 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -227,80 (s), -249,90 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 371,00 (s), 334,00 (s), 172,00 (s), 78,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 32,30 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 618,21; нађено 618,68.



11-(3-ацетил-4-(2-(5-фенил-2,5-дихидро-1H-тетразол-1-ил)етокси)нафтаден-1-ил)-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11H)-он (**Pro-CBE-3**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,65 (s, 6H), 8,09 (d, $J = 53,3$ Hz, 12H), 8,03 (s, 7H), 7,83 (s, 6H), 7,49 (d, $J = 4,3$ Hz, 3H), 7,49 – 7,11 (m, 54H), 6,93 (s, 6H), 6,80 (s, 7H), 5,90 (s, 6H), 5,05 (s, 6H), 4,07 – 4,03 (m, 10H), 3,88 – 3,70 (m, 37H), 2,98 (s, 5H), 2,87 (s, 5H), 2,66 – 2,51 (m, 23H), 2,51 – 2,43 (m, 33H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 161,84 (s), 160,83 (s), 159,30 (s), 157,63 (s), 154,77 (s), 142,65 (s), 134,54 (s), 133,06 (d, $J = 2,4$ Hz), 131,78 (s), 129,23 (d, $J = 11,9$ Hz), 129,04 – 128,75 (m), 127,89 (s), 126,92 (s), 126,38 (s), 126,19 – 125,77 (m), 124,18 (s), 121,22 (s), 118,50 (s), 117,94 (s), 113,65 (s), 110,95 (s), 109,09 (s), 102,66 (s), 95,00 (s), 92,45 (s), 65,71 (s), 56,23 – 55,83 (m), 53,07 (s), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -29,19 – -30,05 (m), -249,90 (s), -271,30 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 334,00 (s), 172,00 (s), 78,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{38}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 653,23; нађено 653,25.



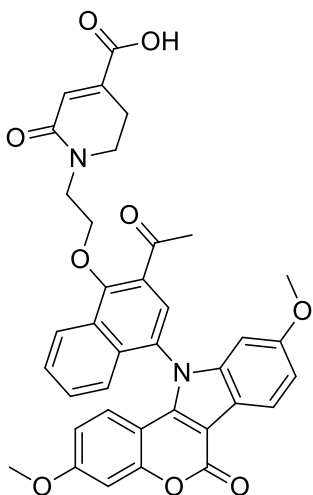
2-(1-(2-((2-ацетил-4-(3,9-диметокси-6-оксохромено[4,3-*b*]индол-11(6*H*)-ил)нафтаген-1-ил)окси)етил)-2,5-дихидро-1*H*-тетразол-5-ил)сирћетна киселина (**Pro-CBE-4**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 17,82 (s, 9H), 8,75 (s, 9H), 8,16 (s, 11H), 8,03 (d, $J = 14,0$ Hz, 16H), 7,74 (s, 9H), 7,50 (s, 1H), 7,53 – 7,30 (m, 27H), 7,21 (s, 9H), 6,89 (s, 9H), 6,79 (s, 9H), 5,96 (s, 9H), 5,01 (s, 9H), 4,67 (s, 9H), 4,15 – 3,98 (m, 18H), 3,85 (s, 1H), 3,85 – 3,70 (m, 52H), 3,26 (s, 9H), 2,84 (s, 9H), 2,65 – 2,50 (m, 41H), 2,50 – 2,43 (m, 39H), 1,97 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 170,48 (s), 161,84 (s), 160,83 (s), 159,30 (s), 157,63 (s), 154,77 (s), 142,65 (s), 134,54 (s), 133,05 (s), 131,78 (s), 129,27 (s), 128,86 (s), 127,89 (s), 126,92 (s), 126,38 (s), 126,09 (s), 124,18 (s), 121,22 (s), 118,50 (s), 117,94 (s), 113,65 (s), 110,95 (s), 109,09 (s), 102,66 (s), 95,00 (s), 92,45 (s), 65,71 (s), 56,23 – 55,83 (m), 52,52 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,59 (s), 28,28 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -29,19 – -30,05 (m), -249,90 (s), -271,30 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 334,00 (s), 254,17 – 253,40 (m), 172,00 (s), 78,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{34}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 635,22; нађено 635,49.



1-(2-((2-ацетил-4-(3,9-диметокси-6-оксохромено[4,3-*b*]индол-11(6*H*)-ил)нафтаген-1-ил)окси)етил)-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина (**Pro-CBE-5**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,81 (s, 2H), 8,49 (s, 2H), 8,37 (s, 2H), 8,17 (s, 2H), 7,98 (s, 2H), 7,77 (d, $J = 6,2$ Hz, 4H), 7,59 – 7,23 (m, 6H), 7,14 (s, 2H), 6,92 (d, $J = 7,3$ Hz, 4H), 4,17 – 3,99 (m, 4H), 3,87 – 3,73 (m, 7H), 3,73 – 3,66 (m, 5H), 3,65 – 3,46 (m, 4H), 2,91 (s, 2H), 2,68 (s, 2H), 2,65 – 2,58 (m, 8H), 2,58 – 2,31 (m, 18H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 168,78 (s), 161,84 (s), 160,83 (s), 159,30 (s), 157,63 (s), 154,77 (s), 142,65 (s), 134,54 (s), 134,05 (s), 133,05 (s), 131,78 (s), 129,27 (s), 128,86 (s), 128,27 (s), 127,89 (s), 126,92 (s), 126,38 (s), 126,09 (s), 124,18 (s), 121,22 (s), 118,50 (s), 117,94 (s), 113,65 (s), 110,95 (s), 109,09 (s), 102,66 (s), 95,00 (s), 92,45 (s), 69,24 (s), 56,23 – 55,83 (m), 53,91 (s), 53,34 (s), 52,61 (s), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s), 27,71 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -249,90 (s), -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s),

Експериментални део

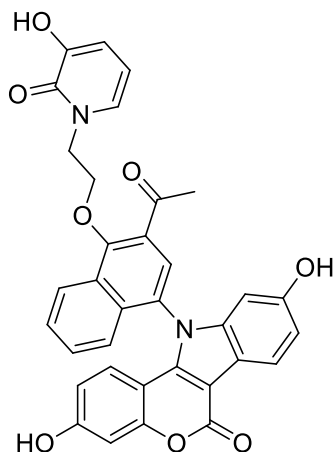
337,20 (s), 334,00 (s), 253,90 (s), 172,00 (s), 78,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за C₃₇H₃₂N₂O₈ [M + H]⁺: 632,22; нађено 632,64.



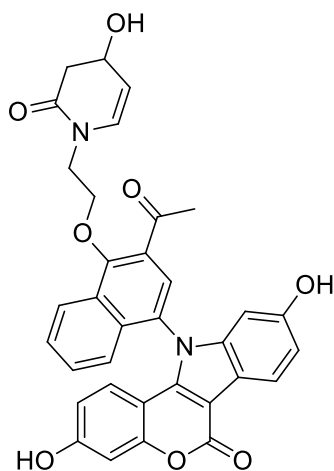
*1-(2-((2-ацетил-4-(3,9-диметокси-6-оксохромено[4,3-*b*]индол-11(6*H*)-ил)нафтален-1-ил)окси)етил)-6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина (Pro-CBE-6).* ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 16,77 (s, 2H), 8,53 (s, 2H), 8,14 (s, 2H), 7,97 (s, 2H), 7,85 – 7,65 (m, 5H), 7,64 (s, 1H), 7,57 – 7,23 (m, 6H), 7,21 (s, 2H), 6,88 (d, *J* = 24,4 Hz, 4H), 4,31 – 4,14 (m, 4H), 3,88 – 3,72 (m, 12H), 3,52 (s, 2H), 3,39 (s, 2H), 3,20 (s, 2H), 3,10 (s, 2H), 2,81 – 2,63 (m, 4H), 2,57 – 2,39 (m, 18H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 201,33 (s), 167,57 (s), 161,84 (s), 160,83 (s), 159,80 (s), 159,30 (s), 157,63 (s), 154,77 (s), 142,65 (s),

140,77 (s), 134,54 (s), 133,05 (s), 131,78 (s), 129,27 (s), 128,86 (s), 127,89 (s), 127,41 (s), 126,92 (s), 126,38 (s), 126,09 (s), 124,18 (s), 121,22 (s), 118,50 (s), 117,94 (s), 113,65 (s), 110,95 (s), 109,09 (s), 102,66 (s), 95,00 (s), 92,45 (s), 67,89 (s), 56,23 – 55,83 (m), 44,73 (d, *J* = 7,3 Hz), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s), 27,20 (s). ¹⁵N NMR (51 MHz, DMSO-*d*₆) δ -249,90 (s), -263,70 (s). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 488,00 (s), 337,20 (s), 334,00 (s), 306,00 (s), 253,90 (s), 172,00 (s), 78,00 (s), 63,00 (s), 50,70 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за C₃₇H₃₀N₂O₉ [M + H]⁺: 646,24; нађено 646,64.

Синтеза једињења CBE-1, CBE-2, CBE-3, CBE-4, CBE-5 и CBE-6. У атмосфери аргона, раствору **Pro-CBE-1** (123,64 mg, 200 μmol), **Pro-CBE-2** (123,73 mg, 200 μmol), **Pro-CBE-3** (130,74 mg, 200 μmol), **Pro-CBE-4** (127,12 mg, 200 μmol), **Pro-CBE-5** (126,53 mg, 200 μmol) или **Pro-CBE-6** (129,33 mg, 200 μmol) у сувом дихлорометану на 0°C додаван је бор трибромид (2 еквивалента по метокси функција) кап по кап. Добијена смеша је затим рефлугована 3 сата и сипана у смешу лед/вода након чега је охлађена на собну температуру. Водени слој екстрахован је етил ацетатом. Комбиновани органски слојеви испрани су сланим раствором, осушени преко безводног Na₂SO₄ и затим филтрирани и концентровани у вакууму. Добијени производи, **CBE-1** (105,94 mg, 90%), **CBE-2** (105,12 mg, 89%), **CBE-3** (107,61 mg, 86%), **CBE-4** (105,72 mg, 87%), **CBE-5** (107,62 mg, 89%) или **CBE-6** (110,11 mg, 90%), пречишћени су хроматографијом на колони силика гела (Et₂O:EtOAc = 75:25 v/v) у виду чврстих супстанци наранцасте боје.

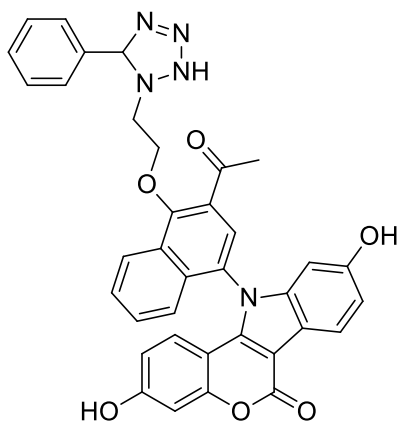


11-(3-ацетил-4-(2-(3-хидрокси-2-оксопиридин-1(2H)-ил)етокси)нафтален-1-ил)-3,9-дихидрохромено[4,3-*b*]индол-6(11H)-он (**СВЕ-1**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11,79 (s, 1H), 10,07 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 8,01 – 7,76 (m, 3H), 7,42 (d, $J = 3,1$ Hz, 2H), 7,30 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 6,83 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,49 (s, 1H), 6,10 (s, 1H), 5,91 (s, 1H), 5,32 (s, 1H), 4,39 – 4,22 (m, 2H), 3,82 (s, 1H), 3,60 (s, 1H), 2,67 – 2,52 (m, 3H), 2,52 – 2,43 (m, 5H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 161,84 (s), 160,55 (d, $J = 10,5$ Hz), 159,30 (s), 158,68 (s), 155,75 (s), 154,73 (s), 142,65 (s), 135,69 (s), 134,10 (s), 133,05 (s), 131,78 (s), 129,22 (s), 128,86 (s), 127,89 (s), 126,92 (s), 126,38 (s), 126,09 (s), 124,18 (s), 121,22 (s), 118,37 (s), 116,22 (d, $J = 5,4$ Hz), 115,03 (s), 112,75 (s), 111,34 (s), 105,96 (s), 104,62 (s), 95,69 (s), 92,45 (s), 68,36 (s), 44,66 (s), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -227,80 (s), -249,90 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 334,00 (s), 306,00 (s), 172,00 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 588,15; нађено 588,56.

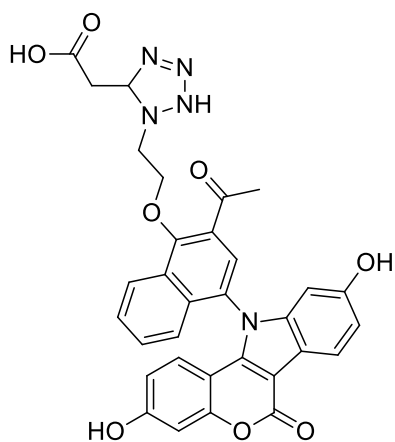


11-(3-ацетил-4-(2-(4-хидрокси-2-оксо-3,4-дихидропиридин-1(2H)-ил)етокси)нафтален-1-ил)-3,9-дихидрохромено[4,3-*b*]индол-6(11H)-он (**СВЕ-2**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,56 (s, 5H), 8,53 (s, 5H), 8,23 (s, 5H), 8,07 (s, 5H), 7,86 (s, 5H), 7,74 (s, 5H), 7,50 (s, 5H), 7,45 (s, 4H), 7,38 (s, 6H), 7,20 (s, 5H), 6,98 (s, 5H), 6,77 (d, $J = 19,0$ Hz, 10H), 5,27 (d, $J = 6,2$ Hz, 10H), 4,58 (s, 5H), 4,36 – 4,24 (m, 14H), 3,83 (s, 4H), 3,41 (s, 4H), 2,63 – 2,29 (m, 50H), 2,43 – 2,29 (m, 1H), 2,00 (s, 5H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 168,72 (s), 161,84 (s), 160,59 (s), 159,30 (s), 158,68 (s), 154,73 (s), 142,65 (s), 134,10 (s), 133,05 (s), 131,78 (s), 129,22 (s), 128,86 (s), 128,34 (s), 127,89 (s), 126,92 (s), 126,38 (s), 126,09 (s), 124,18 (s), 121,22 (s), 118,37 (s), 116,22 (d, $J = 5,4$ Hz), 112,75 (s), 111,52 (s), 105,96 (s), 104,62 (s), 95,69 (s), 92,45 (s), 68,36 (s), 66,93 (s), 43,97 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,66 (s), 28,28 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -227,80 (s), -249,90 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 371,00 (s), 334,00 (s), 172,00 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 78,00 (s), 32,30 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8$: [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 592,17 нађено; 592,19.

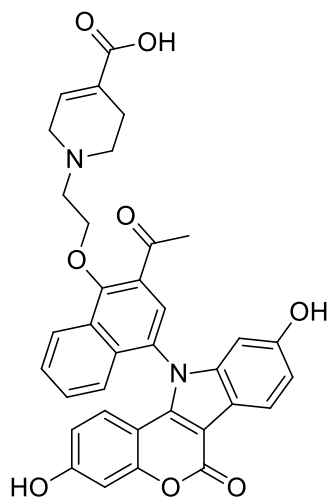
Експериментални део



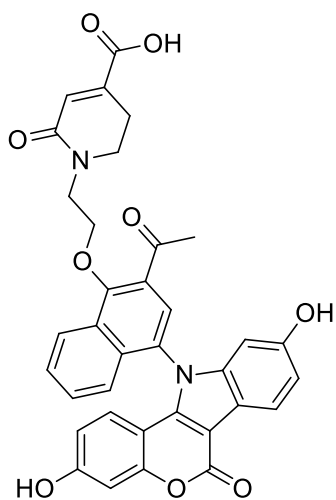
11-(3-ацетил-4-(2-(5-фенил-2,5-дихидро-1H-тетразол-1-ил)етокси)нафтаген-1-ил)-3,9-дихидрохромено[4,3-*b*]индол-6(11H)-он (**СВЕ-3**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,52 (s, 7H), 8,17 (s, 7H), 7,92 (d, $J = 10,8$ Hz, 14H), 7,52 (s, 6H), 7,49 – 7,34 (m, 21H), 7,29 (dt, $J = 27,2, 13,6$ Hz, 34H), 7,11 (s, 1H), 7,08 (s, 7H), 6,85 (s, 1H), 6,83 (s, 7H), 6,71 (d, $J = 24,5$ Hz, 13H), 5,36 (s, 7H), 5,11 (s, 7H), 5,00 (s, 7H), 4,19 – 4,02 (m, 14H), 2,92 (s, 7H), 2,88 (s, 7H), 2,60 – 2,43 (m, 62H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 161,84 (s), 160,59 (s), 159,30 (s), 158,68 (s), 154,73 (s), 142,65 (s), 134,10 (s), 133,06 (d, $J = 2,4$ Hz), 131,78 (s), 129,20 (d, $J = 4,5$ Hz), 129,01 – 128,75 (m), 127,89 (s), 126,92 (s), 126,38 (s), 126,19 – 125,77 (m), 124,18 (s), 121,22 (s), 118,37 (s), 116,22 (d, $J = 5,4$ Hz), 112,75 (s), 105,96 (s), 104,62 (s), 95,69 (s), 92,45 (s), 65,71 (s), 53,07 (s), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -29,19 – -30,05 (m), -249,90 (s), -271,30 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 334,00 (s), 172,00 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{36}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_6$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 652,20, нађено; 625,34.



2-(1-(2-((2-ацетил-4-(3,9-дихидрохромено[4,3-*b*]индол-11(6H)-ил)нафтаген-1-ил)окси)етил)-2,5-дихидро-1H-тетразол-5-yl)сирћетна киселина (**СВЕ-4**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,32 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,84 (s, 1H), 7,37 (d, $J = 14,9$ Hz, 2H), 6,84 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 5,33 (s, 1H), 4,94 (s, 1H), 4,14 – 4,10 (m, 2H), 3,14 (s, 1H), 2,97 (s, 1H), 2,92 (s, 1H), 2,66 – 2,51 (m, 4H), 2,51 – 2,48 (m, 5H), 2,35 (s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 170,48 (s), 152,66 (s), 151,46 (s), 126,67 (s), 126,08 (s), 125,80 (d, $J = 1,3$ Hz), 124,17 (s), 123,59 (s), 122,97 (s), 104,55 (s), 65,71 (s), 52,52 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,59 (s), 28,28 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -29,19 – -30,05 (m), -271,30 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 254,17 – 253,40 (m), 95,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{32}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_8$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 607,18, нађено; 608,24.



*1-(2-((2-ацетил-4-((3,9-дихидрохромено[4,3-*b*]индол-11(6H)-ил)нафтален-1-ил)окси)етил)-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина (СВЕ-5).* ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 17,91 (s, 3H), 8,55 (s, 3H), 8,21 (s, 3H), 8,02 – 7,84 (m, 9H), 7,82 (s, 3H), 7,42 (dd, $J = 41,4, 30,4$ Hz, 12H), 7,13 (s, 3H), 6,83 (s, 3H), 6,65 (s, 3H), 5,07 (s, 3H), 4,24 – 4,07 (m, 6H), 3,65 – 3,47 (m, 6H), 3,01 (d, $J = 15,8$ Hz, 6H), 2,76 (s, 3H), 2,67 – 2,45 (m, 35H), 2,45 – 2,35 (m, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 168,78 (s), 161,84 (s), 160,59 (s), 159,30 (s), 158,68 (s), 154,73 (s), 142,65 (s), 134,08 (d, $J = 6,8$ Hz), 133,05 (s), 131,78 (s), 129,22 (s), 128,86 (s), 128,27 (s), 127,89 (s), 126,92 (s), 126,38 (s), 126,09 (s), 124,18 (s), 121,22 (s), 118,37 (s), 116,22 (d, $J = 5,4$ Hz), 112,75 (s), 105,96 (s), 104,62 (s), 95,69 (s), 92,45 (s), 69,24 (s), 53,91 (s), 53,34 (s), 52,61 (s), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s), 27,71 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -249,90 (s), -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 337,20 (s), 334,00 (s), 253,90 (s), 172,00 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{35}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_8$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 604,18, нађено; 604,61.

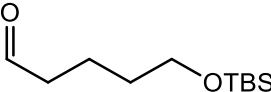


*1-(2-((2-ацетил-4-(3,9-дихидрокси-6-оксохромено[4,3-*b*]индол-11(6H)-ил)нафтален-1-ил)окси)етил)-6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина (СВЕ-6).* ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,96 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,87 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,43 (d, $J = 43,4$ Hz, 2H), 7,22 (s, 1H), 6,84 (s, 1H), 6,77 (d, $J = 49,6$ Hz, 2H), 5,36 (s, 1H), 5,07 (s, 1H), 4,16 – 4,12 (m, 2H), 3,68 (d, $J = 10,6$ Hz, 2H), 3,30 (s, 1H), 3,20 (s, 1H), 2,82 – 2,65 (m, 2H), 2,65 – 2,51 (m, 4H), 2,51 – 2,43 (m, 5H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201,33 (s), 167,57 (s), 161,84 (s), 160,59 (s), 159,80 (s), 159,30 (s), 158,68 (s), 154,73 (s), 142,65 (s), 140,77 (s), 134,10 (s), 133,05 (s), 131,78 (s), 129,22 (s), 128,86 (s), 127,89 (s), 127,41 (s), 126,92 (s), 126,38 (s), 126,09 (s), 124,18 (s), 121,22 (s), 118,37 (s), 116,22 (d, $J = 5,4$ Hz), 112,75 (s), 105,96 (s), 104,62 (s), 95,69 (s), 92,45 (s), 67,89 (s), 44,73 (d, $J = 7,3$ Hz), 40,17 – 39,96 (m), 28,28 (s), 27,20 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -249,90 (s), -263,70 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 337,20 (s), 334,00 (s), 306,00 (s), 253,90 (s), 172,00 (s), 93,30 (s), 88,00 (s), 78,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{35}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_9$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 618,16, нађено; 618,59.

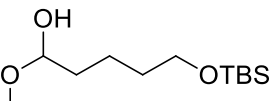
Експериментални део

Синтетички протоколи за припрему једињења **3DPQ-1** до **3DPQ-12**

Синтеза једињења R1. Реагенс **R1** је припремљен према претходно описаном поступку као бело уље (12,07 g, 87%).

 **5-((tert-бутилдиметилсилил)окси)пентанал (R1).** ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) 9,65 (s, 1H), 3,82 – 3,66 (m, 22H), 2,57 (s, 1H), 2,70 – 2,34 (m, 89H), 1,66 (s, 1H), 1,66 – 1,38 (m, 44H), 1,12 – 0,98 (m, 97H), 0,20 – 0,07 (m, 65H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 198,49 (s), 63,02 (s), 40,17 – 39,96 (m), 36,09 (s), 30,03 (s), 25,72 – 25,33 (m), 22,78 (s), 18,42 (s), -3,02 – -3,41 (m). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 13,00 (s), 6,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 216,15, нађено 216,39.

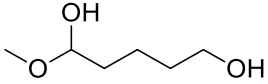
Синтеза једињења R2. 1 М раствор Me_2Zn (96 mL, 96 mmol) у хексану додат је у смешу (-)-DBNE (2,41 mL, 8,7 mmol) у толуену (24 mL) на 0°C. Затим је укапавањем додат раствор алдехида **R1** (9,42 g, 43,56 mmol) у толуену (140 mL), а реакциона смеша је мешана 24 h на 0°C и праћена помоћу TLC (SiO_2 : Et_2O : EtOAc = 2:1 v/v као елуент). Затим је додат засићени раствор NH_4Cl (160 mL), а водена фаза је екстрахована са CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). Комбиновани органски слојеви осушени су преко Na_2SO_4 и филтрирани, а растварач је уклоњен на вакууму. Сирови производ пречишћен је флеш хроматографијом на колони силика гела (Et_2O : EtOAc = 10:1 v/v као елуент) да би се добио **R2** као безбојно уље са високим приносом (9,42 g, 88%).

 **5-метокси-2,2,3,3,11,11,12,12-октаметил-4,10-диокса-3,11-дисилатридекана (R2).** ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) 5,30 (s, 10H), 4,24 (s, 10H), 3,83 – 3,66 (m, 20H), 3,40 – 3,26 (m, 30H), 2,57 – 2,43 (m, 60H), 1,58 (dd, J = 27,9, 6,4 Hz, 42H), 1,43 (s, 3H), 1,53 – 1,22 (m, 24H), 1,10 – 0,96 (m, 90H), 0,22 – 0,08 (m, 60H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) 63,02 (s), 53,07 (s), 40,17 – 39,96 (m), 35,64 (s), 31,13 (s), 25,72 – 25,33 (m), 21,12 (s), 18,42 (s), -3,02 – -3,41 (m). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 44,50 (s), 23,00 (s), 13,00 (s), 6,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 248,18, нађено 248,18.

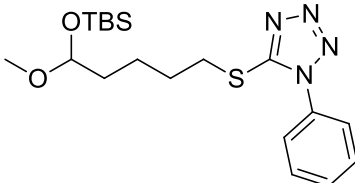
Синтеза једињења R3. У раствор **R2** (6,32 g, 25,48 mmol) у THF-у (260 mL), додата је 1N HCl (520 mL, 0,52 mol) на собној температури и смеша је мешана 20 мин пре третирања са чврстим NaHCO_3 . Након додавања воде (20 mL), смеша је екстрахована етил ацетатом (3 x 160 mL). Комбиновани органски слојеви су осушени

Докторска дисертација Незрине Куртановић

преко Na_2SO_4 , филтрирани и концентровани у вакууму. Сирови производ је пречишћен флеш хроматографијом на силика гелу ($\text{Et}_2\text{O}:\text{EtOAc} = 2:1$ као елуент) да би се добио **R3** (3,24 g, 95%) у облику безбојног уља.

 *1-метоксипентан-1,5-диол (R3)*. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,08 (s, 3H), 5,30 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,46 – 3,42 (m, 5H), 3,37 – 3,23 (m, 9H), 2,57 – 2,43 (m, 18H), 1,60 (d, $J = 20,0$ Hz, 7H), 1,51 – 1,15 (m, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 62,44 (s), 53,07 (s), 40,17 – 39,96 (m), 35,64 (s), 33,43 (s), 21,88 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 44,50 (s), 23,00 (s), 13,00 (s), -6,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_3$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 134,17, нађено 134,09.

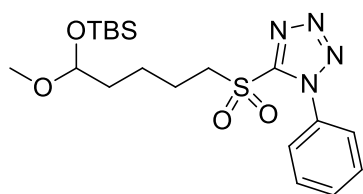
Синтеза једињења R4. У охлађен (0°C) раствор **R3** (2,92 g, 21,80 mmol) и PPh_3 (6,28 g, 23,96 mmol) у сувом THF-у (220 mL), укапан је DEAD (40 wt% у толуену, 10,80 mL, 23,56 mmol). После 10 мин, реакциона смеша је остављена да се загреје до собне температуре и мешана је током 16 h. Реакциона смеша концентрована је у вакууму и остатак је подвргнут флеш хроматографији на силика гелу ($\text{Et}_2\text{O}:\text{EtOAc} = 2:1$ v/v као елуент). Сирови производ растворен је у сувом CH_2Cl_2 (56 mL) и раствор је охлађен на 0°C . Затим су додани имидазол (3,72 g, 54,80 mmol), DMAP (664 mg, 5,55 mmol) и TBS-Cl (3,92 g, 26 mmol) и раствор је остављен да се загреје до собне температуре и мешан је током 3 сата. Додата је вода (120 mL), а водена фаза је одвојена и екстрахована помоћу CH_2Cl_2 (3 x 80 mL). Комбиновани органски слојеви осушени су преко Na_2SO_4 , филтрирани и концентровани у вакууму. Сирови производ подвргнут је флеш хроматографији на силика гелу ($\text{Et}_2\text{O}:\text{EtOAc} = 40:1$ v/v као елуент) да би се добио **R4** (6,22 g, 70 %) у облику безбојног уља.

 *5-((5-((tert-бутилдиметилсилил)окси)-5-метоксипентил)тио)-1-фенил-1H-тетразол (R4)*. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,91 – 7,71 (m, 10H), 7,33 – 7,29 (m, 8H), 7,12 (s, 5H), 5,30 (s, 5H), 3,40 – 3,26 (m, 15H), 3,00 – 2,96 (m, 8H), 2,57 – 2,43 (m, 30H), 1,68 (dd, $J = 25,9, 20,4$ Hz, 20H), 1,59 – 1,51 (m, 1H), 1,51 – 1,17 (m, 11H), 1,10 – 0,96 (m, 45H), 0,28 – 0,14 (m, 30H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 157,35 (s), 134,73 (s), 129,78 – 129,46 (m), 125,12 – 124,73 (m), 100,70 (s), 55,30 (s), 40,17 – 39,96 (m), 33,89 (s), 33,21 (s), 29,33 (s), 25,76 – 25,55 (m), 23,25 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 5,10 (s), -30,50 (s), -100,50

Експериментални део

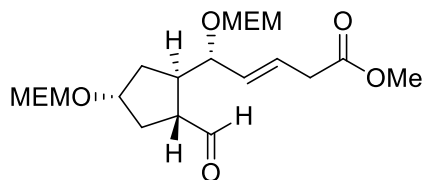
(s), -148,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 23,00 (s), 16,80 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{SSi}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 408,20, нађено 408.63.

Синтеза једињења R5. Раствору **R4** (6,02 g, 14,76 mmol) у EtOH (50 mL) додат је $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3,64 g, 2,96 mmol), а затим и H_2O_2 (30 wt % у води, 16,8 mL, 158,4 mmol) у малим порцијама. Реакциона смеша мешана је током 16 h на собној температури, а затим су додати вода (200 mL) и CH_2Cl_2 (200 mL). Водени слој одвојен је и екстрахован помоћу CH_2Cl_2 (3 x 120 mL), Органски слојеви су испрани раствором соли (200 mL), спојени и осушени преко Na_2SO_4 . Након филтрирања, растварач је упарен у вакууму, а остатак је подвргнут флеш хроматографији на силика гелу ($\text{Et}_2\text{O}:\text{EtOAc} = 2:1$ v/v као елуент) да би се добио **R5** у облику безбојног уља (4,88 g, 75%).



5-((5-((*tert*-бутилдиметилсиллил)окси)-5-метоксипентил)сулфонил)-1-фенил-1H-тетразол (**R5**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,38 – 8,19 (m, 12H), 7,48 – 7,37 (m, 11H), 7,14 (s, 6H), 5,08 (s, 6H), 3,54 – 3,50 (m, 9H), 3,40 – 3,26 (m, 18H), 2,57 – 2,43 (m, 36H), 1,98 – 1,94 (m, 8H), 1,68 (d, $J = 49,0$ Hz, 11H), 1,62 – 1,56 (m, 2H), 1,56 – 1,22 (m, 13H), 1,13 – 0,99 (m, 54H), 0,27 – 0,13 (m, 36H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 159,95 (s), 134,73 (s), 129,78 – 129,46 (m), 125,12 – 124,73 (m), 100,70 (s), 55,30 (s), 49,88 (s), 40,17 – 39,96 (m), 33,89 (s), 25,76 – 25,55 (m), 23,24 (d, $J = 2,4$ Hz), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ 5,10 (s), -30,50 (s), -81,50 (s), -148,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 147,15 – 146,63 (m), 23,00 (s), 16,80 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{SSi}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 440,19, нађено 440,19.

Синтеза једињења R6. Реагенс **R6** је припремљен према поступку описаном на другом месту као безбојно уље (5,42 g, 68%).

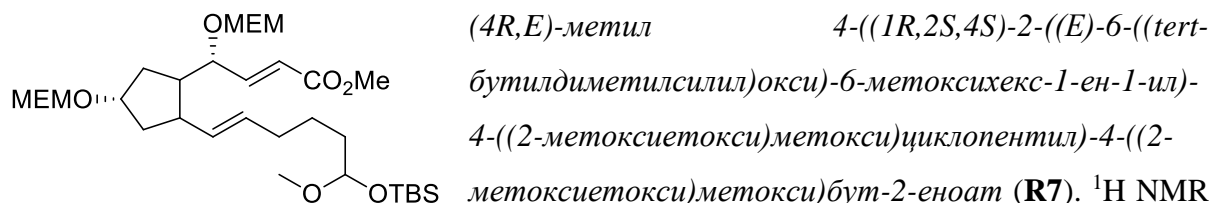


(*R,E*)-метил5-((1*R*,2*R*,4*R*)-2-формил-4-((2-метоксиетокси)метокси)циклопентил)-5-((2-метоксиетокси)метокси)пент-3-еноат (**R6**). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,72 (s, 2H), 6,03 (s, 2H), 5,56 (s, 2H), 4,37 – 4,23 (m, 8H), 3,89 – 3,55 (m, 9H), 3,55 (s, 2H), 3,73 – 3,39 (m, 18H), 3,39 – 3,23 (m, 14H), 3,01 – 2,82 (m, 4H), 2,57 – 2,43 (m, 12H), 2,14 (s, 2H), 2,08 – 1,84 (m, 6H), 1,70 (s, 2H), 1,46 (s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) 205,39 (s), 173,10 (s), 134,50 (s), 131,67 (s), 94,14 (s), 93,28 (s), 80,61 (s), 78,25 (s), 73,77 – 73,55 (m), 67,93 – 67,53 (m),

Докторска дисертација Незрине Куртановић

57,91 – 57,70 (m), 52,86 (s), 51,82 (s), 43,69 (s), 40,17 – 39,96 (m), 37,56 (s), 36,28 (s), 34,95 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 363,00 (s), 142,70 (s), 38,65 – 38,09 (m), 18,36 – 17,60 (m), 13,00 (s), -23,44 – -24,21 (m). MS m/z израчунато за $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_9$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 418,22, нађено 418,48.

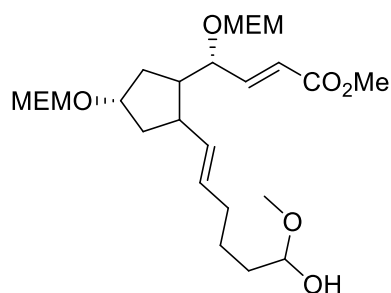
Синтеза једињења R7. У охлађен (-78°C) раствор **R5** (3,7 g, 8,4 mmol) у сувом 1,2-диметоксиетану (5,2 mL, свеже осушеном преко натријума), раствор KHMDS (0,5 M у толуену, 15,6 mL, 7,8 mmol) додаван је кап по кап. После 30 минута, додаван је раствор свеже припремљеног алдехида **R6** (2,52 g, 6,24 mmol) у сувом 1,2-диметоксиетану (31,2 mL), такође кап по кап, током периода од 10 минута. После 2 сата на -78°C, раствор је остављен да се загреје до собне температуре и мешан је још 18 сати. Затим су додати вода (100 mL) и раствор соли (100 mL), па је смеша екстрахована етил ацетатом (3 x 120 mL). Комбиновани органски слојеви осушени су преко Na_2SO_4 , филтрирани и растварач је упарен у вакууму. Остатак је подвргнут флеш хроматографији на силика гелу ($\text{Et}_2\text{O}:\text{EtOAc} = 3:1$ v/v као елуент) да би се добио **R7** (3,9 g, 75%) у облику безбојног уља,



^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) 6,82 (s, 2H), 6,22 (s, 2H), 5,46 (t, $J = 9,2$ Hz, 6H), 5,24 (s, 2H), 4,82 (s, 2H), 4,37 – 4,23 (m, 4H), 3,91 – 3,80 (m, 6H), 3,79 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 3,79 – 3,56 (m, 9H), 3,55 – 3,36 (m, 9H), 3,47 – 3,36 (m, 3H), 3,35 (dd, $J = 36,9, 3,3, 1,6$ Hz, 23H), 2,57 – 2,43 (m, 12H), 2,02 (s, 1H), 1,84 (t, $J = 27,8$ Hz, 7H), 1,77 (s, 2H), 1,77 (s, 2H), 1,62 (dd, $J = 17,6, 6,3$ Hz, 8H), 1,38 (dd, $J = 26,5, 4,8$ Hz, 8H), 1,12 – 0,98 (m, 18H), 0,24 – 0,10 (m, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 167,40 (s), 146,54 (s), 132,97 (s), 130,82 (s), 127,49 (s), 100,70 (s), 94,14 (s), 93,28 (s), 80,42 (s), 78,94 (s), 73,77 – 73,55 (m), 67,93 – 67,53 (m), 57,91 – 57,70 (m), 55,30 (s), 51,97 (s), 49,03 (s), 44,98 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,54 (s), 37,46 (s), 32,63 (s), 32,41 (s), 25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 335,30 (s), 130,70 (s), 38,65 – 38,09 (m), 23,00 (s), 18,36 – 17,60 (m), 16,80 (s), 13,00 (s), -23,44 – -24,21 (m). MS m/z израчунато за $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{O}_{10}\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 618,38, нађено 618,87.

Експериментални део

Синтеза једињења R8. У раствор **R7** (3,22 g, 5,2 mmol) у THF-у (90 mL) на собној температури додата је 1N HCl (15 mL, 15 mmol) и смеша је мешана 2 сата пре него што је пажљиво обрађена чврстим NaHCO₃. Додата је вода (200 mL) и смеша је екстрахована помоћу CH₂Cl₂ (3 x 120 mL). Органски слојеви осушени су преко Na₂SO₄, филтрирани и концентровани у вакууму. Сирови производ пречишћен је флеш хроматографијом на силицијум диоксиду (Et₂O:EtOAc = 3:1 v/v као елуент) да би се добио **R8** (2,34 g, 89%) у облику безбојног уља.



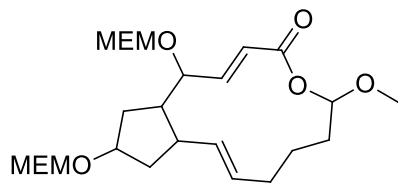
(4*R*,*E*)-метил 4-((1*R*,2*S*,4*S*)-2-((*E*)-6-хидрокси-6-метоксихекс-1-ен-1-ил)-4-((2-метоксиетокси)метокси)циклопентил)-4-((2-метоксиетокси)метокси)бут-2-еноат (**R8**). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,82 (s, 16H), 6,08 (s, 16H), 5,46 (t, *J* = 3,9 Hz, 48H), 5,30 (s, 15H), 5,24 (s, 17H), 4,37 – 4,22

(m, 46H), 3,89 – 3,67 (m, 64H), 3,63 – 3,26 (m, 283H), 3,26 – 3,20 (m, 4H), 2,57 – 2,43 (m, 93H), 2,07 – 1,83 (m, 76H), 1,77 (s, 13H), 1,74 – 1,48 (m, 50H), 1,49 – 1,18 (m, 50H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167,40 (s), 146,54 (s), 132,97 (s), 130,82 (s), 127,49 (s), 94,14 (s), 93,28 (s), 80,42 (s), 78,94 (s), 73,77 – 73,55 (m), 67,93 – 67,53 (m), 57,91 – 57,70 (m), 53,07 (s), 51,97 (s), 49,03 (s), 44,98 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,54 (s), 37,46 (s), 34,25 (s), 32,41 (s), 22,77 (s). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 335,30 (s), 130,70 (s), 44,50 (s), 38,65 – 38,09 (m), 23,00 (s), 18,36 – 17,60 (m), 13,00 (s), -23,44 – -24,21 (m). MS *m/z* израчунато за C₂₅H₄₄O₁₀: [M + H]⁺; 504,29, нађено 504,61.

Синтеза једињења BFA-D1. Мешаном раствору **R8** (2 g, 3,96 mmol) у THF/H₂O (1,3:1, 90 mL) додат је 1N LiOH (9 mL, 9,2 mmol) и смеша је мешана на собној температури током 2 сата. Након тога, раствор је третиран киселом јоноизмењивачком смолом Amberlite® IR-120 све док смеша није достигла pH 7. Након филтрирања кроз слој Celite®, растварач је уклоњен у вакууму, остатак је растворен у EtOAc и филтриран да би се добило безбојно уље. Затим је NEt₃ (1020 μL, 7,2 mmol) додат у раствор сировог производа у сувом THF-у (40 mL), праћен додатком 2,4,6-трихлорбензоил хлорида (1060 μL, 6,72 mmol). Смеша је мешана током 1,5 сата на собној температури пре разблаживања у сувом толуену (600 mL) и пребачена у капима преко шприца (20 mL/h) у рефлуктујући раствор DMAP (1,22 g, 10 mmol) у сувом толуену (24 mL). Смеша је затим рефлугована током 5 сати, охлађена до собне температуре и третирана помоћу Et₂O (420 mL) и воде (210 mL). Водени слој је одвојен

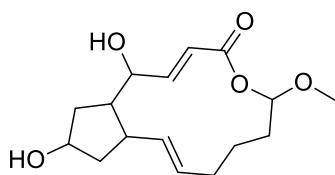
Докторска дисертација Незрине Куртановић

и екстрахован помоћу Et₂O (2 x 100 mL). Органски слојеви испрани су zasiћеним раствором NaHCO₃ (160 mL) и раствором соли (160 mL). Комбиновани органски слојеви осушени су преко Na₂SO₄, филтрирани и концентровани у вакууму. Сирови производ пречишћен је флеш хроматографијом на силика гелу (Et₂O:EtOAc = 3:1 v/v као елуент) да би се добио **BFA-D1** (1,68 g, 90%) у облику безбојног уља.



((2E,10E,11aS,14aR)-6-метокси-1,13-bis((2-метоксиетокси)метокси)-6,7,8,9,12,13,14,14a-октахидро-1H-циклопенто[f][1]оксациклотридецин-4(11aH)он (**BFA-D1**). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,07 (s, 4H), 6,37 (s, 40H), 6,04 (s, 42H), 5,46 (t, *J* = 7,5 Hz, 122H), 5,14 (s, 41H), 4,37 – 4,23 (m, 80H), 3,78 (s, 46H), 3,68 – 3,56 (m, 162H), 3,56 – 3,39 (m, 168H), 3,39 – 3,28 (m, 356H), 3,28 – 3,22 (m, 46H), 2,57 – 2,43 (m, 239H), 2,23 – 2,03 (m, 118H), 2,00 (s, 51H), 1,97 – 1,77 (m, 128H), 1,78 – 1,41 (m, 201H), 1,45 (s, 7H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164,94 (s), 147,26 (s), 133,17 (s), 130,82 (s), 127,66 (s), 101,68 (s), 94,14 (s), 93,28 (s), 79,82 (d, *J* = 10,3 Hz), 73,77 – 73,55 (m), 67,93 – 67,53 (m), 57,91 – 57,70 (m), 55,30 (s), 51,19 (s), 48,01 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,81 (s), 36,73 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 22,92 (s). ¹⁷O NMR (68 M Hz, DMSO-*d*₆) δ 332,00 (s), 38,65 – 38,09 (m), 23,00 (s), 18,36 – 17,60 (m), 13,00 (s), -23,44 – -24,21 (m). MS *m/z* израчунато за C₂₄H₄₀O₉: [M + H]⁺; 472,27, нађено 472,27.

Синтеза једињења BFA-D2. У раствор **BFA-D1** (1600 mg, 3,38 mmol) у THF-у (120 mL) додат је сс. HBr (120 mL) и смеша је мешана током 1,5 сата на собној температури. Затим је опрезно додат чврсти NaHCO пре разређивања водом (300 mL). Смеша је екстрахована помоћу EtOAc (3 x 90 mL). Органски слојеви су спојени, осушени преко Na₂SO₄, филтрирани и концентровани у вакууму. Остатак је подвргнут флеш хроматографији на силика гелу (Et₂O:EtOAc = 1:1 v/v као елуент), што је праћено рекристализацијом из MeOH/H₂O да би се добио **BFA-D2** (800 mg, 80%) у форми безбојних игала.

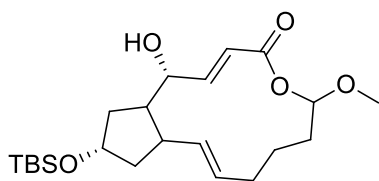


(2E,10E,11aS,14aR)-1,13-дихидрокси-6-метокси-6,7,8,9,12,13,14,14a-октахидро-1H-циклопенто[f][1]оксациклотридецино-4(11aH)-он (**BFA-D2**). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,07 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 6,04 (s, 1H), 5,46 (d, *J* = 17,9 Hz, 2H), 4,19 (s, 1H), 4,06 (d, *J* = 17,0 Hz, 2H), 3,61 (s,

Експериментални део

1H), 3,38 – 3,24 (m, 3H), 2,57 – 2,43 (m, 6H), 2,08 (d, $J = 12,8$ Hz, 2H), 1,97 (dd, $J = 25,3$, 12,0 Hz, 4H), 1,74 (d, $J = 14,1$ Hz, 2H), 1,59 – 1,48 (m, 3H), 1,46 (s, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 164,94 (s), 150,10 (s), 133,17 (s), 130,82 (s), 124,30 (s), 101,68 (s), 75,76 (s), 73,67 (s), 55,30 (s), 50,14 (s), 47,03 (s), 41,34 (s), 40,17 – 39,96 (m), 37,97 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 22,92 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 332,00 (s), 33,40 (s), 32,30 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 296,16, нађено 296,36.

Синтеза једињења BFA-D3. BFA-D2 (700 mg, 3,36 mmol) растворен је у дихлорметану (2,3 mL) на 0°C у балону са округлим дном, након чега је додат 2,6-лутидин (285 μL). Затим је укапавањем додат TBSOTf (0,825 mL, 3,3 mmol) и реакциона смеша је остављена да се загреје до собне температуре након чега је извршено мешање током 8 сати. Реакција је прекинута додавањем 5% раствора NaHCO_3 (10 mL). Након екстракције помоћу CH_2Cl_2 (3×45 mL) и сушења преко Na_2SO_4 , растварач је упарен на вакууму а сирови производ је пречишћен флеш хроматографијом на силика гелу (n -hexane:EtOAc = 8:2 v/v као елуент) да би се добио BFA-D3 који је изолован као густо бистро уље (356 mg, 25%).



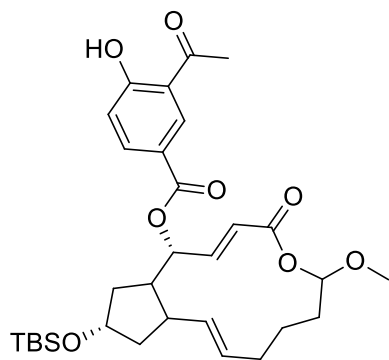
(1R,2E,10E,11aS,13S,14aR)-13-((tert-бутилдиметилсилил)окси)-1-хидрокси-6-метокси-14a-метил-6,7,8,9,12,13,14,14a-октахидро-1H циклопента[[f]][1]оксациклотридецин-4(11aH)-он (BFA-D3).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,07 (s, 2H), 6,37 (s, 2H), 6,04 (s, 2H), 5,47 (d, $J = 13,9$ Hz, 4H), 4,08 (s, 2H), 3,83 (s, 2H), 3,61 (s, 2H), 3,36 – 3,22 (m, 6H), 2,57 – 2,43 (m, 12H), 2,01 (d, $J = 4,8$ Hz, 4H), 2,04 – 1,94 (m, 6H), 2,16 – 1,69 (m, 18H), 2,04 – 1,71 (m, 14H), 2,07 – 1,69 (m, 15H), 1,71 – 1,36 (m, 7H), 1,10 – 0,96 (m, 18H), 0,23 – 0,09 (m, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 164,94 (s), 150,10 (s), 132,97 (s), 130,82 (s), 124,30 (s), 101,68 (s), 75,73 (s), 73,06 (s), 55,30 (s), 48,29 (s), 44,80 (s), 40,05 (t, $J = 3,2$ Hz), 37,10 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 332,00 (s), 32,30 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 424,26, нађено 424,65.

Синтеза једињења BFA-D4. У суспензији BFA-D3 (300 mg, 0,7 mmol) растворено је 30,00 mL анхидрованог дихлорметана под аргоном, па је полако додата 3-ацетил-4-хидроксибензоева киселина (4 еквивалента, 426 mg, 2,8 mmol) а затим и 1-етил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид хидрохлорид (EDC·HCl, 4 еквивалента,

Докторска дисертација Незрине Куртановић

537 mg, 2,8 mmol) односно 4-диметиламиопридин (DMAP, 1 еквивалент, 85,52 mg, 0,7 mmol). Смеша је одржавана на 40-50°C уз мешање током 24 сата. Напредовање реакције праћено је помоћу TLC на силика гелу. Реакција је прекинута водом (30 mL) и смеша је екстрахована помоћу дихлорметана (3 x 30 mL), затим осушена помоћу Na₂SO₄, да би растварач био уклоњен под сниженим притиском. Сирови производ пречишћен је хроматографијом на колони на силика гелу (*n*-hexane:EtOAc = 1:1 као елуент) да би се добио **BFA-D4** као бела чврста супстанца (368 mg, 95%).

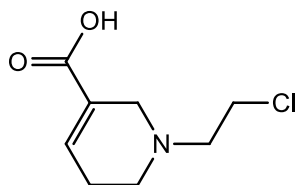


(1*R*,2*E*,10*E*,13*S*)-13-((*tert*-бутилдиметилсилил)окси)-6-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11*a*, 12,13,14,14*a*-декахидро-1*H*-циклопента[*ff*][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-хидроксибензоат (**BFA-D4**). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,62 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,07 (s, 1H), 7,00 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 6,04 (s, 1H), 5,48 (s, 1H), 5,19 (d, *J* = 39,5 Hz, 2H), 3,61 (s, 1H), 3,40 – 3,26 (m, 3H), 2,60 – 2,43 (m, 9H), 2,36 – 1,71 (m, 8H), 2,05 – 1,71 (m, 5H), 2,02 – 1,71 (m, 5H), 1,75 (s, 1H), 1,75 (s, 1H), 1,66 (d, *J* = 13,6 Hz, 2H), 1,52 (d, *J* = 49,0 Hz, 2H), 1,07 – 0,93 (m, 9H), -0,20 – -0,34 (m, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 202,48 (s), 166,92 (s), 165,45 (s), 164,94 (s), 143,04 (s), 136,88 (s), 132,97 (s), 131,08 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 122,75 (s), 119,54 (s), 116,90 (s), 101,68 (s), 79,05 (s), 73,06 (s), 55,30 (s), 46,98 (s), 44,98 (s), 40,05 (t, *J* = 3,2 Hz), 37,43 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 85,80 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS *m/z* израчунато за C₃₁H₄₄O₈Si: [M + H]⁺ *m/z*: 572,28, нађено 572,76.

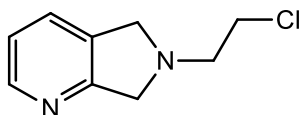
Синтеза једињења **Pro-R3**, **Pro-R6**, **Pro-R7**, **Pro-R8**, **Pro-R9** и **Pro-R12**. Док су про-реагенси **Pro-R1**, **Pro-R2**, **Pro-R4**, **Pro-R5**, **Pro-R10** и **Pro-R11** били комерцијално доступни, про-реагенсе **Pro-R3**, **Pro-R6**, **Pro-R7**, **Pro-R8**, **Pro-R9** и **Pro-R12** било је потребно синтетисати. У том смислу, одређена количина 2-хлороетан-1-ола (50 mg, 625 μmol) растворена је у 45 mL апсолутног ацетона. Затим су додати калијум карбонат (25,4 mg, 2 mmol), калијум јодид (103,8 mg, 625 μmol) и било 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (79,41 mg, 625 μmol), 6, 7-дихидро-5*H*-пироло [3,4-*b*] пиридин (75,05 mg, 625 μmol), 1,2-дихидроизохинолин (81,98 mg, 625 μmol), декахидро-1,8-нафтиридин (87,58 mg, 625 μmol), 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (88,15 mg, 625 μmol) или 3-

Експериментални део

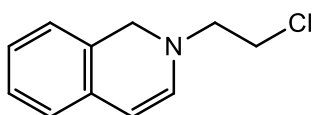
хидроксипиперидин-2-он (71,95 mg, 625 μmol). Смеша је рефлукована током 72 сата. Након хлађења, производ (било **Pro-R3**, **Pro-R6**, **Pro-R7**, **Pro-R8**, **Pro-R9** или **Pro-R12**, 112,25 mg, 95%, 104,67 mg, 92 %, 109,80 mg, 91 %, 120,00 mg, 95 %, 119,28 mg, 94 %, или 105,13 mg, 95%, респективно) кристализован је као бела чврста супстанца из добијеног раствора.



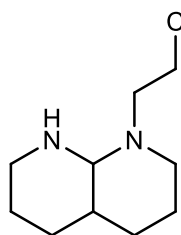
1-(2-хлороетил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (Pro-R3). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13,18 (s, 1H), 7,31 (s, 1H), 4,19 (s, 1H), 3,78 – 3,61 (m, 2H), 3,29 (s, 1H), 2,85 (s, 1H), 2,75 (s, 1H), 2,63 (s, 1H), 2,54 – 2,41 (m, 7H), 2,34 – 2,14 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166,47 (s), 142,15 (s), 126,73 (s), 56,04 (s), 53,79 (s), 48,52 (s), 40,27 (s), 40,08 – 39,96 (m), 26,10 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 337,20 (s), 253,90 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{ClNO}_2$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 189,06, нађено 182,64.



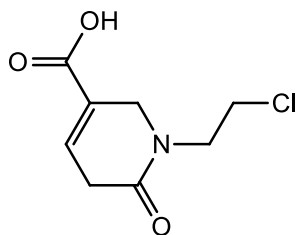
*6-(2-хлороетил)-6,7-дихидро-5H-пироло[3,4-*b*]пиридин (Pro-R6)*. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8,30 (s, 5H), 7,76 (s, 5H), 7,28 (s, 4H), 4,17 (d, $J = 1,2$ Hz, 10H), 3,71 – 3,67 (m, 8H), 3,58 (s, 5H), 3,26 (s, 5H), 2,89 (s, 4H), 2,61 (s, 4H), 2,57 – 2,43 (m, 30H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 162,61 (s), 146,33 (s), 130,94 (s), 126,54 (s), 121,84 (s), 63,36 (s), 61,31 (s), 55,47 (s), 40,27 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -47,00 (s), -315,50 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClN}_2$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 182,06, нађено 182,65.



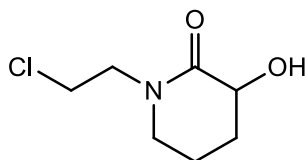
2-(2-хлороетил)-1,2-дихидроизохинолин (Pro-R7). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7,41 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H), 7,33 (d, $J = 66,8$ Hz, 8H), 7,12 (d, $J = 4,5$ Hz, 10H), 7,07 (s, 5H), 5,33 (s, 5H), 4,44 (d, $J = 11,7$ Hz, 10H), 3,70 – 3,66 (m, 8H), 3,57 (s, 6H), 2,79 (s, 4H), 2,57 – 2,43 (m, 30H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 140,38 (s), 133,01 (s), 132,42 (s), 128,16 (s), 127,21 (s), 126,58 (s), 125,59 (s), 102,97 (s), 52,74 (s), 51,86 (s), 41,07 (s), 40,17 – 39,96 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -287,10 (s), -287,10 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClN}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 193,07, нађено 193,67.



1-(2-хлороетил)декахидро-1,8-нафтиридин (Pro-R8). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 3,75 – 3,47 (m, 23H), 2,88 (dd, $J = 38,7, 38,0$ Hz, 30H), 2,74 (d, $J = 26,5$ Hz, 17H), 2,57 – 2,43 (m, 45H), 2,27 (s, 8H), 1,86 – 1,25 (m, 57H), 1,26 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H), 1,22 (d, $J = 21,0$ Hz, 16H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 65,38 (s), 54,16 (s), 50,35 (s), 43,97 (s), 41,01 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,16 (s), 27,90 (d, $J = 0,5$ Hz), 24,53 (s), 23,23 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -326,40 (s), -334,90 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{ClN}_2$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 202,12, нађено 202,72.



1-(2-хлороетил)-6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (Pro-R9). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 15,83 (s, 2H), 7,44 (s, 2H), 4,50 (s, 2H), 4,04 (s, 2H), 3,75 (s, 2H), 3,64 – 3,60 (m, 3H), 3,37 (s, 2H), 2,94 – 2,76 (m, 4H), 2,57 – 2,43 (m, 12H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 167,89 (s), 166,47 (s), 130,74 (s), 124,96 (s), 49,61 (s), 42,77 (s), 41,63 (s), 40,17 – 39,96 (m), 33,68 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 346,00 (s), 337,20 (s), 253,90 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 203,03, нађено 202,62.

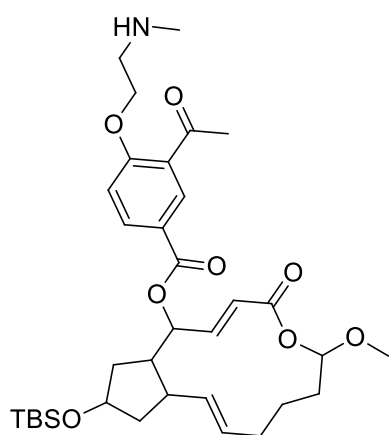


1-(2-хлороетил)-3-хидроксипиперидин-2-он (Pro-R12). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 5,44 (s, 35H), 4,44 (s, 36H), 3,56 (dd, $J = 47,9, 36,1$ Hz, 145H), 3,42 – 3,41 (m, 3H), 3,29 (d, $J = 50,4$ Hz, 72H), 3,22 – 3,11 (m, 6H), 2,57 – 2,43 (m, 212H), 2,16 (s, 38H), 1,74 (s, 51H), 1,67 (d, $J = 1,6$ Hz, 59H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 175,82 (s), 67,27 (s), 48,88 (s), 45,56 (s), 41,63 (s), 40,17 – 39,96 (m), 26,52 (s), 22,42 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -257,80 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 346,00 (s), 32,30 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{ClNO}_2$: $[\text{M} + \text{H}]^+$; 177,06, нађено 177,63.

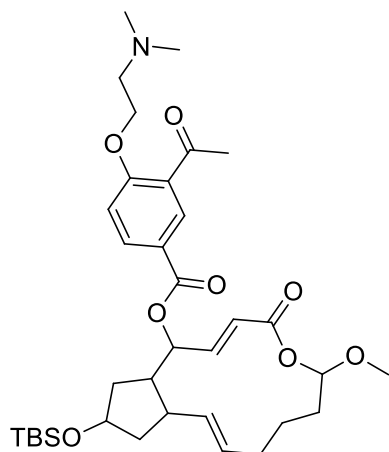
Синтеза једињења Pro-3DPQ-1 до Pro-3DPQ-12. Одређена количина **BFA-D4** (25 mg, 45 μmol) растворена је у 10 mL врућег етанола. Затим су додати калијум карбонат (6,20 mg, 45 μmol) и еквимоларна концентрација било **Pro-R1** (2-хлоро-*N*-метилетанамина, 4,18 mg, 45 μmol), **Pro-R2** (2-хлоро-*N,N*-диметилетанамина, 4,82 mg, 45 μmol), **Pro-R3** (1-(2-хлороетил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина, 8,51 mg, 45 μmol), **Pro-R4** (2-хлороетансулфонска киселина, 6,48 mg, 45 μmol), **Pro-R5** (1-(2-хлороетил)пиролидин-2,5-дион, 7,25 mg, 45 μmol), **Pro-R6** (6-(2-хлороетил)-6,7-дихидро-5*H*-пироло[3,4-*b*]пиридин, 8,19 mg, 45 μmol), **Pro-R7** (2-(2-хлороетил)-1,2-

Експериментални део

дихидроизокинолин, 8,69 mg, 45 μmol), **Pro-R8** (1-(2-хлороетил)декахидро-1,8-нафтиридин, 9,10 mg, 45 μmol), **Pro-R9** (1-(2-хлороетил)-6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина, 9,13 mg, 45 μmol), **Pro-R10** (1-(2-хлороетил)пиперидин, 6,62 mg, 45 μmol), **Pro-R11** (1-(2-хлороетил)пиролидин, 5,99 mg, 45 μmol) или **Pro-R12** (1-(2-хлороетил)-3-хидроксипиперидин-2-он, 6,62 mg, 45 μmol). Смеша је рефлугована током 2 сата. Након хлађења, неоргански остатак је одфилтриран и производ (било **Pro-3DPQ-1**, **Pro-3DPQ-2**, **Pro-3DPQ-3**, **Pro-3DPQ-4**, **Pro-3DPQ-5**, **Pro-3DPQ-6**, **Pro-3DPQ-7**, **Pro-3DPQ-8**, **Pro-3DPQ-9**, **Pro-3DPQ-10**, **Pro-3DPQ-11** или **Pro-3DPQ-12**) је кристалисао из добијеног раствора.



(2*E*,10*E*)-13-((*tert*-бутилдиметилсиллил)окси)-6-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11*a*,12,13,14,14*a*-декахидро-1*H*-циклопента[[*f*][1]окса]циклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(метиламино етокси)бензоат (**Pro-3DPQ-1**). Жута чврста супстанца (25,70 mg, 95%). ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 8,32 (s, 9H), 8,09 (s, 9H), 7,22 (s, 8H), 7,07 (s, 10H), 6,37 (s, 9H), 6,04 (s, 9H), 5,47 (d, $J = 8,7$ Hz, 18H), 5,15 (s, 9H), 4,09 – 4,05 (m, 14H), 3,61 (s, 8H), 3,35 – 3,21 (m, 26H), 3,05 (s, 8H), 3,01 (s, 8H), 2,62 – 2,46 (m, 81H), 2,52 – 2,46 (m, 52H), 2,52 – 2,37 (m, 78H), 2,18 (d, $J = 18,4$ Hz, 15H), 2,09 (s, 6H), 2,02 (d, $J = 14,7$ Hz, 20H), 1,97 – 1,77 (m, 28H), 1,65 (dd, $J = 66,3, 24,0$ Hz, 35H), 1,58 (d, $J = 4,8$ Hz, 19H), 1,60 – 1,42 (m, 25H), 1,25 (s, 1H), 1,13 – 0,99 (m, 78H), 0,29 – 0,15 (m, 52H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 164,94 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 67,28 (s), 55,30 (s), 50,93 (s), 49,13 (s), 48,01 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,29 (s), 36,61 (d, $J = 22,7$ Hz), 36,51 – 36,31 (m), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -352,00 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{NO}_8\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 629,34, нађено 629,86.



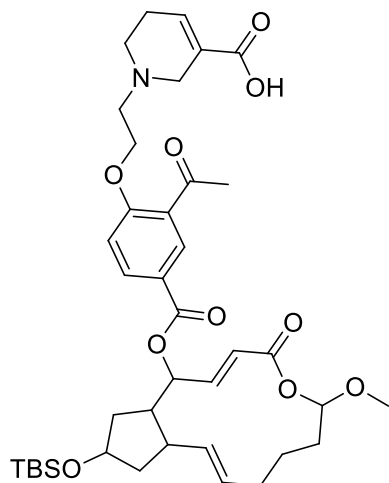
(2E,10E)-13-((*tert*-бутилдиметилсиллил)окси)-6-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,

12,13,14,14a-декахидро-1H-

циклопента[[f]][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(диметиламино)етокси)бензоат (**Pro-3DPQ-2**).

Жута чврста супстанца (26,30 mg, 95%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,57 (s, 6H), 8,16 (s, 6H), 7,21 (s, 6H), 7,07 (s, 6H), 6,37 (s, 6H), 6,04 (s, 6H), 5,48 (s, 6H), 5,31 (s, 6H), 5,15 (s, 6H), 4,21 – 4,05 (m, 12H), 3,61 (s, 6H), 3,36 – 3,22 (m, 18H), 2,87 – 2,71 (m, 12H), 2,64 – 2,50 (m, 38H), 2,50 –

2,43 (m, 16H), 2,41 – 2,27 (m, 36H), 2,18 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H), 2,16 (s, 7H), 2,20 – 1,77 (m, 45H), 1,77 – 1,61 (m, 13H), 1,61 – 1,60 (m, 3H), 1,53 (d, $J = 49,0$ Hz, 13H), 1,11 – 0,97 (m, 53H), 0,15 – 0,01 (m, 35H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 164,94 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 68,31 (s), 58,44 (s), 55,30 (s), 49,13 (s), 48,01 (s), 45,66 – 45,35 (m), 40,17 – 39,96 (m), 39,29 (s), 36,70 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -355,20 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{NO}_8\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 643,35, нађено 643,88.



1-(2-(2-ацетил-4-(((2E,10E)-13-((*tert*-бутилдиметилсиллил)окси)))

11a,

12,13,14,14a-декахидро-1H-

циклопента[[f]][1]оксациклотридецин-1-ил

окси)карбонил)фенокси)етил)-1,2,5,6-

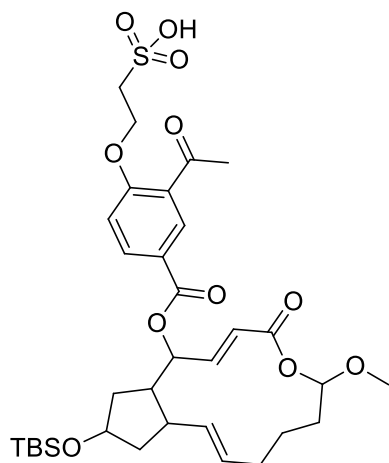
тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (**Pro-3DPQ-3**).

Жута чврста супстанца (29,70 mg, 91%), ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 16,81 (s, 23H), 8,50 (s, 23H), 7,89 (s, 23H), 7,31 (s, 24H), 7,18 (s, 21H), 7,07 (s, 25H),

6,37 (s, 23H), 6,04 (s, 24H), 5,48 (s, 19H), 5,44 (s, 18H), 5,15 (s, 23H), 4,25 (s, 23H), 4,12 – 3,96 (m, 46H), 3,61 (s, 25H), 3,44 (s, 23H), 3,41 – 3,27 (m, 69H), 2,89 – 2,68 (m, 71H), 2,65 – 2,54 (m, 73H), 2,54 – 2,43 (m, 158H), 2,36 – 2,20 (m, 50H), 2,16 (d, $J = 1,4$ Hz, 49H), 2,20 – 1,93 (m, 151H), 1,72 (dd, $J = 59,9, 55,2$ Hz, 108H), 1,59 (d, $J = 1,8$ Hz, 5H), 1,57 (s, 20H), 1,52 (d, $J = 49,0$ Hz, 49H), 1,10 – 0,96 (m, 204H), 0,25 – 0,11 (m, 136H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 166,47 (s), 164,94 (s), 161,47 (s), 143,04 (s),

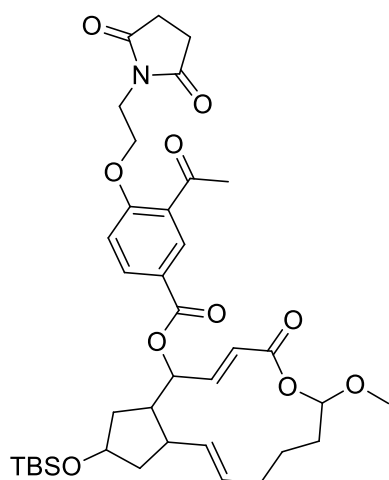
Експериментални део

142,15 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,73 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 67,45 (s), 55,30 (s), 54,64 (s), 53,79 (s), 49,13 (s), 48,52 (s), 48,01 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,29 (s), 36,70 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 26,10 (s), 25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 337,20 (s), 332,00 (s), 253,90 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{O}_{10}\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 644,30, нађено 644,82.

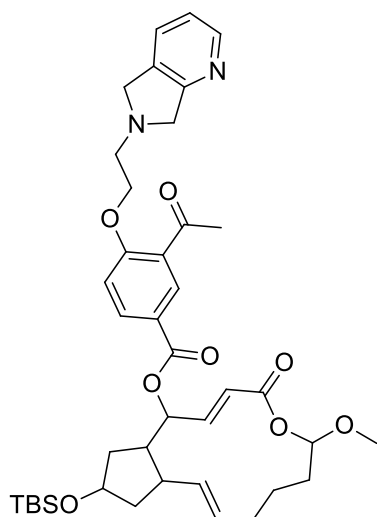


2-(2-ацетил-4-((((2E,10E)-13-((tert-бутилдиметилсилил)окси)-6-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[[f][1]оксациклотридецин-1-ил)окси)карбонил)фенокси)етансулфонска киселина (**Pro-3DPQ-4**). Светложута чврста супстанца (26,38 mg, 93%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 15,39 (s, 65H), 8,55 (s, 65H), 8,11 (s, 66H), 7,19 (s, 96H), 7,07 (s, 38H), 6,37 (s, 66H), 6,04 (s, 68H), 5,48 (s, 69H), 5,28 (s, 71H), 5,15 (s, 63H),

4,58 – 4,41 (m, 132H), 3,61 (s, 60H), 3,46 – 3,33 (m, 133H), 3,33 – 3,20 (m, 199H), 2,59 – 2,45 (m, 197H), 2,22 (s, 8H), 2,22 – 2,03 (m, 608H), 2,03 – 1,70 (m, 338H), 1,75 (s, 68H), 1,79 – 1,60 (m, 195H), 1,64 (s, 25H), 1,61 (s, 81H), 1,61 (s, 87H), 1,65 – 1,26 (m, 228H), 1,08 – 0,94 (m, 587H), -0,09 – -0,23 (m, 391H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) 204,31 (s), 200,54 (s), 166,89 (s), 164,94 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 61,70 (s), 55,30 (s), 49,87 (s), 49,13 (s), 48,01 (s), 39,29 (s), 36,70 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 31,16 – 30,76 (m), 28,28 (s), 25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 164,65 – 164,13 (m), 150,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 31,40 (s), 23,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_{11}\text{SSi}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 680,27, нађено 680,88.



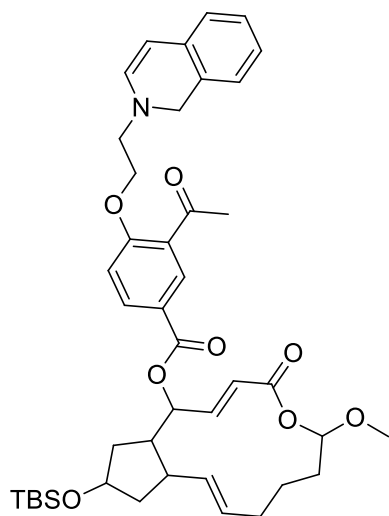
(2*E*,10*E*)-13-((*tert*-бутилдиметилсилил)окси)-6-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11*a*, 12,13,14,14*a*-декахидро-1*H*-циклопента[*ff*][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(2,5-диоксопиролдин-1-ил)етокси)бензоат (**Pro-3DPQ-5**). Жута чврста супстанца (26,38 mg, 93%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,41 (s, 3H), 8,15 (s, 3H), 7,11 (d, *J* = 44,7 Hz, 5H), 7,05 (s, 1H), 6,37 (s, 3H), 6,04 (s, 3H), 5,48 (s, 3H), 5,17 (d, *J* = 22,6 Hz, 6H), 4,26 – 4,11 (m, 6H), 3,72 – 3,50 (m, 9H), 3,32 – 3,18 (m, 9H), 2,85 – 2,71 (m, 12H), 2,57 – 2,39 (m, 27H), 2,00 (s, 3H), 2,39 – 1,70 (m, 29H), 2,01 – 1,70 (m, 15H), 2,01 – 1,56 (m, 20H), 1,67 (s, 3H), 1,65 – 1,59 (m, 1H), 1,62 (d, *J* = 49,2 Hz, 6H), 1,52 (d, *J* = 49,0 Hz, 7H), 1,11 – 0,97 (m, 27H), 0,21 – 0,07 (m, 18H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 200,54 (s), 178,36 – 178,14 (m), 166,89 (s), 164,94 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 67,06 (s), 55,30 (s), 49,13 (s), 48,01 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,29 (s), 36,70 (s), 36,01 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,61 – 28,07 (m), 25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ¹⁵N NMR (51 MHz, DMSO-*d*₆) δ -231,40 (s), ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 488,00 (s), 371,37 – 370,60 (m), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS *m/z* израчунато за C₃₇H₅₁NO₁₀Si: [M + H]⁺ *m/z*: 697,33, нађено 697,89.



(2*E*,10*E*)-13-((*tert*-бутилдиметилсилил)окси)-6-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11*a*,12,13,14,14*a*-декахидро-1*H*-циклопента[*ff*][1]оксациклотридецин-1-ил 4-(2-(5*H*-пироло[3,4-*b*]пиридин-6(7*H*)-ил)етокси)-3-ацетилбензоата (**Pro-3DPQ-6**). Браон чврста супстанца (29,51 mg, 95%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,55 (s, 2H), 8,33 (s, 2H), 8,17 (s, 2H), 7,60 (s, 2H), 7,26 (d, *J* = 2,3 Hz, 4H), 7,07 (s, 2H), 6,37 (s, 2H), 6,04 (s, 2H), 5,49 (d, *J* = 7,3 Hz, 4H), 5,15 (s, 2H), 4,35 (s, 2H), 4,14 – 3,97 (m, 4H), 3,90 (s, 2H), 3,66 (d, *J* = 53,4 Hz, 4H), 3,39 – 3,22 (m, 8H), 2,93 (s, 2H), 2,78 – 2,60 (m, 7H), 2,53 (s, 2H), 2,53 – 2,43 (m, 11H), 2,40 – 1,97 (m, 10H), 2,40 – 1,73 (m, 19H), 2,40 – 1,73 (m, 19H), 1,97 – 1,75 (m, 8H), 1,82 – 1,77 (m, 1H), 1,75 (d, *J* = 1,1 Hz, 3H), 1,75 (d, *J* = 1,1 Hz, 5H), 1,52 (d, *J* = 49,0 Hz, 4H), 1,10 – 0,96 (m, 17H), 0,20 – 0,06 (m, 11H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 164,94 (s),

Експериментални део

162,61 (s), 161,47 (s), 146,33 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,88 (d, $J = 14,6$ Hz), 127,47 (s), 126,54 (s), 126,30 (s), 121,84 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 67,45 (s), 63,36 (s), 61,31 (s), 55,39 (d, $J = 23,2$ Hz), 55,30 – 55,19 (m), 49,13 (s), 48,01 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,29 (s), 36,70 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -47,00 (s), -315,50 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_8\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 718,36, нађено 718,95.



(2*E*,10*E*,11*a*,14*a*)-13-((*tert*-бутилдиметилсилил)окси)-6-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11*a*,12,13,14,14*a*-декахидро-1*H*-циклопента[*f*][1]оксациклотридецин-1-ил 4-(2-

(изохинолин-2(1*H*)-ил)етокси)-3-метилбензоата (**Pro-**

3DPQ-7). Браон чврста супстанца (29,99 mg, 95%). ^1H

NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,54 (s, 6H), 8,13 (s, 6H),

7,25 – 7,03 (m, 34H), 7,25 – 6,90 (m, 41H), 7,28 – 6,90 (m,

41H), 7,01 (s, 7H), 6,37 (s, 6H), 6,04 (s, 6H), 5,48 (s, 6H),

5,32 (d, $J = 10,1$ Hz, 12H), 5,15 (s, 6H), 4,44 (d, $J = 27,8$ Hz,

11H), 4,25 – 4,08 (m, 12H), 3,61 (s, 5H), 3,38 (s, 6H), 3,36 –

3,27 (m, 17H), 2,72 (s, 6H), 2,68 – 2,44 (m, 52H), 2,68 – 2,23 (m, 54H), 2,68 – 2,11 (m,

66H), 2,68 – 2,02 (m, 72H), 2,68 – 1,95 (m, 84H), 1,78 (dd, $J = 61,9, 51,5$ Hz, 27H), 1,59 (d,

$J = 1,6$ Hz, 2H), 1,52 (d, $J = 49,0$ Hz, 13H), 1,08 – 0,94 (m, 51H), -0,06 – -0,20 (m, 34H).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 164,94 (s), 161,47 (s), 143,04 (s),

140,38 (s), 134,56 (s), 133,09 (d, $J = 20,1$ Hz), 132,97 – 132,81 (m), 132,42 (s), 131,22 (s),

130,82 (s), 128,16 (s), 127,47 (s), 127,21 (s), 126,58 (s), 126,30 (s), 125,59 (s), 121,22 (s),

115,21 (s), 102,97 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 67,17 (s), 55,30 (s), 51,86 (s), 50,60

(s), 49,13 (s), 48,01 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,29 (s), 36,70 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,28 (s),

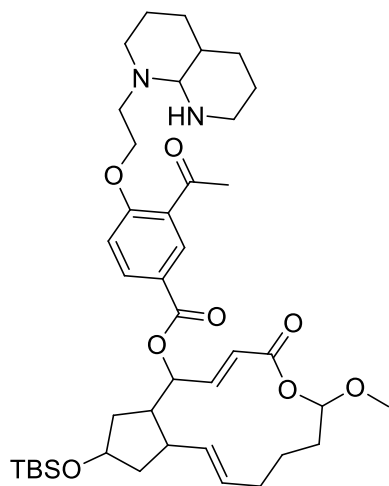
25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -

287,10 (s), ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s),

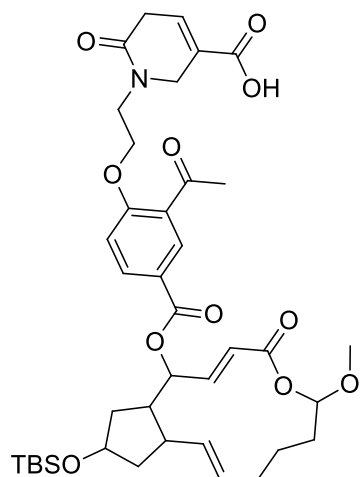
78,00 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{41}\text{H}_{55}\text{NO}_7\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z :

701,37, нађено 701,37.

Докторска дисертација Незрине Куртановић



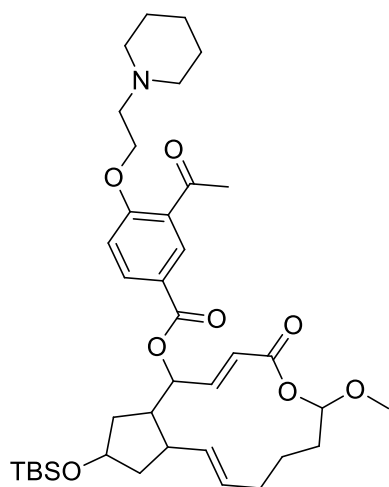
(2*E*,10*E*)-13-((*tert*-бутилдиметилсилил)окси)-6-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11*a*, 12,13,14,14*a*-декахидро-1*H*-циклопента[*f*][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(октахидро-1,8-нафтиридин-1(2*H*)-ил)етокси)бензоата (**Pro-3DPQ-8**). Светложута чврста супстанца (30,05 mg, 94%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,53 (s, 8H), 8,10 (s, 8H), 7,23 (s, 8H), 7,07 (s, 8H), 6,37 (s, 8H), 6,04 (s, 8H), 5,60 (s, 12H), 5,48 (s, 5H), 5,15 (s, 8H), 4,06 – 4,02 (m, 13H), 3,61 (s, 8H), 3,39 (s, 7H), 3,37 – 3,27 (m, 24H), 3,10 (s, 9H), 2,90 (s, 9H), 2,79 (s, 1H), 2,72 (d, *J* = 51,7 Hz, 16H), 2,60 (s, 6H), 2,58 – 2,39 (m, 81H), 2,13 (dd, *J* = 23,4, 11,6 Hz, 32H), 2,01 (d, *J* = 6,2 Hz, 13H), 1,95 (s, 10H), 1,93 (s, 1H), 1,93 – 1,31 (m, 105H), 1,51 – 1,28 (m, 23H), 1,53 – 1,31 (m, 28H), 1,28 – 0,97 (m, 88H), 0,17 – 0,03 (m, 47H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) 200,54 (s), 166,89 (s), 164,94 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 66,80 (s), 65,38 (s), 55,30 (s), 52,88 (s), 50,51 (s), 49,13 (s), 48,01 (s), 43,97 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,29 (s), 39,03 (s), 36,70 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 27,79 (d, *J* = 0,5 Hz), 25,76 – 25,55 (m), 24,54 (s), 23,25 (s), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ¹⁵N NMR (51 MHz, DMSO-*d*₆) δ -326,40 (s), -334,90 (s). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS *m/z* израчунато за C₄₁H₆₂N₂O₈Si: [M + H]⁺ *m/z*: 738,43, нађено 739,03.



1-(2-(2-ацетил-4-(((2*E*,10*E*)-13-((*tert*-бутилдиметилсилил)окси))-6-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9, 11*a*,12,13,14,14*a*-декахидро-1*H*-циклопента[*f*][1]оксациклотридецин-1-ил)окси)карбонил)фенокси)етил)-6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (**Pro-3DPQ-9**). Беличаста чврста супстанца (29,94 mg, 90%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,86 (s, 3H), 8,47 (s, 3H), 8,11 (s, 3H), 7,45 (s, 3H), 7,13 (d, *J* = 64,3 Hz, 6H), 6,37 (s, 3H), 6,04 (s, 3H), 5,48 (s, 3H), 5,20 (d, *J* = 48,5 Hz, 6H), 4,38 (s, 3H), 4,30 – 4,13 (m, 6H), 4,02 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,36 – 3,22 (m, 10H), 3,21 (s, 2H), 2,94 – 2,76 (m, 6H), 2,57 – 2,43 (m, 19H), 2,43 – 2,33 (m, 9H), 2,17 (d, *J* = 14,7 Hz, 5H), 2,09 (s, 2H), 1,97 (dd, *J* = 27,1, 10,2 Hz, 13H), 1,85 – 1,63 (m, 9H), 1,52 (d, *J* = 49,0 Hz, 6H), 1,10 – 0,96 (m, 27H),

Експериментални део

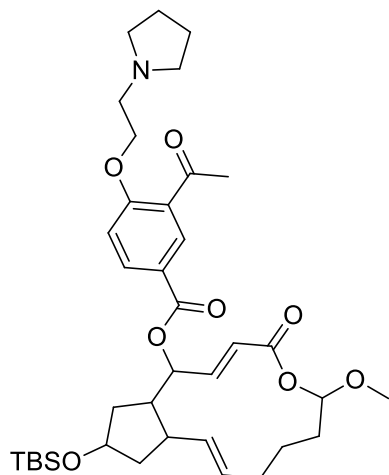
0,24 – 0,10 (m, 18H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 167,89 (s), 166,89 (s), 166,47 (s), 164,94 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,78 (d, $J = 10,1$ Hz), 127,47 (s), 126,30 (s), 124,96 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 66,30 (s), 55,30 (s), 49,13 (s), 48,01 (s), 46,03 (s), 42,77 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,29 (s), 36,70 (s), 33,68 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 346,00 (s), 338,90 (s), 337,20 (s), 332,00 (s), 253,90 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{NO}_{10}\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 645,30, нађено 645,81.



(2E,10E)-13-((*tert*-бутилдиметилсилил)окси)-6-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[f][1]окса[3,4-b]тридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(пиперидин-1-ил)етокси)бензоат (Pro-3DPQ-10).

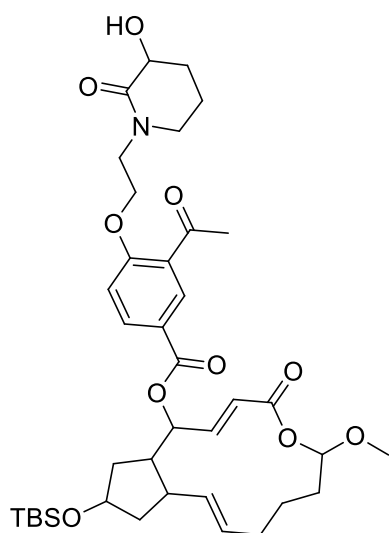
Беличаста чврста супстанца (28,02 mg, 95%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,40 (s, 47H), 7,99 (s, 48H), 7,14 (s, 45H), 7,07 (s, 41H), 6,37 (s, 48H), 6,04 (s, 49H), 5,48 (s, 49H), 5,23 (s, 26H), 5,15 (s, 71H), 4,16 – 4,00 (m, 95H), 3,61 (s, 43H), 3,36 – 3,22 (m, 141H), 2,82 – 2,65 (m, 101H), 2,65 – 2,59 (m, 80H), 2,59 – 2,42 (m, 538H), 2,42 – 2,35 (m, 10H), 2,15 (d, $J = 10,2$ Hz, 91H), 2,09 (s, 51H), 2,00 (s, 35H), 1,94 (d, $J = 10,0$ Hz, 71H), 1,87 (d, $J = 2,8$ Hz, 30H), 1,80 (d, $J = 47,8$ Hz, 115H), 1,66 (d, $J = 15,7$ Hz, 83H), 1,62 – 1,49 (m, 383H), 1,47 (s, 47H), 1,11 – 0,98 (m, 423H), 0,20 – 0,06 (m, 282H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 164,94 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 67,45 (s), 55,30 (s), 55,19 – 54,80 (m), 54,80 – 54,60 (m), 49,13 (s), 48,01 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,29 (s), 36,70 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 25,76 – 25,55 (m), 24,68 – 24,37 (m), 23,42 (s), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -327,80 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{38}\text{H}_{57}\text{NO}_8\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 683,39, нађено 683,95.

Докторска дисертација Незрине Куртановић



(2E,10E,11aS,14aR)-13-((*tert*-бутилдиметилсилил)окси)-*b*-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a, 12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[*ff*][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(пиролдин-1-ил)етокси)бензоат (**Pro-3DPQ-11**).

Беличаста чврста супстанца (24,42 mg, 95%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,54 (s, 4H), 8,12 (s, 4H), 7,12 (d, J = 45,8 Hz, 7H), 7,05 (s, 1H), 6,37 (s, 4H), 6,04 (s, 4H), 5,81 – 5,11 (m, 12H), 4,17 – 4,01 (m, 8H), 3,61 (s, 4H), 3,42 – 3,28 (m, 12H), 3,00 – 2,79 (m, 8H), 2,79 – 2,63 (m, 8H), 2,60 – 2,42 (m, 35H), 1,97 – 1,77 (m, 13H), 2,39 – 1,22 (m, 73H), 1,98 – 1,68 (m, 22H), 1,77 (d, J = 3,3 Hz, 2H), 1,75 (s, 4H), 1,71 (s, 10H), 1,67 – 1,59 (m, 11H), 1,67 – 1,25 (m, 19H), 1,68 – 1,22 (m, 23H), 1,10 – 0,96 (m, 35H), 0,20 – 0,07 (m, 23H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 164,94 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 67,45 (s), 55,30 (s), 54,92 (s), 54,26 – 53,95 (m), 49,13 (s), 48,01 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,29 (s), 36,70 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 25,76 – 25,55 (m), 25,02 – 24,81 (m), 22,92 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -315,50 (s), ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{37}\text{H}_{55}\text{NO}_8\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 669,37, нађено 669,92.



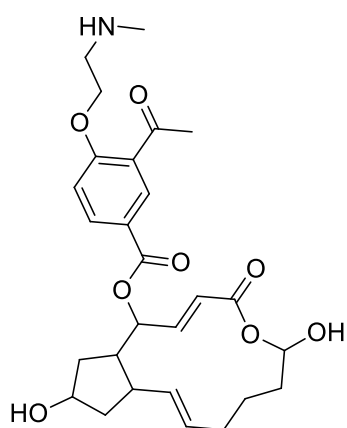
(2E,10E)-13-((*tert*-бутилдиметилсилил)окси)-*b*-метокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[*ff*][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(3-хидрокси-2-оксопиридин-1-ил)етокси)бензоат (**Pro-3DPQ-12**).

Беличаста чврста супстанца (28,04 mg, 95%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,51 (s, 4H), 8,17 (s, 4H), 7,28 (s, 4H), 7,07 (s, 4H), 6,37 (s, 4H), 6,04 (s, 4H), 5,91 (s, 4H), 5,48 (s, 4H), 5,29 (s, 4H), 5,15 (s, 4H), 4,44 (s, 4H), 4,30 – 4,14 (m, 8H), 3,90 (s, 4H), 3,61 (s, 3H), 3,48 (s, 6H), 3,35 – 3,29 (m, 11H), 3,16 (d, J = 46,6 Hz, 8H), 2,60 – 2,43 (m, 36H), 1,97 (dd, J = 27,6, 9,7 Hz, 16H), 1,85 (dddd, J = 92,6, 88,9, 45,9, 24,9 Hz, 66H), 2,07 – 1,60 (m, 42H), 2,07 – 1,37 (m, 50H), 1,53 (d, J = 49,0 Hz, 8H), 1,07 – 0,93 (m, 36H), -0,10 – -0,24 (m, 24H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 175,72 (s), 166,89 (s), 164,94 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s),

Експериментални део

127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 101,68 (s), 79,97 (s), 72,42 (s), 67,87 (s), 66,30 (s), 55,30 (s), 49,13 (s), 48,01 (s), 45,68 (d, $J = 10,7$ Hz), 40,17 – 39,96 (m), 39,29 (s), 36,70 (s), 33,05 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 26,41 (s), 25,76 – 25,55 (m), 22,92 (s), 22,44 (s), 18,59 (s), -2,89 – -3,29 (m). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -257,80 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 346,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 32,30 (s), 31,40 (s), 23,00 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{NO}_{10}\text{Si}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 713,36, нађено 713,93.

Синтеза једињења 3DPQ-1 до 3DPQ-12. У раствор било **Pro-3DPQ-1** (20 mg, 33 μmol), **Pro-3DPQ-2** (20,30 mg, 33 μmol), **Pro-3DPQ-3** (23,94 mg, 33 μmol), **Pro-3DPQ-4** (20,80 mg, 33 μmol), **Pro-3DPQ-5** (22,09 mg, 33 μmol), **Pro-3DPQ-6** (22,78 mg, 33 μmol), **Pro-3DPQ-7** (23,15 mg, 33 μmol), **Pro-3DPQ-8** (23,44 mg, 33 μmol), **Pro-3DPQ-9** (24,40 mg, 33 μmol), **Pro-3DPQ-10** (21,63 mg, 33 μmol), **Pro-3DPQ-11** (21,16 mg, 33 μmol) или **Pro-3DPQ-12** (21,63 mg, 33 μmol) у сувом дихлорометану на 0°C , 1 М TBAF у THF-у (100 μL , 0,1 mmol) додаван је кап по кап током 2 сата, након чега је додат и бор трибромид кап по кап (2 еквивалента по метокси функцији) у атмосфери аргона. Добијена смеша је затим рефлугована током 3 сата и сипана у смешу лед/вода након што се охладила на собну температуру. Водени слој је екстрахован етил ацетатом. Комбиновани органски слојеви су испрани раствором соли, осушени изнад анхидрованог Na_2SO_4 , а затим филтрирани и концентровани у вакууму. Добијени производи, **3DPQ-1** до **3DPQ-12**, пречишћени су хроматографијом на колони (25% EtOAc in Et₂O као елуент).

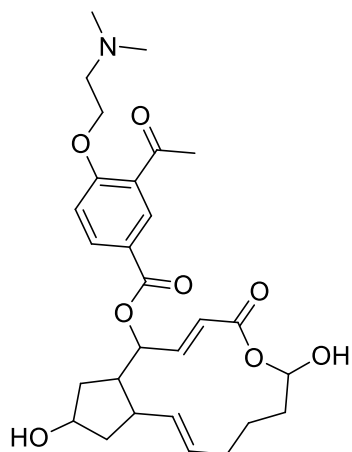


(2E,10E)-6,13-дихидрокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[f][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(метиламино)етокси)бензоат (**3DPQ-1**).

Жућкаста чврста супстанца (13,28 mg, 85%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,51 (s, 5H), 8,14 (s, 5H), 7,10 (d, $J = 34,2$ Hz, 10H), 6,67 (s, 5H), 6,04 (s, 5H), 20,00 – 3,86 (m, 66H), 5,48 (s, 4H), 5,41 (s, 4H), 5,15 (s, 5H), 4,97 (s, 5H), 4,05 (s, 1H), 3,61 (s, 5H), 3,02 (d, $J = 1,4$ Hz, 9H), 2,62 – 2,42 (m, 59H), 2,10 (dd, $J = 37,5, 25,2$ Hz, 19H), 1,95 (s, 7H), 1,84 (dd, $J = 51,4, 21,3$ Hz, 18H), 1,73 (s, 4H), 1,62 (d, $J = 42,7$ Hz, 8H), 1,62 (d, $J = 42,7$ Hz, 10H), 1,66 – 1,26 (m, 13H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 165,46 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s),

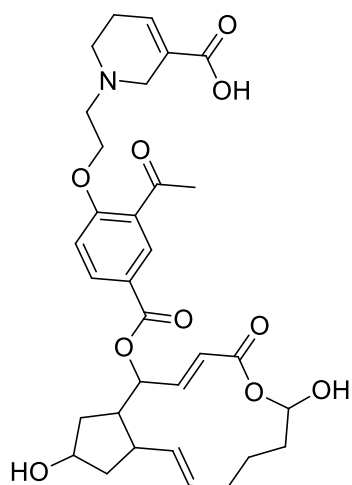
Докторска дисертација Незрине Куртановић

79,97 (s), 73,67 (s), 67,28 (s), 50,93 (s), 48,76 (s), 47,11 (s), 41,34 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,11 (s), 36,52 (s), 34,91 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 22,77 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -352,00 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 44,50 (s), 33,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунаато за $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NO}_8$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z: m/z: 501,24, нађено 501,57.



(2E,10E)-6,13-дихидрокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[ff][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(диметиламино)етокси)бензоат (**3DPQ-2**).

Жућкаста чврста супстанца (13,66 mg, 85%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,57 (s, 6H), 8,12 (s, 6H), 7,22 (s, 6H), 7,07 (s, 6H), 6,67 (s, 6H), 6,04 (s, 6H), 5,48 (s, 6H), 5,23 (s, 5H), 5,15 (s, 7H), 4,14 – 3,95 (m, 18H), 3,61 (d, $J = 2,5$ Hz, 12H), 2,80 – 2,63 (m, 12H), 2,60 – 2,43 (m, 53H), 2,31 – 2,17 (m, 37H), 2,16 (s, 3H), 2,05 (dd, $J = 26,4, 14,7$ Hz, 24H), 1,94 (d, $J = 10,0$ Hz, 8H), 1,75 (d, $J = 32,5$ Hz, 10H), 1,75 (d, $J = 32,5$ Hz, 14H), 1,75 (d, $J = 32,5$ Hz, 15H), 1,66 – 1,24 (m, 16H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 165,46 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 79,97 (s), 73,67 (s), 68,31 (s), 58,44 (s), 48,76 (s), 47,11 (s), 45,66 – 45,35 (m), 41,34 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,11 (s), 34,91 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 22,77 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -355,20 (s), ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 44,50 (s), 33,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунаато за $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{NO}_8$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z: 515,25, нађено 515,60.



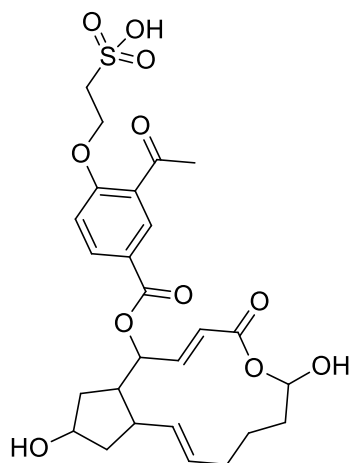
1-(2-(2-ацетил-4-((((2E,10E)-6,13-дихидрокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[ff][1]оксациклотридецин-1-ил)окси)карбонил)фенокси)етил)-1,2,5,6-

тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина (**3DPQ-3**).

Жућкаста чврста супстанца (16,75 mg, 85%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13,14 (s, 2H), 8,56 (s, 2H), 8,16 (s, 2H), 7,28 (d, $J = 19,1$ Hz, 4H), 7,07 (s, 2H), 6,67 (s, 2H), 6,04 (s, 2H), 5,48 (s, 2H), 5,19 (d, $J = 44,9$ Hz, 4H), 4,00 (dd, $J = 29,8, 5,5$ Hz, 8H), 3,61 (d, $J = 4,5$ Hz, 4H), 2,94 (d, $J = 15,9$ Hz, 4H), 2,80 (s, 2H), 2,63 (s, 2H), 2,60 – 2,43 (m, 21H), 2,33 – 2,06 (m, 12H), 2,11 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H), 2,14 – 2,06 (m, 6H), 2,13 – 1,92 (m, 12H), 1,72 (d, $J = 61,2$ Hz, 5H), 1,62 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H), 1,64 – 1,41 (m,

Експериментални део

7H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 166,47 (s), 165,46 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 142,15 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,73 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 79,97 (s), 73,67 (s), 67,45 (s), 54,64 (s), 53,79 (s), 48,76 (s), 48,52 (s), 47,11 (s), 41,34 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,11 (s), 34,91 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 26,10 (s), 22,77 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -330,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 337,20 (s), 332,00 (s), 253,90 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 44,50 (s), 33,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 516,20, нађено 516,54.



2-(2-ацетил-4-(((2E,10E)-6,13-дихидрокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[[f][1]оксациклотридецин-1-

ил)окси)карбонил)фенокси)етансулфонска киселина (3DPQ-

4). Жућкаста чврста супстанца (14,10 mg, 85%). ^1H NMR

(500 MHz, DMSO- d_6) δ 14,97 (s, 26H), 8,54 (s, 26H), 8,11 (s,

26H), 7,18 (s, 37H), 7,07 (s, 16H), 6,67 (s, 26H), 6,04 (s, 27H),

5,48 (s, 27H), 5,19 (d, $J = 42,2$ Hz, 49H), 5,13 – 5,06 (m, 4H),

4,55 – 4,38 (m, 52H), 3,98 (s, 26H), 3,61 (d, $J = 4,5$ Hz, 55H),

3,39 – 3,27 (m, 51H), 2,57 – 2,43 (m, 232H), 2,16 (s, 17H), 2,12 (d, $J = 4,0$ Hz, 6H), 2,12 –

1,92 (m, 150H), 1,72 (d, $J = 65,6$ Hz, 55H), 1,63 – 1,36 (m, 85H). ^{13}C NMR (125 MHz,

DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 165,46 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s),

131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 79,97 (s), 73,67 (s),

61,70 (s), 49,87 (s), 48,76 (s), 47,11 (s), 41,34 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,11 (s), 34,91 (s),

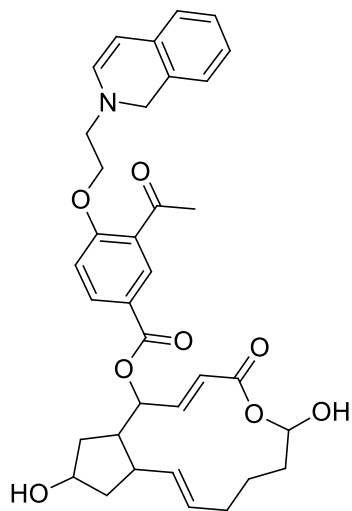
32,41 (s), 28,28 (s), 22,77 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00

(s), 164,65 – 164,13 (m), 150,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 44,50 (s), 33,40 (s), 13,00 (s). MS

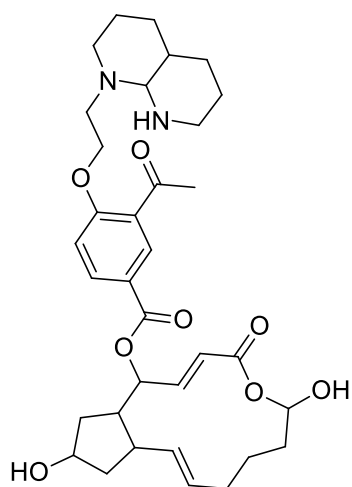
m/z израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{11}\text{S}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 552,17, нађено 552,59.

Експериментални део

NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -47,00 (s), -315,50 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 44,50 (s), 33,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 590,26, нађено 590,66.



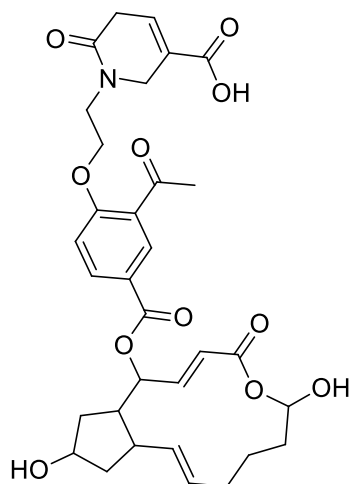
(*2E,10E*)-6,13-дихидрокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[f][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(изокинолин-2(1H)-ил)етокси) бензоат (**3DPQ-7**). Светло браон чврста супстанца (16,08 mg, 85%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,58 (s, 44H), 8,12 (s, 45H), 7,32 (s, 42H), 7,30 – 7,12 (m, 121H), 6,98 (dd, $J = 115,0, 105,8$ Hz, 205H), 6,67 (s, 45H), 6,67 (s, 48H), 6,04 (s, 46H), 5,50 (s, 8H), 5,52 – 5,17 (m, 141H), 5,15 (s, 41H), 4,95 (s, 45H), 4,50 (s, 24H), 4,43 (s, 66H), 4,21 – 4,05 (m, 89H), 3,77 (s, 45H), 3,61 (s, 46H), 3,47 (s, 46H), 2,71 (s, 48H), 2,58 – 2,40 (m, 401H), 2,29 – 2,01 (m, 150H), 2,03 (s, 61H), 2,02 (d, $J = 12,6$ Hz, 78H), 1,96 – 1,62 (m, 269H), 1,57 (s, 46H), 1,57 (s, 34H), 1,52 (d, $J = 49,0$ Hz, 105H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 165,46 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 140,38 (s), 134,56 (s), 133,09 (d, $J = 20,1$ Hz), 132,97 – 132,81 (m), 132,42 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 128,16 (s), 127,47 (s), 127,21 (s), 126,58 (s), 126,30 (s), 125,59 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 102,97 (s), 79,97 (s), 73,67 (s), 67,17 (s), 51,86 (s), 50,60 (s), 48,76 (s), 47,11 (s), 41,34 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,11 (s), 34,91 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 22,77 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 44,50 (s), 33,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{NO}_8$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 601,27, нађено 601,69.



(*2E,10E*)-6,13-дихидрокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[f][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(октахидро-1,8-нафтиридин-1(2H)-ил)етокси)бензоат (**3DPQ-8**). Беличаста чврста супстанца (16,33 mg, 85%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,46 (s, 3H), 8,10 (s, 3H), 7,08 (d, $J = 11,1$ Hz, 6H), 6,67 (s, 3H), 6,19 (s, 3H), 6,04 (s, 3H), 5,48 (s, 3H), 5,35 (s, 3H), 5,15 (s, 3H), 4,12 – 3,93 (m, 9H), 3,61 (s, 2H), 2,99 (s, 3H), 2,86 (s, 3H), 2,72 (s, 3H), 2,64 (d, $J = 6,2$ Hz, 9H), 2,52 – 2,42 (m, 24H), 2,36 (d, $J = 31,9$ Hz, 6H), 2,21 (d, $J = 47,9$ Hz, 6H), 2,12 (s, 1H), 2,09 (s, 3H), 2,02 (d, $J = 12,3$ Hz, 5H), 1,86 (dd, $J = 78,9, 6,1$ Hz, 10H), 1,78 (d, $J = 2,3$ Hz, 3H), 1,80 – 1,59 (m,

Докторска дисертација Незрине Куртановић

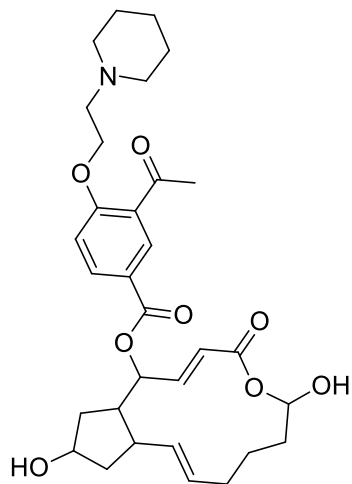
17H), 1,80 – 1,36 (m, 37H), 1,19 (d, $J = 5,5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 165,46 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 79,97 (s), 73,67 (s), 66,80 (s), 65,38 (s), 52,88 (s), 50,51 (s), 48,76 (s), 47,11 (s), 43,97 (s), 41,34 (s), 40,17 – 39,96 (m), 39,03 (s), 38,11 (s), 34,91 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 27,79 (d, $J = 0,5$ Hz), 24,54 (s), 23,25 (s), 22,77 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -326,40 (s), -334,90 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 44,50 (s), 33,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_8$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z: 610,33, нађено 610,74.



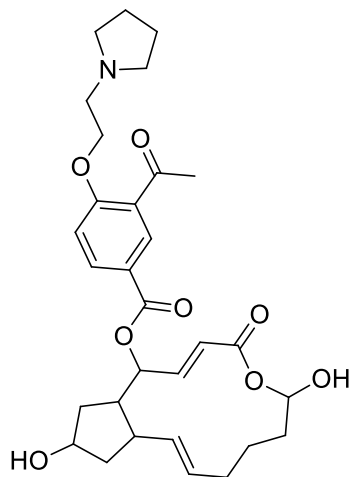
1-(2-(2-ацетил-4-((((2E,10E)-6,13-дихидрокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[[f][1]оксациклотридецин-1-ил)окси)карбонил)фенокси)етил)-6-оксо-1,2,5,6-тетрахиdropиридин-3-карбоксилна киселина (3DPQ-9).

Беличаста чврста супстанца (16,54 mg, 82%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 19,38 (s, 4H), 8,49 (s, 4H), 8,16 (s, 4H), 7,42 (s, 4H), 7,26 (s, 5H), 7,22 (s, 1H), 7,07 (s, 6H), 6,67 (s, 4H), 6,04 (s, 4H), 5,48 (s, 3H), 5,39 (s, 4H), 5,15 (s, 4H), 4,60 (s, 4H), 4,23 (s, 4H), 4,13 (s, 1H), 4,13 – 3,97 (m, 12H), 3,70 (s, 5H), 3,61 (s, 3H), 3,28 (s, 4H), 2,94 – 2,76 (m, 8H), 2,57 – 2,45 (m, 24H), 2,45 – 2,31 (m, 13H), 2,16 (s, 4H), 2,16 (s, 4H), 2,12 (t, $J = 17,5$ Hz, 13H), 2,29 – 1,96 (m, 22H), 1,94 (d, $J = 10,0$ Hz, 6H), 1,96 – 1,35 (m, 28H), 1,64 – 1,35 (m, 13H), 1,64 – 1,31 (m, 13H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 167,89 (s), 166,89 (s), 166,47 (s), 165,46 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,78 (d, $J = 10,1$ Hz), 127,47 (s), 126,30 (s), 124,96 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 79,97 (s), 73,67 (s), 66,30 (s), 48,76 (s), 47,11 (s), 46,03 (s), 42,77 (s), 41,34 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,11 (s), 34,91 (s), 33,68 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 22,77 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -287,10 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 346,00 (s), 338,90 (s), 337,20 (s), 332,00 (s), 253,90 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 44,50 (s), 33,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{NO}_{10}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z: 517,19, нађено 517,53.

Експериментални део



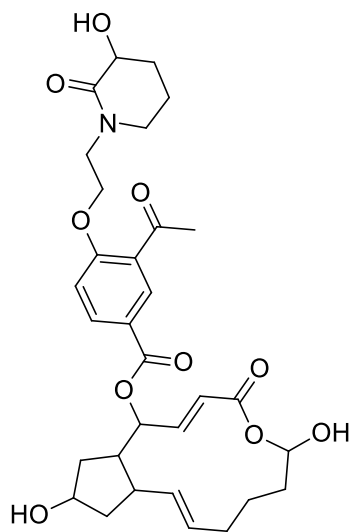
(2E,10E)-6,13-дихидрокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[f][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(пиперидин-1-ил)етокси)бензоат (**3DPQ-10**). Беличаста чврста супстанца (14,79 mg, 85%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,34 (s, 5H), 7,89 (s, 5H), 7,19 (s, 4H), 7,07 (s, 6H), 6,67 (s, 5H), 6,04 (s, 5H), 5,44 (d, $J = 43,8$ Hz, 9H), 5,15 (s, 5H), 4,16 – 3,98 (m, 15H), 3,62 (d, $J = 8,5$ Hz, 10H), 2,79 – 2,57 (m, 21H), 2,57 – 2,40 (m, 45H), 2,13 – 1,75 (m, 38H), 2,31 – 1,22 (m, 105H), 1,78 (s, 6H), 1,78 (s, 6H), 2,13 – 1,22 (m, 87H), 1,83 – 1,41 (m, 54H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 165,46 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 79,97 (s), 73,67 (s), 67,45 (s), 55,19 – 54,80 (m), 54,80 – 54,60 (m), 48,76 (s), 47,11 (s), 41,34 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,11 (s), 34,91 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 24,68 – 24,37 (m), 23,42 (s), 22,77 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -327,80 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 44,50 (s), 33,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{NO}_8$: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z : 555,28, нађено 555,66.



(2E,10E,11aS,14aR)-6,13-дихидрокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[f][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(пирролидин-1-ил)етокси) бензоат (**3DPQ-11**). Беличаста чврста супстанца (14,39 mg, 85%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,55 (s, 7H), 8,12 (s, 7H), 7,24 (s, 7H), 7,07 (s, 7H), 6,67 (s, 7H), 6,04 (s, 7H), 5,48 (s, 7H), 5,26 (s, 1H), 5,19 (d, $J = 42,4$ Hz, 13H), 4,04 (s, 8H), 3,98 – 3,94 (m, 11H), 3,64 (d, $J = 26,0$ Hz, 13H), 3,58 (s, 1H), 2,88 – 2,68 (m, 28H), 2,58 – 2,40 (m, 62H), 2,38 – 2,16 (m, 17H), 2,16 (s, 3H), 2,11 (d, $J = 3,4$ Hz, 3H), 2,13 – 1,77 (m, 48H), 1,78 (s, 5H), 1,85 – 1,56 (m, 52H), 1,47 (s, 11H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200,54 (s), 166,89 (s), 165,46 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 79,97 (s), 73,67 (s), 67,45 (s), 54,92 (s), 54,26 – 53,95 (m), 48,76 (s), 47,11 (s), 41,34 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,11 (s), 34,91 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 25,02 – 24,81 (m), 22,77 (s). ^{15}N NMR (51 MHz, DMSO- d_6) δ -315,50 (s). ^{17}O NMR (68 MHz, DMSO- d_6) δ 488,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s),

Докторска дисертација Незрине Куртановић

44,50 (s), 33,40 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за C₃₀H₃₉NO₈: [M + H]⁺ m/z: 541,27, нађено 541,63.



(2E,10E)-6,13-дихидрокси-4-оксо-4,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-декахидро-1H-циклопента[f][1]оксациклотридецин-1-ил 3-ацетил-4-(2-(3-хидрокси-2-оксопиперидин-1-ил)етокси)бензоат (**3DPQ-12**).

Беличаста чврста супстанца (13,28 mg, 85%). δ 8,55 (s, 48H), 8,09 (s, 48H), 7,21 (s, 5H), 7,13 (d, $J = 62,9$ Hz, 93H), 6,67 (s, 48H), 6,04 (s, 49H), 5,93 (s, 49H), 5,48 (s, 50H), 5,19 (d, $J = 39,1$ Hz, 95H), 4,44 (s, 49H), 4,20 – 4,16 (m, 77H), 3,98 (s, 49H), 3,79 (s, 39H), 3,62 (d, $J = 8,5$ Hz, 88H), 3,32 (s, 42H), 3,24 (d, $J = 1,4$ Hz, 107H), 2,61 – 2,43 (m, 432H), 2,17 (d, $J = 13,8$ Hz, 93H), 2,12 (d, $J = 6,8$ Hz,

17H), 2,13 – 1,77 (m, 359H), 1,77 (s, 33H), 1,72 – 1,64 (m, 124H), 1,64 – 1,48 (m, 120H), 1,47 (s, 41H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 200,54 (s), 175,72 (s), 166,89 (s), 165,46 (s), 161,47 (s), 143,04 (s), 134,56 (s), 133,17 (s), 131,22 (s), 130,82 (s), 127,47 (s), 126,30 (s), 121,22 (s), 115,21 (s), 79,97 (s), 73,67 (s), 67,87 (s), 66,30 (s), 48,76 (s), 47,11 (s), 45,68 (d, $J = 10,7$ Hz), 41,34 (s), 40,17 – 39,96 (m), 38,11 (s), 34,91 (s), 32,41 (s), 28,28 (s), 26,41 (s), 22,77 (s), 22,44 (s). ¹⁵N NMR (51 MHz, DMSO-*d*₆) δ -257,80 (s). ¹⁷O NMR (68 MHz, DMSO-*d*₆) δ 488,00 (s), 346,00 (s), 338,90 (s), 332,00 (s), 130,60 (s), 78,00 (s), 44,50 (s), 33,40 (s), 32,30 (s), 13,00 (s). MS m/z израчунато за C₃₁H₃₉NO₁₀: [M + H]⁺ m/z: 585,26, нађено 585,64.

Антагонистички потенцијал и релативни афинитети везивања синтетисаних једињења у односу на ER α и ER β [359,360]

Рекомбинантни ER α и ER β (Thermo Fisher Scientific Inc. Invitrogen, САД) и флуоресцентни естрадиол (Estradiol Glow, Jena Bioscience) извађени су из замрзивача где су држани на температури од -80°C и одмрзнути на леду 1 сат пре употребе. Флуоресцентни естрадиол додат је било ER α или ER β заједно са пуфером за скрининг (ES2 Screening Buffer, Invitrogen, USA) да би се добио опсег концентрација од 100 до 0,01 nM (односно 10 пута мање разблажење са сваком наредном итерацијом) за флуоресцентни хормон, односно концентрација од 30 nM за ER α или ER β . Позитивне контроле **4-хидроксиатамоксифен** (Sigma Aldrich CAS No. 68047-06-3) и **ралоксифен** (Sigma Aldrich CAS No. 82640-04-8) заједно су са синтетисаним једињењима тачно

Експериментални део

одмерене и растворене у DMSO, након чега је додат пуфер за скрининг да би се добиле потребне концентрације (100 до 0,01 nM, односно 10 пута мање разблажење са сваком наредном итерацијом). Затим је у сваку од микро плоча (микроплоча са 384 јамица, Corning, USA) додата позитивна контрола или синтетисано једињење (1 μ L) и 49 μ L пуфера, након чега је додато 50 μ L флуоресцентног естроген/ER α (β) комплекса да би се добила коначна запремина од 100 μ L. Негативна контрола садржала је 50 μ L пуфера за скрининг и 50 μ L флуоресцентног естроген/ ER α (β) комплекса. Негативна контрола коришћена је за одређивање вредности поларизације у одсуству антагониста у циљу одређивања вредности максималне теоријске поларизације. Микроплоча је потом инкубирана у мраку на собној температури током 2 сата уз мешање. Вредности поларизације очитане су на Safire microplate reader и коришћене за израчунавање IC₅₀ вредности. Да би се израчунале вредности IC₅₀, уцртан је проценат антагонизма ER α (β) у односу на концентрацију супстрата, позитивних контрола и синтетисаних једињења. Релативни афинитети везивања (енг. Relative Binding Affinities, RBA) са RBA естрадиола подешеним на 100%, израчунати су коришћењем следеће формуле (једначина 4):

$$RBA = \frac{AC_{50\text{за естрадиол}}}{AC_{50\text{за антагонист}}} \times 100 \quad (4)$$

Експериментално добијене вредности представљене су као средње вредности \pm стандардна девијација три независна експеримента. Вредности K_a (односно K_i) [361] сваког антагониста за сваки рецептор добијене су из RBA вредности коришћењем једначине 5:

$$K_a = \frac{100}{RBA} \times K_d \quad (5)$$

где је K_d константа дисоцијације E₂-ER α или E₂-ER β комплекса. Естрадиол се везује за ER α са K_d од 0,2 nM односно за ER β са K_d од 0,5 nM.

Антипролиферативна активност синтетисаних једињења против ER α (+)- и ER α (-)-зависних ћелијских линија карцинома дојке односно против ER α (+)-зависних ћелијских линија карцинома ендометријума [362-364]

Антипролиферативне активности једињења у односу на различите ћелијске линије карцинома дојке дефинисане су коришћењем МТТ редукционог теста. Хумане

Докторска дисертација Незрине Куртановић

MCF-7 и MDA-MB 231 ћелијске линије карцинома дојке, као и нормалне хумане MRC-5 ћелијске линије, добављене су од стране American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Ћелије су рутински култивисане у DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich), допуњеном са 10% феталног говеђег серума (FBS, Sigma Aldrich), 100 U/mL пеницилина и 100 mg/mL стрептомицина. Ћелије су трипсинизоване и засејане у запремини од 100 μ L по јамици са густином од $2,5 \times 10^3$ ћелије по јамици у плоче са 96 јамица (Thermo Fisher Scientific) и инкубиране 24 сата на 37°C (95% влажности и 5% CO₂) у InuSafe CO₂ инкубатору (PHC Europe B.V., Netherlands). Након инкубације, ћелије су третиране са 100 μ L медијума по јамици који је садржао E₁, позитивне контроле и свако од синтетисаних једињења у опсегу концентрација од 100 до 0,01 nM. Негативној контроли додата је еквивалентна запремина медијума који је садржао 1% (v/v) DMSO (Sigma Aldrich CAS No. 67-68-5). После 48 сати инкубације, медијум је уклоњен и 100 μ L 0,5 mg/mL 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2H-тетразолијум-бромида (енг. 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, МТТ, Sigma Aldrich, CAS No. 298-93-1) додато је у сваку јамицу након чега су плоче даље инкубиране 4 сата. Супернатант из сваке јамице пажљиво је уклоњен, кристали формазана су растворени у 100 μ L DMSO и забележена је апсорбанца на таласној дужини од 540 nm за одређивање IC₅₀ вредности. Сви експерименти су изведени током фазе експоненцијалног раста ћелијских линија.

Смањивање концентрације ER α након третмана MCF-7 ћелијских линија синтетисаним једињењима [75,362-364]

За овај експеримент, MCF-7 ћелије истоветно су узгајане и третиране испитиваним једињењима као што је раније описано, након чега су фиксиране коришћењем коначне концентрације формалдехида од 3,7% (v/v) током 20 минута. Ћелије су испране три пута помоћу 250 μ L раствора фосфатног пуфера (енг. phosphate-buffered saline, PBS), користећи BioTek ELx405 plate washer (BioTek Instruments, Winooski, VT) након чега је у сваку од јамица додато 50 μ L PBS. PBS је аспириран, а ћелије су пермеабелизоване помоћу 40 μ L PBS који је садржавао 0,5% (v/v) Tween 20 током 1 сата на собној температури. Ћелије су затим испране три пута у 250 μ L раствора PBS/0.05% (v/v) Tween 20 (PBST) помоћу BioTek ELx405 plate washer (BioTek Instruments, Winooski, VT). У сваку јамицу додато је по 20 μ L смеше која је садржала раствор ER α моноклонског зечјег антитела (#RM-9101-S, Thermo Scientific) разблаженог у односу 1:1000 у PBST/3% (w/v) говеђег серумског албумина (BSA)

Експериментални део

[односно Clone SP1 (епитоп са синтетичким пептидом изведеним са C-терминуса хуманог ER α)] те раствор PR моноклонског мишјег антитела (#M3569; Dako, Carpinteria, CA USA) разблаженог у односу 1:1000 у PBST/3% (w/v) говеђег серумског албумина (BSA) [односно Clone PgR 636 (епитоп са рекомбинантном PR-A пуне секвенце који је био специфичан и за PR-A и за PR-B изоформе)] у PBST/3% (w/v) говеђег серумског албумина (BSA), да би потом плоче биле инкубиране преко ноћи на 4°C. Ћелије су испране три пута у 250 μ L PBST, а затим су инкубиране са 20 μ L раствора по јамици козјег анти-зечијег IgG Alexa Fluor 594 антитела (Molecular Probes, Life Technologies, Paisley, UK) разблаженог у односу 1:500 у PBST/3% (w/v) BSA, 20 μ L раствора по јамици козјег анти-мишијег Alexa Fluor 488 антитела (Molecular Probes) разблаженог у односу 1:500 у PBST/3% (w/v) BSA, те 20 μ L раствора Hoechst (Molecular Probes) разблаженог у односу 1:5000 у PBST/3% (w/v) BSA, током 1 сата на собној температури. Ћелије су испране три пута у 250 μ L PBST, затим је додато 40 μ L PBS по јамици и плоче су прекривене црном фолијом. Сlike ћелија добијене су помоћу Cellomics Arrayscan VTI HCS reader (Thermo Scientific) помоћу 10 \times 0.3NA објектива и применом BGFR_386_23 и BGFR_549_15 филтера у циљу детекције Hoechst and Alexa Fluor 594 сигнала. Користећи Compartmental Analysis v4 bio-application, генерисане су нуклеарне маске од језгара обојених помоћу Hoechst у каналу 1, а одговарајући праг детекције примењен је у каналу 2 за квантификацију ER α унутар нуклеарних маски. Средња вредност укупног интензитета нормализован је за број ћелија, дајући укупни интензитет бојења ER α по ћелији. Да би се одредио сигнал повезан са PR, плоче су очитане помоћу Acumen Explorer eX3 microplate cytometer (TTP LabTech, Melbourn, UK). Праћети екситацију на 405 nm и на 488 nm, флуоресценција ћелијских објеката и флуоресценција повезана са PR детектоване су два таласна опсега емисије таласних дужина од 420-500 nm, односно од 500-530 nm. Подаци су нормализовани за број ћелија израчунавањем односа ћелијских објеката према интензитету флуоресценције.

Целуларни есеј за одређивање функционалног антагонизма ER α [75,362-364]

Експресија гена PR регулисана помоћу ER α мерена је као биомаркер за агонизам и антагонизам ER α . MCF-7 ћелијске линије засејане су у медијуму редукованог серумска у микроплочу са 384 јамица дан пре теста. Агонизам: ћелије су третиране сваким испитиваним једињењем (опсег концентрације од 100 до 0,01 nM) током 24 сата пре него што су фиксиране и имуно обојене за PR. Антагонизам: ћелије су претходно

Докторска дисертација Незрине Куртановић

подвргнуте предтретманом са 0,1 nM E₂ у интервалу од 30 минута а затим и сваким испитиваним једињењем (опсег концентрације од 100 до 0,01 nM) током 24 сата пре него што су фиксиране и имуно обојене за PR. Концентрације PR детектоване су скенирањем ласером помоћу Acumen Explorer eX3 microplate cytometer.

Утицај испитиваних лиганда ERα на сигналну трансдукцију MCF-7 ћелијских линија [364]

Western Blots анализе

Узгајање, засејавање и сатурација MCF-7 ћелијских линија са E₂, позитивним контролама и синтетисаним једињењима у концентрацијама 0,1 и 1 nM, односно 1 и 10 nM током 24 сата, изведена је сходно претходно описаним протоколима. Ћелије су потом испиране два пута са PBS, да би потом биле сакупљене и лизиране пуфером за лизирање, који се састојао од 100 mM Tris-HCl (Sigma Aldrich, CAS No. 1185-53-1, pH 6,8, 4% (m/v), SDS (CAS No. 151-21-3), 20% (v/v) глицерола (Sigma Aldrich CAS No. 56-81-5), 200 mM β-меркаптоетанола (Sigma Aldrich CAS No. 60-24-2), 1 mM фенилметансулфонил флуорида (PMSF, Sigma Aldrich, CAS No. 329-98-6), 0,1 mM NaF (Sigma Aldrich CAS No. 7681-49-4) и DTT (Sigma Aldrich CAS No. 3483-12-3), током 1 сата на леду. Лизати су затим подвргнути центрифугирању (13000 rpm) на 4°C током 20 минута. Концентрација протеина у супернатантима детектована је помоћу BCA protein assay (Thermo, Waltham, MA). Затим је једнака количина протеина одвојена са 12% SDS-PAGE и пребачена у поливинилиден дифлуорид (PBDF) мембране (Millipore, Bedford, MA) помоћу полу-сувог система за пренос (Bio-rsd, Hercules, CA). Експресија протеина детектована имунопреципитацијом са специфичним антителима (p-Raf-1 Antibody (E-1): sc-271929; p-ERK 1/2 Antibody (pT202/pY204.22A): sc-136521; Raf-1 Antibody (E-10): sc-7267; ERK 1/2 Antibody (MK1): sc-135900; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) преко ноћи на 4°C, праћеном секундарном имунопреципитацијом са Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Abcam, Cambridge, UK) у периоду од 1 сата на 37°C. Сва антитела разблажена су у PBS са Tween-20 (PBST, G-Biosciences, St. Louis, MO, USA) који је садржао 1% говеђег серумског албумина (енг. Bovine Serum Albumin, BSA, Sigma Aldrich, CAS No. 9048-46-8). Појачани хемилуминесцентни реагенси (Beyotime, Jiangsu, China) коришћени су за откривање HRP на имунобловтовима, а визуелизоване траке снимљене су филмом.

Експериментални део

Траке су квантификоване помоћу софтвера Quantity One (Vision 4.62, Bio-rad, Hercules, CA) док су а релативни нивои протеина нормализовани у односу на β -актин.

Транскрипциона активност гена [365,366]

Хумане MCF-7 ћелијске линије трансфектоване су ERE-TK-LUC (Addgene, Watertown, Massachusetts, USA, Catalog No. 11354) и AP-1-LUC (Addgene, Watertown, Massachusetts, USA, Catalog No. 40342) плазмидима који садрже репортер ген луциферазе за ER α - и AP-1-зависни промотер, респективно, и ко-трансфектоване плазмидом β -галактозидазе (Addgene, Watertown, Massachusetts, USA, Catalog No. E1081). За есеј ERE-TK-LUC коришћен је DMEM без фенола, допуњен са 10% серума без стероида (Cone Bioproducts, 1012 N Austin, Texas, USA). Трансфекција је вршена током 24 сата на 37°C употребом Metafectene PRO (Biontex). Након трансфекције, медијум је промењен и ћелије су третиране синтетисаним једињењима, референтним лековима или контролом носача. Да би се индуковала AP-1 транскрипциона активност, MCF-7 ћелије су третиране форбол 12-миристатином 13-ацетатом (PMA, Sigma Aldrich, CAS No. 16561-29-8) током 5 сати. Каталитичка активност луциферазе измерена је према стандардном протоколу (Promega) употребом Tecan Infinite M200 Pro, док је активност β -галактозидазе анализирана стандардним колориметријским тестом коришћењем MultiScan FC (Thermo). Активности луциферазе/ β -галактозидазе нормализоване су вредностима интерних контрола и представљене као средња вредност \pm стандардна девијација након три независна експеримента. Активности ER α - или AP-1 изражене су произвољним јединицама као однос активности луциферазе/галактозидазе.

Утицај испитиваних антагониста ER α на сигнализацију унутар MCF-7 ћелија [367,368]

Антитела, лекови и Western анализа

Антитела су добијена од следећих компанија: анти-p53 (DO-1), анти-ER α (HC-20), анти-p21, анти-SMRT као и нормални серум зеца и миша из Santa Cruz; анти-NCoR и анти-HDAC1 из Upstate Biotechnology; анти- α -тубулин и β -актин (A2066) из Sigma-Aldrich. Ћелијски лизати, засићени испитиваним једињењима анализирани су на SDS/PAGE геловима, након чега је уследила Western blott анализа са антителима

Докторска дисертација Незрине Куртановић

против различитих протеина. Специфични протеини су детектовани методом побољшане хемилуминисценције (Amersham Biosciences).

qPCR

Укупна ћелијска RNA изолована је помоћу Absolutely RNA Miniprep kit (Stratagene). До количине 1 µg укупне RNA из појединачних узорака обрнуто је транскрибовано у 20 µL реакцији коришћењем iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Један микролитар добијене cDNA је употребљен у укупној запремини од 25 µL PCR-а; qPCR је изведен на систему за ABI Prism 7300 sequence detection system са SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad) уз коришћење специфичних прајмера. Релативни нивои mRNA или DNA (у случају qChIP) израчунати су применом $\Delta\Delta C_t$ методе. За анализу mRNA, β -актин mRNA коришћена је као ендогена контрола. Везивање p53 за p21 промотер коришћено је за нормализацију q-ChIP-а. Следећи прајмери су коришћени за експерименте изведене на људским ћелијама:

BTG2 forward (159–179): 5' GTG AGC GAG CAG AGG CTT AAG 3'

BTG2 reverse (259–242): 5' GAG CCC TTG GAC GGC TTT 3'

PUMA forward (1442–1461): 5' ATG CCT GCC TCA CCT TCA TC 3'

PUMA reverse (1566–1544): 5' TCA CAC GTC GCT CTC TCT AAA CC 3'

BAX forward (290–310): 5' TGG AGC TGC AGA GGA TGA TTG 3'

BAX reverse (390–370): 5' CCA GTT GAA GTT GCC GTC AGA 3'

DR5 forward (1747–1766): 5' CCC AGT GGA TGG AAC ATC CT 3'

DR5 reverse (1854–1833): 5' CAC AAA CGG AAT GAT CCA GAC A 3'

GADD45A forward (434–453): 5' CTC AAC GTC GAC CCC GAT AA 3'

GAD45A reverse (534–515): 5' GCC TGG ATC AGG GTG AAG TG 3'

Actin forward (212–234): 5' ATG GGT CAG AAG GAT TCC TAT GT 3'

Actin reverse (453–432): 5' AAG GTC TCA AAC ATG ATC TGG G 3'

Експериментални део

ChIP, qChIP и секвенцијални ChIP

ChIP тестови изведени су на MCF-7 и на Saos2 ћелијама коришћењем ChIP kit из Upstate Biotechnology према упутствима произвођача са мањим изменама. Хроматин је умрежен коришћењем 1,5% формалдехида током 10 минута на 37°C, а ћелије су сакупљене након два испирања мешавином инхибитора протеаза која садржи PBS. За qChIP, DNA је анализирана у последњем кораку помоћу qPCR. Следећи прајмери коришћени су за анализу ChIP DNA помоћу PCR у реалном времену и полуквантитативне PCR методе:

PCNA, p53 site, forward (-284 to -265): 5' CCA CCA TAA AGC TGG GGC TT 3'

PCNA, p53 site, reverse (-182 to -201): 5' TCT CCC CGC CTC TTT GAC TC 3'

p21, 5' p53 site, forward (-2313 to -2293): 5' GCT GTG GCT CTG ATT GGC TTT 3'

p21, 5' p53 site, reverse (-2212 to -2231): 5' ACA GGC AGC CCA AGG ACA AA 3'

p21, 3' p53 site, forward (-1452 to -1432): 5' CAT CCC CAC AGC AGA GGA GAA 3'

p21, 3' p53 site, reverse (-1310 to -1329): 5' ACC CAG GCT TGG AGC AGC TA 3'

p21, NS site, forward (-4443 to -4422): 5' GAG TCC TGT TTG CTT CTG GGC A 3'

p21, NS site, reverse (-4199 to -4220): 5' CTG CAT TGG GGC TGC CTA TGT A 3'

За секвенцијалне ChIP тестове, ћелијски лизати иницијално су инкубирани са анти-p53 антителом, а имунокомплекси су елуирани на 37°C током 30 минута у речип пуферу (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8,1), након чега је уследила инкубација са анти-ER α антителом. Секундарни имунокомплекси су елуирани у речип пуферу и инкубирани са антителима против NCoR, SMRT, RIP140 и HDAC1. Коначни имунокомплекси елуирани су у елуционом пуферу (500 μ L 1% SDS, 0,1 M NaHCO₃) и обрађени за DNA анализу.

Ефекти синтетисаних једињења на цитотоксичност и расподелу ћелијског циклуса унутар ER α (+)-зависних ћелијских линија рака дојке [364]

Узгајање, засејавање и сатурација MCF-7 ћелијских линија са E₂, позитивним контролама и синтетисаним једињењима изведена је сходно претходно описаним протоколима. Након третмана, ћелије су испране два пута ледено хладним PBS (Gibco,

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Cat. CAS No. 20012), сакупљене центрифугирањем и фиксирани у леденом 70% (v/v) етанолу, испране помоћу PBS, ресуспендоване са 0,1 mg/mL RNase (Biocompare, San Francisco California, USA), обојене са 40 mg/mL PI (Sigma Aldrich, CAS No. 25535-16-4) и анализирани проточном цитометријом применом FACScalibur (Becton Dickinson). Расподела ћелијског циклуса израчуната је помоћу софтвера Flowjo 7.6.1.

Одређивање липофилности [75,369]

Вредности $\log D_{7,4}$ експериментално су добијене методом мешања (енг. shake-flask method). Калибрациона права добијена је наношењем вредности пет различитих концентрација једињења (5, 10, 20, 30, 40 и 50 mg/kg телесне тежине пацова) у *n*-октанолу. Затим је свака од примењених концентрација испитиваних једињења растворена у 100 μ L DMSO-а и разблажена *n*-октанолом до 25 mL у волуметријском суду. Из овог раствора, 10 mL је разблажено *n*-октанолом до 10 mL. Апсорбанција једињења у овим растворима *n*-октанола измерена је UV-Vis спектрофотометријом. Двофазни систем који је садржао 4 mL претходно припремљених раствора *n*-октанола и 8 mL фосфатног пуфера (pH = 7,4) је мешан на помоћу механичке мешалице током 30 минута. Након потпуног раздвајања фаза, слој *n*-октанола осушен је преко анхидрованог натријум сулфата и мерена је апсорбанца. Концентрација је израчуната из калибрационог графика и вредност $\log D_{7,4}$ је одређена помоћу једначине 6:

$$\log D_{7,4} = \log\left(\frac{y}{x - y}\right) \quad (6)$$

где *x* представља концентрацију једињења у фази *n*-октанола пре мешања, а *y* представља концентрацију једињења у фази *n*-октанола након мешања. За свако једињење је изведено пет независних мерења.

Антикацерогена активност синтетисаних једињења *in vivo* [370]

Женски девичански пацови Wistar соја узгојени су на Војно-медицинској академији Универзитета у Београду и добављени у старости од 35 дана. Све поступке на животињама одобрио је Одбор за етичку негу и употребу животиња Института за биолошка истраживања, Београд, који делује у складу са Водичем за негу и употребу лабораторијских животиња, објављеног од стране US National Institute of Health (NIH Publication No. 85/23, revised in 1986). По три пацова смештена су и кавез и одржавана

Експериментални део

на 25 ± 2 °C са дневним и ноћним интервалима од по 12 сати уз стандардну исхрану и води по потреби. Рак дојке је индукован након апликације **MNU** (Sigma Aldrich CAS No. 684-93-5). Водени раствор у концентрацији од 10 mg/mL направљен је влажењем **MNU** праха са 3%-тном сирћетном киселином и растварањем у 0,9% раствору NaCl; за сваку инјекцију припремљен је свеж раствор. Пацови су тратирани интраперитонеално (енг. *Intraperitoneal, i.p.*) дозом од 50 mg/kg **MNU** након навршавања старости од 50 дана. Животиње су подељене у различите групе са по шест животиња у свакој групи. Животиње унутар групе I (нетакнута контрола) примиле су 0,9% раствор NaCl. Животиње унутар група II-IV и V-VII третиране су са **MNU**. Две недеље након третмана са **MNU**, животиње су третиране синтетисаним једињењима и контролним супстанцама (5 и 50 mg/ kg, за групе II-IV и V-VII, респективно) орално једном дневно током шест недеља. Животињама унутар групе I које нису третиране са **MNU** групе дат је Tween 80 према експерименталном протоколу. Након третмана са **MNU** животиње су палпирани недељно како би се открило присуство тумора млечних жлезда. Након констатовања тумора, забележено је време појаве првог тумора (период латенције), број тумора по пацову (оптерећење тумором) и релативна величина сваког тумора. Пречник тумора је мерен микрометром, а запремина је израчуната помоћу формуле 7:

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (7)$$

где је r половина просечног пречника. По завршетку третмана синтетисаним једињењима, животиње су жртвоване, а прикупљени су узорци серума и јетре.

Одређивање серумских биохемијских маркера [371]

Серум, за одређивање биохемијских параметара, AST, ALT, ALP и билирубин, припремљен је брзом Quick методом [372], где је одмах потопљен у течни азот и чуван до употребе на -80 °C. Активности AST и ALT на 340 nm и ALP на 405 nm одређене су UV-Vis кинетичким методама према препорукама Стручног одбора Међународне федерације клиничке хемије (енг. International Federation of Clinical Chemistry, IFCC) [373-374]. Коришћене су колориметријске методе за одређивање укупног билирубина (метода Jendressik-Grof 550 nm) [375-376]. Сва кинетичка и колориметријска мерења снимљена су применом Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis спектрофотометра.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Одређивање антиоксидативних маркера у хомогенату јетре [371]

Узорци јетре пацова хомогенизовани су у фосфатном пуферу (5 mM, pH = 7,4) да би се добио 10% (m/v) хомогената јетре и затим центрифугирани на 4000 rpm 15 минута на 4°C. Супернатант хомогената јетре коришћен је за процену нивоа редукованог глутатиона (енг. glutathione, GSH) [377] и каталазе (енг. catalase, CAT) [378] колориметријском методом. Садржај малондиалдехида (MDA) у супернатанту хомогената јетре одређен је стандардно коришћењем 1,1,3,3-тетраетоксипропана [379]. Укупне концентрације протеина одређене су према методи Lowry-а [380] користећи говеђи серумски албумин као стандард. Сва колориметријска мерења су снимљена применом Perkin-Elmer Lambda 25 UV/Vis спектрофотометра.

Одређивање афинитета синтетисаних једињења да се везују за протеине плазме [381]

Плазма пацова која је садржала испитана једињења садржи у концентрацији од 5 или од 50 mg/kg телесне тежине, инкубирана је на 37°C током 2 сата. Након инкубације, 400 µL узорака премештено је у трипликату у свакој концентрацији у горњи резервоар испраних ултрафилтрационих јединица Centri-free YM-30 (Millipore, Bedford, MA) и затим центрифугирано током 20 минута на 2000 rpm. Аликвоти ултрафилтрата и нефилтрираних смеша за инкубацију анализирани су на укупну концентрацију протеина помоћу бицинонинско-киселинског теста за одређивање концентрације протеина (BCA assay; Pierce, Rockford, IL).

Одређивање унутрашњег клиренса хепатоцита [382]

Припрема хепатоцита пацова

Изолација хепатоцита пацова у основи је изведена применом двофазне колагеназа перфузијске методе *in situ*. Укратко, хепатична портална вена анестезираних женки пацова Wistar соја (тежине од 200-300 g) канилирана је непосредно изнад споја слезинске и пилоричне вене. Перфузијски медијум јетре (Invitrogen, Paisley, UK) перфузиран је кроз хепатичну порталну вену све док јетра није била прочишћена до уједначене боје (обично након 7-8 минута при брзини перфузије од 30 mL/min). Медијум за варење јетре (Invitrogen) затим је перфузиран све док јетра није показала знаке опсежне дисоцијације (обично након додатних 6-8 минута при брзини перфузије од 30 mL/min). Јетра је дисецирана из пацова, а ћелије су нежно избачене из капсуле

Експериментални део

јетре у чашу која је садржала ледено хладни пуфер за суспензију хепатоцита [2,34 g натријум НЕРЕС -а, 0,4 g D-фруктозе, 2,0 g говеђег серумског албумина (енг. bovine serum albumin, BSA), 1-литарски еквивалент праха модификованог Dulbecco Eagle медијума (Sigma, Gillingham, UK], разблажен у једном литру воде и подешен на рН 7,4 помоћу 1 М НСI]. Суспензија ћелија пропуштена је кроз мрежицу од 250 μm у претходно охлађену епрувету и центрифугирана на 50g током 2 минута на 4°C. Супернатант је декантиран, ћелијски пелет је ресуспендован у пуферу за суспензију (без BSA) и поновљен је корак центрифугирања. Добијени ћелијски пелети ресуспендовани су у 10 mL суспензионог пуфера (без BSA), а процена приноса и одрживости хепатоцита добијена је применом трипан плаво методе искључивања. Коришћене су само ћелије са одрживошћу од 80%.

Одрђивање метаболичког CL_{int} из хепатоцита пацова

NCE компартменти припремљени су у диметил сулфоксиду у стострукој концентрацији инкубације (100 μM), након чега је одпипетирано 10 μL у бочицу која је садржала 490 μL хепатоцитног суспензијског пуфера (без серума). Вијалица која је садржала хепатоците пацова у концентрацији од 2 милиона одрживих ћелија/mL претходно је инкубирана током 5 минута у воденом купатилу мешањем (80 осцилација/мин) на 37°C, заједно са бочицом која садржи мешавину пуфера и лека. Реакције су започете додавањем 500 μL суспензије хепатоцита у 500 μL смеше лек/пуфер. Аликвоти (40 μL) су уклоњени на 0, 2, 6, 15, 30, 45, 60 и 90 минута, а реакције су стопиране у 120 μL ледено хладног метанола. Узорци су затим подвргнути замрзавању у периоду од 1. сата на температури од 20°C, а затим центрифугирани на 2000 rpm током 20 мин на 4°C. Супернатанти су уклоњени и анализирани како је описано у наставку. CL_{int} је процењен помоћу једначине 8:

$$CL_{int} = V \times k \quad (8)$$

где је V запремина инкубације, а k константа брзине елиминације. Унутрашњи клиренс неvezаног лека *in vivo* ($CL_{int} \text{ in vivo}$) израчунат је из клиренса крви из јетре уз употребу паралелног модела цеви, као што је приказано једначином 9:

$$CL_{int} = \frac{Q_h}{f_{ub} \times \ln \frac{(Q_h - CL_h)}{Q_h}} \quad (9)$$

где је CL_h клиренс хепатичне крви, f_{ub} је удео лека који је неvezан у крви а Q_h је проток крви (70 mL/min/kg код пацова).

Фармакокинетичке студије на пацовима [382]

За потребе процене оралне биорасположивости и извођења фармакокинетичких студија, женкама Wistar пацова са кататеризованим вратним венама, $n = 3$ по групи, администрирана је појединачна доза сваког једињења било интравенозно (*iv*) путем репне вене (5 mg/kg; 6 mg/m²) или орално (5, или 50 mg/kg; 60, 180 mg/m²). Примењене концентрације биле су 5 mL/kg за интравенски и 5 mg/L за орални пут. Пацови су гладовали током ноћи пре апликације једињења. За интравенски третман, једињења су солубилизована у DMSO:PEG300 (15:85) при 5 mg/mL, а за оралну примену, формулисана су у PEG400:Labrasol (1:1, v:1) у концентрацијама од 0,5 и 5 mg/mL. Узорци крви (~200 µL) сакупљани су у више временских тачака након примене дозе током 24 сата из вратне каниле и премештани су у епрувете са EDTA да би се добила потпуно антикоагулирана крв. Плазма (~200 µL крви прикупљене након другог сата) припремљена је центрифугирањем на 2-8°C и чувана смрзнута у дубоком замрзавању на приближно -70°C до одређивања концентрације испитиваних једињења.

Фармакокинетичка анализа је извршена на подацима о концентрацији лека у пуној крви за појединачне животиње применом не-компаратментарних метода и WinNonlin® Professional (Version 5.2, Pharsight, Mountain View, CA). Фармакокинетички параметри, израчунати за сваку животињу, обухватили су уочену максималну концентрацију у плазми (C_p), екстраполирану концентрацију у плазми у тренутку 0 (C_0 ; само *iv* група), површину испод криве зависности концентрације једињења у плазми у односу на време апликације, од тачке 0 до последње временске тачке (AUC_{last}) односно до тачке бесконачности (AUC_{inf}), полуживот терминалне елиминације ($t_{1/2}$), привидни волумен расподеле (V) и укупни клиренс (Cl). Средње време боравка (енг. mean residence time, MRT) израчунато је дељењем површине испод криве првог тренутка ($AUMC$) са AUC . Биорасположивост (F) је процењена помоћу следеће формуле (једначина 10):

Експериментални део

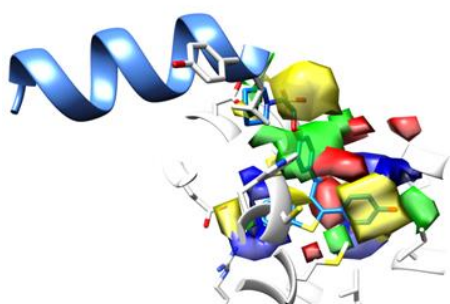
$$F = AUC_{inf\ po} \times \frac{Dose_{iv}}{AUC_{inv\ iv}} Dose_{po} \quad (10)$$

Хистопатолошке студије [371]

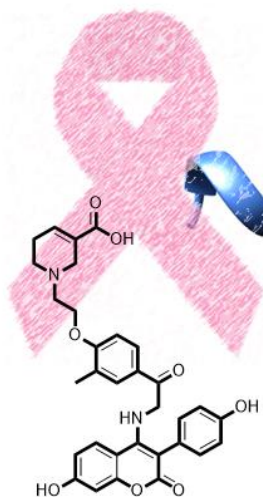
Исечци препарата канцера дојке фиксирани су са 10% формалином у PBS у периоду од 24 h и уроњени у парафин. Секције дебљине 5 μ m направљене су помоћу микротоме, обојене су помоћу хематоксилина-еозина и посматране под микроскопом да би се утврдиле хистопатолошке промене. Фотографије сваког исечка снимљене су са увећањем од 200 пута.

Резултати и дискусија

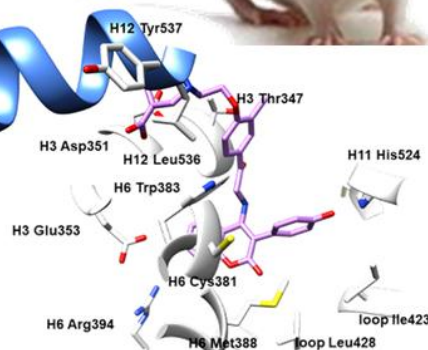
3



Оптимизовани и робусни 3-D
QSAR
моделу упарени са SB и LB
протоколима поравнања.
примењиви у дизајну нових
SERMs против ER α
и канцера дојке



Синтеза нових SERMs
3DQ-1a до
3DPQ-1e



3DQ-4a

in vitro:

IC₅₀ ER α = 200 pM;

IC₅₀ MCF-7 = 250 pM

in vivo:

Латенција тумора = 11 - 16 недеља

Оптерећење тумора = 0,94 - 1,92 недеља

Запремина тумора = 0,21 - 0,45 cm³

Дизајн иновативних антагониста естроген рецептора α базиран на 3-D QSAR студијама генерисаним на основу поравнања поља молекулских интеракција, синтеза новодизајнираних једињења и антиканцерогена активност против рака дојке *in vitro* и *in vivo*

Резултати и дискусија

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Генерисање 3-D-QSAR модела и њихова интерпретација

Тренинг сет (TR) је коришћен за генерисање 3-D QSAR модела [365] помоћу алгоритама имплементираних у 3-D QSAutogrid/R софтвер [367], користећи поравнање молекула према структурама молекулских мета и различите пробне атоме (Додатни материјал I: Табела ДМ2). Прелиминарни 3-D QSAR модели најпре су оптимизовани систематским варијацијама у растојању између тачака просторне решетке позициониране у центру масе претходно преклопљених једињења (Додатни материјал I: Табеле ДМ3-ДМ9). Затим су најробуснији модели били подвргнути процедури VPO пред-третмана са циљем оптимизације вредности енергија које су формирале поља молекулских интеракција (Додатни материјал I: Табеле ДМ10-ДМ16), не би ли се (i) добила оптимална подешавања за максималне и минималне вредности стерних, електростатичких и енергија водоничних веза (енг. CutOff); (ii) извршило нулирање ниских вредности енергија (енг. Zeroing); (iii) сачувале вредности енергија са минималном стандардном девијацијом (енг. MinStd). Финални 3-D QSAR модели (Додатни материјал I: Табеле ДМ17- ДМ23, Слике 3.1-3.3, Додатни материјал I: Слике ДМ1-ДМ35), добијени су оптимизацијом преосталих вредности енергија унутар поља молекулске интеракције применом алгорита симулираног хлађења (енг. simulated annealing, SA) [365]. Током процеса, робусност модела (Додатни материјал I: Табеле ДМ24-ДМ37) интерно је валидирана применом процеса унакрсне валидације (енг. cross-validation, CV), насумичним избацавањем једног (енг. leave-one-out, LOO) или више (енг. leave-some-out, LSO) једињења из TR (Слика 3.1 и Додатни материјал I: Слике ДМ1 и ДМ2) [367] док је одсуство случајне корелације између Y матрице која је садржала вредности биолошких активности једињења унутар TR и X матрице која је садржала вредности енергија поља молекулских интеракција потврђен применом Y-мешања (енг. Y-scrambling, Y-S) [365]. Графичка анализа [365] најбољих 3-D QSAR модела извршена је помоћу програма UCSF Chimera [325] читавањем фајлова Gaussian-ског типа у cube формату. Модели оптимизовани након елиминације сувишних вредности енергија поља молекулских интеракција SA алгоритмом квантификовани су оптималним високим вредностима статистички значајних коефицијената добијених из HD, OA, N и e пробних атома, имајући вредности коефицијената унакрсне корелације q^2 у интервалу од 0,530 до 0,831 (Табела 3.1).

Резултати и дискусија

Табела 3.1. Статистички параметри и коефицијенти генерисаних 3-D QSAutogrid/R модела добијених након оптимизације вредности варијабли применом методе симулираног хлађења.

Модел	Проба	R^a	PC ^b	r^{2B}	$q^2_{LOO}^c$	$q^2_{LSO}^d$	$r^2_{YS}^h$	$q^2_{YS LOO}^e$	$q^2_{YS LSO}^*$
11	HD	1,6	5	0,987	0,875	0,831	0,751	-0,271	-0,294
12	OA	1,9	4	0,976	0,752	0,530	0,514	-0,213	-0,276
13	N	1,9	5	0,984	0,877	0,831	0,826	-0,241	-0,267
14	е	1,7	5	0,978	0,812	0,767	0,682	-0,215	-0,282

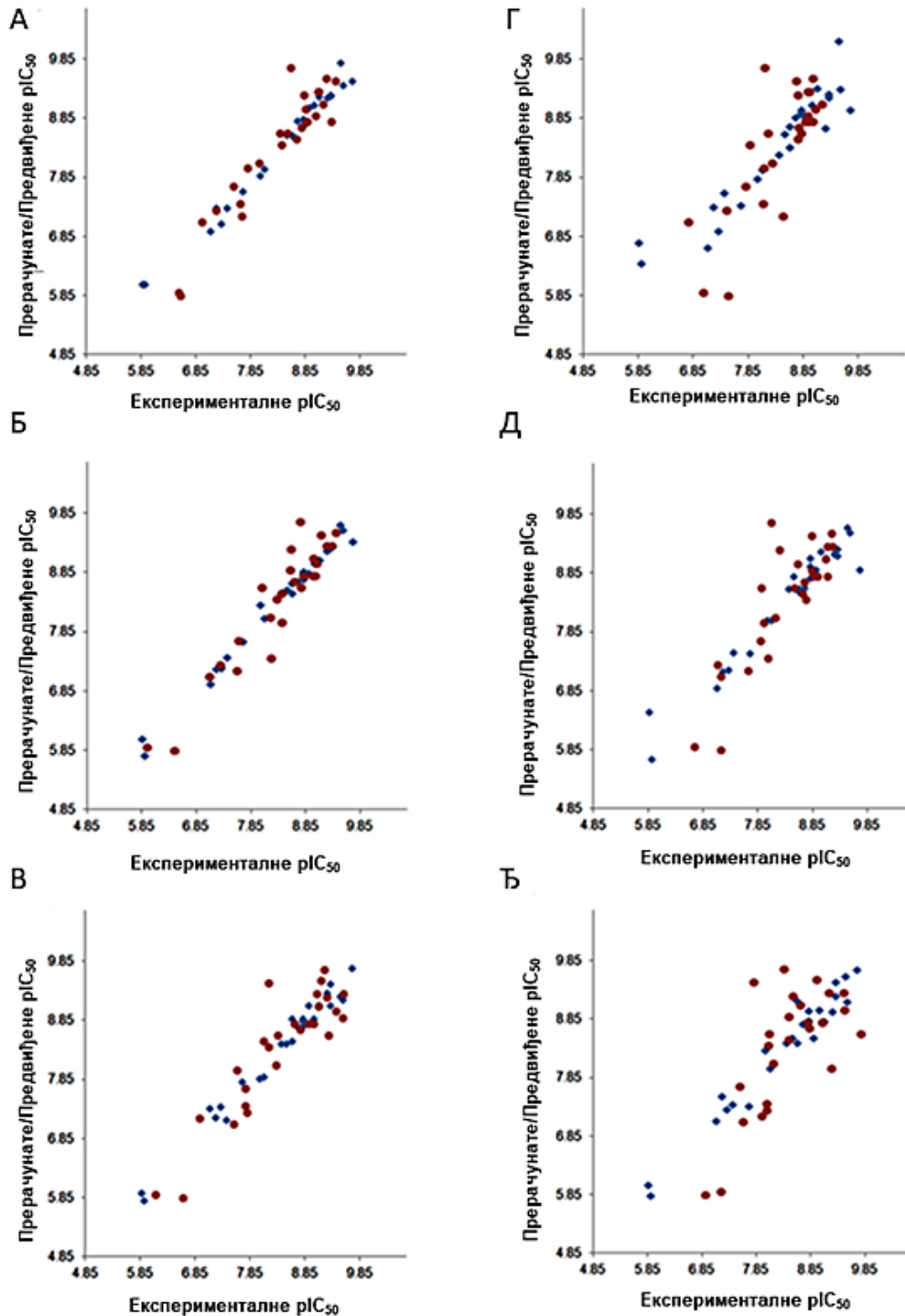
^aОптимално растојање између тачака просторне решетке. ^bОптималан број главних компоненти/латентних варијабли. ^cКонвенционални квадратни коефицијент корелације. ^dКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out методе. ^eКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out методе насумичним избацивањем пет једињења. ^hПросечна вредност конвенционалног квадратног коефицијента корелације добијен након Y-мешања. ^eПросечни коефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out приступа и Y-мешањем. ^{*}Просечни коефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out методе са насумичним избацивањем 5 једињења и Y-мешањем.

Интерпретација дефинисаних модела спроведена је путем *PLS-коефицијената* ($P_{PLS-коефицијенти}$) и мапа стварних доприноса активности за свако једињење понаособ (енг. ligand-associated *Actual Activity Contribution* maps, L_{AAC} мапе) (Слике 3.2, 3.3 и Додатни материјал 1, Слике ДМ3-ДМ35) генерисаних из модела проистеклог из N пробе, као статистички најзначајнијег. Према потреби, мапе проистекле из N пробе упоређиване су са $P_{PLS-коефицијентима}$ и L_{AAC} мапама других проба и коришћење у дискусији (види даљу дискусију).

Редефинисање разумевања интеракција унутар LBD на основу 3-D QSAR мапа

Традиционално [66-68], активни центар ER α за везивање парцијалних агониста, мешовитих агониста/антагониста и потпуних антагониста формиран је од стране неколико α -хеликса који у терцијарној структури креирају централну трослојну сендвичасту формацију сачињену од H5/6, H9 и H10, која је позиционирана између два додатна слоја хеликса сачињених од H1-4, H7, H8 и H11. Унутар овакве терцијарне структуре формира се хидрофобни џеп у облику клина (енг. wedge-shaped) у коме долази до интеракције са лигандима. Остали елементи секундарне структуре у виду дволанчаних антипаралелних β -набора (S1 и S2), заједно са хеликсом H12, окружују главни трослојни мотив. У оквиру ове сложене тродимензионалне структуре јављају се бројне мутације [308], међу којима су најчешће C381S (H5), C417S (структура насумице увијања између H6 и H7), C530S (H11), L536S, и Y537S (H12), за које је показано да нису узрочници хемијске резистенције на активност парцијалних агониста,

антагониста ко-активатора/ко-репресора [75,88,90].



Слика 3.1. Експерименталне наспрам прерачунатих (плавни квадрати) и предвиђених (црвени кругови) pIC₅₀ вредности добијене након унакрсне валидације LOO приступом за модел генерисан из N пробе на PC5 (А); LOO приступом за модел генерисан из HD пробе PC5 (Б); LSO приступом за модел генерисан из e пробе на PC5 (В); LSO приступом за модел генерисан из N пробе на PC5 (Г); LSO приступом за модел генерисан из HD пробе на PC5 (Д); LSO приступом за модел генерисан из e пробе на PC5 (Ђ).

Резултати и дискусија

Литературни наводи указују да мутације C381S, C417S, C530S не узрокују промене у трансактивацији изазваној хормоналним деловањем естрогених хормона, док мутација C530S мења субцелуларну локализацију рецептора [308]; интеракција мутиране аминокиселине H12 L536S са H3 Glu380 стабилизује два хеликса у којима су поменуте аминокиселине лоциране, док мутирана аминокиселина Y537S стабилизује сâм H12, истовремено олакшавајући ко-кристализацију рецептора са парцијалним агонистима [308]. Анализа овде генерисаних 3-D QSAR модела ипак сугерише да је неопходно поново размотрити и редефинисати традиционални начин карактеризације LBD [66-68]. Тако, према оријентацији и интерпретацији P_{PLS} -кофицијената и L_{AAC} мапа проистеклих из N пробе, LBD се може поделити у три главна региона: R1, R2, и R3.

ER α LBD R1: Формирање водоничних веза и електростатичких интеракција

R1 је врста под-домена формирана позиционирањем H3 и H6 унутар терцијарне структуре, који представља регион везивања са „кљештастим” (енг. ‘pincer-like’) просторним распоредом и где аминокиселине H3 Glu353 и H6 Arg394 могу да формирају водоничне везе (енг. hydrogen bonds, HBs) и да као акцептори или донори водоничних веза остваре интеракцију са фенолном функционалном групом често присутном у структури једињења која су формирала TR. Заиста, сва једињења из тренинг сета, осим **1R5K** (Табела 2.1, Додатни материјал I: Сlike ДМ4Г, ДМ9Г, ДМ14Г, ДМ19Г, ДМ24Г, ДМ30Г и ДМ34Г) садрже ароматичну хидроксилну групу. Овако дефинисан, поменути фенолни остатак може се сматрати првим главним фармакофорним мотивом неопходним за испољавање биолошке активности ER α (у даљем тексту биће обележен као **1. Ph-OH**). Модел генерисан из N пробе са великом прецизношћу интерпретирао је потенцијал грађења водоничне везе ралоксифена (**Ral**, **1ERR**) са H3 Glu353 и H6 Arg394 [73], најпотентнијег антагониста ER α унутар тренинг сета (Табела 2.1, Слика 3.2А), позиционирањем позитивних N_{PLS} -кофицијената/**1ERR**_{AAC} мапа у односу на карбонилну групу бочног ланца H3 Glu353. Исти регион унутар активног центра такође је заузео и (E)-4-(4-фенилхекс-3-ен-3-ил)фенол у структури лиганда пронађеног у кристалној структури са ознаком **3ERD** (Табела 2.1, Слика 3.2Б), другог по потентности једињења унутар тренинг сета. Даља инспекција генерисаних N_{PLS} -кофицијената/**1ERR**_{AAC} полиедара показала је да је генерисани 3-D QSAR модел правилно препознао и формирање интер-молекулске водоничне везе са гуанидо функцијом H6 Arg394. Анализа P_{PLS} -кофицијената и L_{AAC} мапа за **1ERR** и **3ERD** генерисаних из HD, OA, NA и e пробе, потврдила је сазнања проистекла из

Докторска дисертација Незрине Куртановић

интерпетације модела проистеклих из N пробе а како би се избегла понављања у интерпетацији, таква додатна сазнања у главном тексту нису додатно описана (Додатни материјал I: Сlike ДМ16А и ДМ16Б, ДМ21А и ДМ21Б, ДМ26А и ДМ26Б, односно ДМ31А и ДМ31Б, респективно). Потврда да је необично важно да једињење које окупира активни центар естроген рецептора α поседује фармакофорне особине да награди горе описане водоничне везе пронађена је након анализе интеракција пронађеног у комплексу са кодом **1ERE** (Табела 2.1 и Слика 3.2Г), односно **E₂**, који поред доказане агонистичке ативност показује и особине парцијалног агониста [73]. Занимљиво је да је **1ERE** успоставио и трећу водоничну везу, овога пута са молекулом воде заробљеним у LBD након ко-кристализације [73], а која је описана паром негативних $N_{PLS-коэффицијената}/1ERE_{AAC}$ мапа.

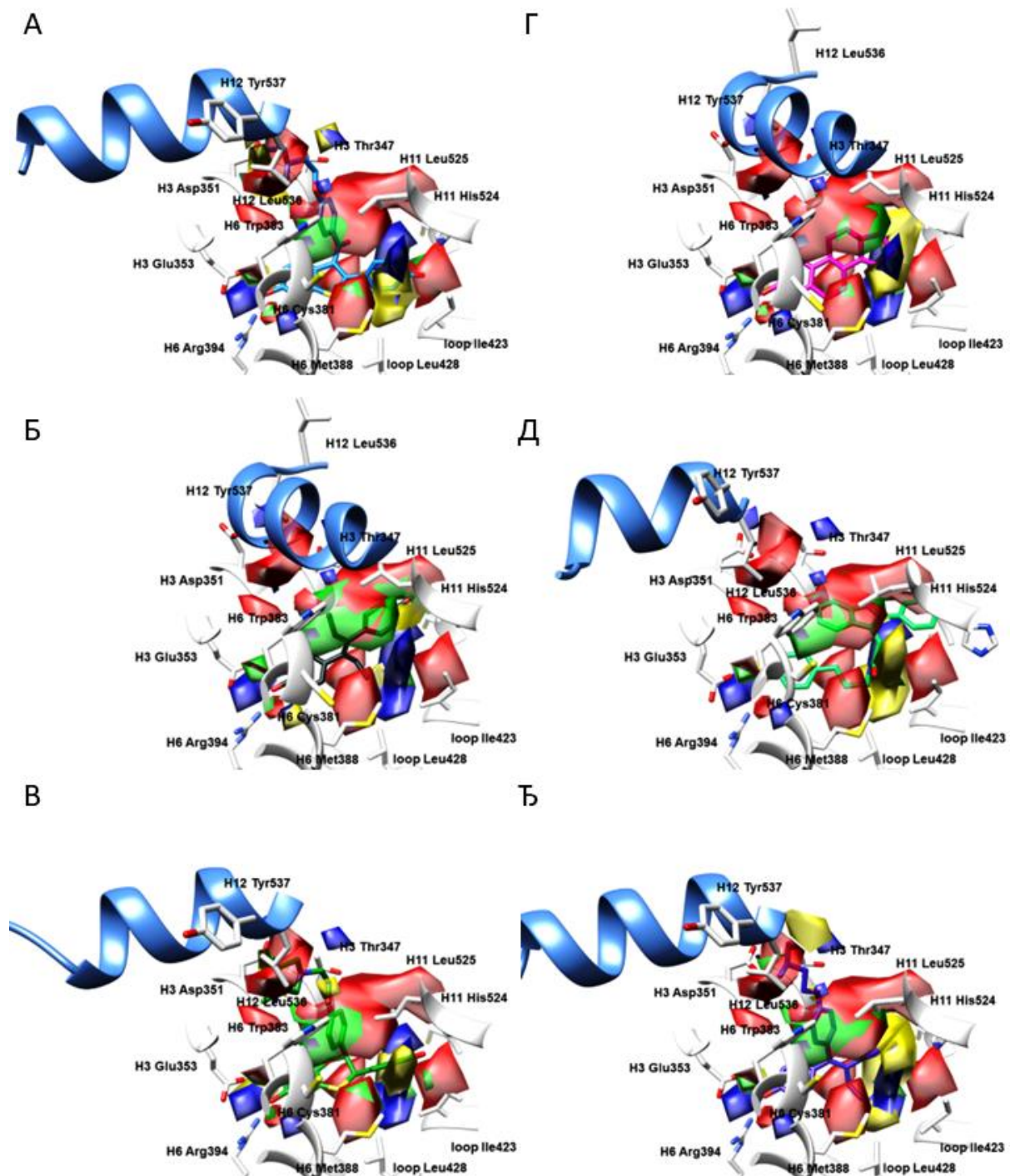
Међутим, нису сви антагонисти припадници TR наградили водоничне везе унутар R1. Тако на пример, код лиганата пронађених унутар **2IOK** комплекса (Табела 2.1 и Слика 3.2Д) односно унутар **2IOG** комплекса (Табела 2.1 и Слика 3.3В) горе описана фенолна функционална група била је ротирана за око 20° у односу на Н3 Glu35, заузимајући просторну геометрију која је спречила било какво стварање водоничних веза [83], што је потврђено и одсуством одговарајућих позитивних или негативних $ND_{PLS-коэффицијената}/2IOK_{AAC}$ мапа (Додатни материјал I: Слика ДМ16Д). Као што је претходно наведено, модел је такође препознао недостатак склоности лиганда **1R5K** ка формирању горе описаних водоничних веза, што је и назначено анализом одговарајућих **1R5K_{AAC}** мапа (Табела 2.1, Додатни материјал I: Сlike ДМ4Г, ДМ9Г, ДМ14Г, ДМ19Г, ДМ24Г, ДМ29Г и ДМ34Г, тим редоследом) [74].

ER α LBD R2: Формирање водоничних веза и електростатичких интеракција

R2 представља област оивичену хеликсима Н6 и Н11, затим структуром насумичног увијања која повезује хеликсе Н6 и Н7 (у даљем тексту Н6-насумично увијање-Н7) и дволанчаним антипаралелним β -набором (S1 и S2). Једињења која су остварила интеракције са R2, **1ERR**, **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **2R6Y**, **1XP9**, **1XPC**, **2R6W**, **1X7R**, **2QA8**, **2QA6**, **1X7E**, и **1GWQ** (Табеле 2.1 и 2.2), успоставила су интеракције са Н11 His524 и то преко другог фенолног статка (**2. Ph-OH** као фармакофорна особина). Аминокиселина Н11 His524 има улогу затварања LBD након отварања интеракције са лигандом формирајући електростатичке интеракције са структуром насумичног увијања која повезује хеликсе Н7 и Н8, што заузврат резултира дестабилизирајућим

Резултати и дискусија

интеракцијама између хеликса Н11 и Н12 [74].



Слика 3.2. Мапе *PLS-коэффицијента* (позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса (*AAC*) активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) добијени из модела *N* пробе за **1ERR** (A); **3ERD** (B); **1XP1** (B); **1ERE** (Г); **2IOK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са *SERM* односно *SERD* фармакологијом.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Директна интеракција било агониста или парцијалног агониста/антагониста са Н11 His524 сходно томе узрокује да Н12 заузме затворену односно отворену конформацију, респективно [74]. Сâме интеракције **2. Ph-OH** са Н11 His524 окарактерисане су присуством позитивних $N_{PLS-коэффицијената}/L_{AAC}$ мапа (Слике 3.2А и 3.2В, Додатни материјал I: Слике ДМ3А, ДМ3Б, ДМ3Б, ДМ3Г, ДМ4А, ДМ4Б, Слике 3.3Г, ДМ4В, ДМ5А, ДМ5Г и Слика 3.3Ћ), као и мапама проистеклим из HD, OA, NA и е проба (Додатни материјал I: Слике ДМ16-ДМ20, ДМ21-ДМ25, ДМ26-ДМ30 и ДМ31-ДМ35, респективно) и биле су од великог значаја за испољавање биолошког потенцијала антагониста унутар тренинг сета. Ипак, хемијска природа сâмих интеракција са Н11 His524 била је контроверзна. Иако су 3-D QSAR мапе сугерисале да би формирање водоничне везе између **2. Ph-OH** и Н11 His524 било корисно за испољавање високог биолошког потенцијала, у литератури је таква интеракција нотирана само за **1ERR** [73]. Насупрот овоме, детаљна анализа комплекса **1ERR** помоћу Ligand Interaction алата доступног у оквиру PDB (<https://www.rcsb.org/3d-view/1ERR?preset=ligandInteraction&sele=RAL>) открила је да не постоји водонична веза формирана између **1ERR** и Н11 His524.

Штавише, у оквиру комплекса **1XP1**, **1XP6** и **1XP9**, **2. Ph-OH** успоставила је чак водоничну везу са карбонилном групом пептидне везе Н11 Gly521-Н11 Met522, што је вероватно допринело и дестабилизацији Н11/Н12. Међутим, према литературним подацима, формирање водоничне везе **2. Ph-OH** из **1ERR** и Н11 His524 недвосмислено је довело до испољавања највишег могућег биопотенцијала за разматрано једињење. Сходно томе, као и унутар R1, **2. Ph-OH** фармакофорна особина способна да успостави водоничну везу са Н12 His524, требало би да представља други фармакофорни мотив неопходан у структури ефикасног антагониста ER α .

Што се тиче **1ERE**, формирање водоничне везе са Н11 His524 такође је обзнањено само у литератури [73]. Постојећа 17 β -OH група која се налази у D-прстену естрадиола и која представља аналог **2. Ph-OH** у кристалној структури била је дислоцирана више од 5 Å у односу на **2. Ph-OH** фармакофорни мотив унутар **1ERE** [73]. Ипак, присуство негативних $N_{PLS-коэффицијената}/1ERE_{AAC}$, $HD_{PLS-коэффицијената}/1ERE_{AAC}$, $OA_{PLS-коэффицијената}/1ERE_{AAC}$ и $NA_{PLS-коэффицијената}/1ERE_{AAC}$ мапа, као и позитивних и негативних $e_{PLS-коэффицијената}/1ERE_{AAC}$ мапа (Додатни материјал I: Слике ДМ16Г, ДМ21Г, ДМ26Г и ДМ31Г, респективно) потврдило је интеракцију 17 β -OH групе са Н11 His524 као бенефитну. Међутим, остваривање интеракција парцијалног агониста стероидног

Резултати и дискусија

типа са ознаком **2B1Z** унутар лиганд-везивног домена (Табела 2.2, Додатни материјал I: Слика ДМ5В) проузроковало је конформациону промену на нивоу Н11 His524 у смислу дислоцирања из LBD, највероватније због присуства Y537S мутације, те последични губитак водоничне везе са 17β-ОН групом **2B1Z** [87]. Ипак, уостављене су електростатичке интеракције окарактерисане негативним $N_{PLS-коэффицијентима}/2B1Z_{AAC}$ мапама, односно негативним $e_{PLS-коэффицијентима}/2B1Z_{AAC}$ мапама (Додатни материјал I: Слика ДМ5В и ДМ35В) са довољном снагом да одрже високу потентност једињења. Интересантно, једињење пронађено унутар **1GWQ** комплекса (Табела 2.1, Слика 3.3Б), које представља молекулску симплификацију једињења ко-кристализованих унутар **1ERR**, **2R6Y** и **2R6W** комплекса у виду 2-(4-хидроксифенил)бензо[*b*]тиофен-6-ол костура, није у потпуности испунило LDB, иако поседује **2. Ph-ОН** фармакофорну особину. Тако је биоактивна конформација **1GWQ** била ротирана хоризонтално у односу на **1ERR**, а све као последица немогућности једињења да оствари све неопходне интеракције са лиганд-везивним доменом, чиме би могла да се објасни ниска биоактивност овог једињења.

Међу једињењима која су чинила тренинг сет, неке друге угљеничне структуре попут 3-фенил-7-хидроксикумарина (**5AK2**, Табела 2.2), генистеина (**1X7R**, Табела 2.1, односно **2QA8**, Табела 2.2; респективно), 4-(6-хидрокси-1*H*-индазол-3-ил)бензен-1,3-диола (**2QA6**, Табела 2.2) и 2-фенил-1,2,3,4-тетрахидроизохинолин-6-ола (**1XQC** и **1UOM**, Табеле 2.1 и 2.2, респективно) испољиле су током интеракције са Н11 His524 фармакофорне особине које би одговарале онима у **2. Ph-ОН**: пронађено је да антагонист **5AK2** остварује интеракције са својим душло мутираним рецептором и то са мутираним аминокиселинама Н6 С381S и С417S (интегралној аминокиселини унутар насумице увијања између хеликса Н6 и Н7), указујући на то да мутације немају умањујући утицај на активност антагониста (видети даљу дискусију) [75]. Унутар **5AK2**, С7-ОН група као интегрални део природног ароматног једињења умбелиферона, који је и чинио основно језгро антагониста у разматрању, била је оријентисана ка формирању водоничних веза са Н3 Glu353 и Н6 Arg394, што је потврђено присуством парова негативних и позитивних $N_{PLS-коэффицијентима}/5AK2_{AAC}$ мапа (Слика 3.3Б). Ипак, присуство *m*-F супституисаног ароматичног прстена на положају С3 кумаринског језгра, окренутог према Н11 His524, могло би делимично објаснити нижи антагонистички потенцијал **5AK2** (Табела 2.2). Упркос наизглед повољном поравнању $N_{PLS-коэффицијентима}/5AK2_{AAC}$ изоконтуре, атом флора, а у сагласности са

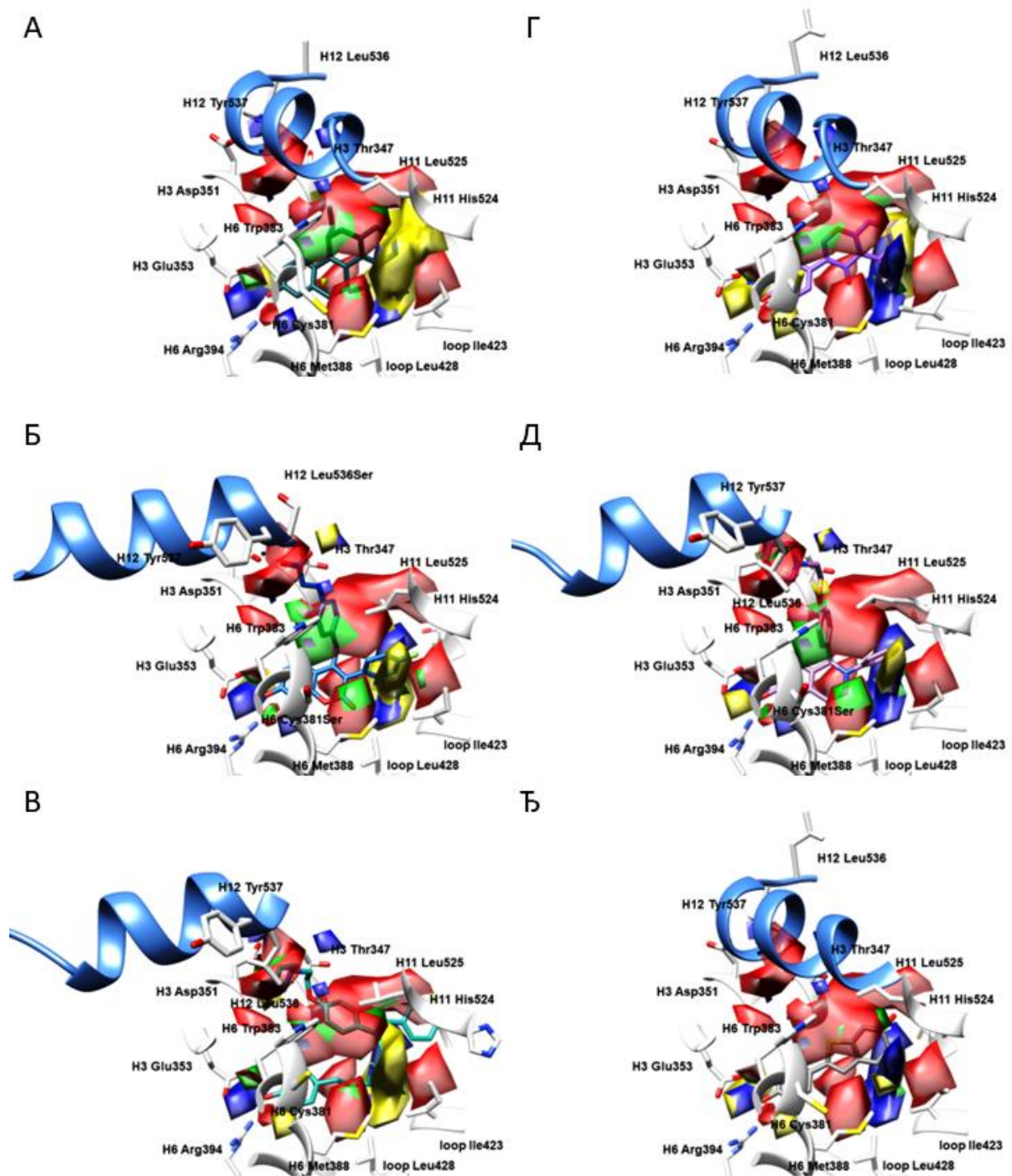
Докторска дисертација Незрине Куртановић

експерименталним подацима [75], некако је спречио формирање водоничне везе са Н11 His524. Стога би биоизостерна замена *m*-F функционалне групе са *m*-OH/*m*-NH₂ потенцијално водила ка дизајну још потентнијих антагониста ER α . Са друге стране, недостатак **2. Ph-OH** фармакофорног мотива у структурама **1XQC** и **1UOM** (Табеле 2.1 и 2.2, Додатни материјал I: Слика ДМ5Б, Слика 3.3Д) утицао је на смањење биоактивности ових једињења на вредности испод 8 pIC₅₀ јединица. Прстен изофлавоноа генистеина (**1X7R**, Табела 2.1, Слика 3.3Г; **2QA8**, Табела 2.2, Додатни материјал I: Слика ДМ4В) свакако би требало избегавати у будућем дизајну антагониста ER α , обзиром на селективност према ER β .

ER α LBD R2: Хидрофобне интеракције

У оквиру овог региона, хеликси Н6 и Н7 као и структура насумице увијања између Н6 и Н7 били су одговорни за успостављање хидрофобних интеракција са лигандима. У том смислу, фрагмент 2-фенил-1-бензотиофена унутар 2-(4-хидроксифенил)бензо[*b*]тиофен-6-олског језгра једињења са ознакама **1ERR**, **2R6Y** и **2R6W**, а посебно атом сумпора унутар 2,3-дихидротиофена, остварио је повољне интеракције са Н6 Met388 и Н6 Leu391, што је и индицирано позитивним N_{PLS} -коэффицијентима/**1ERR**_{AAC}/**2R6Y**_{AAC}/**2R6W**_{AAC} мапама (Табела 2.1, Слика 3.2А, Додатни материјал I: Сlike ДМ3В и ДМ4Б, респективно). Штавише, 2,3-дихидротиофен такође је учествовао и у π - π интеракцијама са Phe404, као интегралним конституентом структуре насумице увијања између хеликса Н6 и Н7. Мутације унутар R2 области, попут Н6 С381S и С417S (као интегралним конституентом структуре насумице увијања између хеликса Н6 и Н7) пронађене у **2R6Y** и **2R6W** комплексима, нису имале велики утицај на активност лиганда ко-кристализованих у истим, што је било у складу са 3-D QSAR моделом а у супротности са експериментално добијеним подацима [89], иако је близина језгра 2-(4-хидроксифенил)бензо[*b*]тиофен-6-ол у односу на Н6 С381S могла указати на извесне разлике у свеобухватним лиганд/рецептор интеракцијама. Фармакофорни мотив **2. Ph-OH** унутар 2-(4-хидроксифенил)бензо[*b*]тиофен-6-олског језгра допринео је повољно и са аспекта стерних интеракција, приближавајући се аминокиселина Пе424, Phe425, и Leu428 које су се налазиле унутар структуре насумице увијања између хеликса Н6 и Н7, што је откривено анализом N_{PLS} -коэффицијента/**1ERR**_{AAC}/**2R6Y**_{AAC}/**2R6W**_{AAC} мапа и одговарајућим изоконтурима проистеклим из А и С проба (Додатни материјал I: Сlike ДМ6А, ДМ11А, ДМ8В, ДМ13В, ДМ9Б и ДМ14Б, респективно).

Резултати и дискусија



Слика 3.3. Мапе *PLS-кофицијента* (позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса (AAC) активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) добијени из модела N пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Инкорпорација хетероцикала који садрже сумпор унутар 4-[(3*S*)-1,4-оксатин-3-ил]фенолне функционалне групе пронађене у једињењима са ознакама **1XP1**, **1XP6**,

Докторска дисертација Незрине Куртановић

1SJ0, **1XP9** и **1XPC** (Табела 2.1) водила је ка незнатном смањеном биопотенцијалу ових SERM једињења: **1XP1** и **1XP6** су били међу најпотентнијим антагонистима ER α (3. и 4. по реду) док су **1SJ0**, **1XP9** и **1XPC** испољили биоактивност већу од 8,7 pIC₅₀ јединица. На основу горе наведеног запажања, **1. Ph-OH** и **2. Ph-OH** фармакофорна особина требало би да су међусобно повезане петочланим или шесточланим хетероциклом (**C5(6)-хетероцикл**), односно структурним фрагментом који се може сматрати трећом главном фармакофорном особином. Тако, хетероциклични атоми сумпора у структурама **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **1XP9** и **1XPC** били су у лиганд-везивном домену преклопљени са позитивним N_{PLS} -коэффициентима/**1XP1**_{AAC}/**1XP6**_{AAC}/**1SJ0**_{AAC}/**1XP9**_{AAC}/**1XPC**_{AAC} изоконтурама (Слика 3.2В, Додатни материјал I: Сlike ДМ3А, ДМ3Б, ДМ3Г и ДМ4А, респективно), указујући на њихове повољне интеракције са Н6 Met388. Надаље, детаљна анализа позитивних ND_{PLS} -коэффициентата и одговарајућих **1XP1**_{AAC}/**1XP6**_{AAC}/**1SJ0**_{AAC}/**1XP9**_{AAC}/**1XPC**_{AAC} мапа (Додатни материјал I: Сlike ДМ16В, ДМ18А, ДМ18Б, ДМ18Г и ДМ19А) чак је сугерисала и могуће грађење водоничне везе између атома сумпора и поменуте аминокиселине, али то није потврђено експерименталним структурним студијама [79,80]. Надаље, биоизостерна замена атома сумпора (**1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **1XP9** и **1XPC**) са метиленском функционалном групом (**1YIM** и **1YIN**, Табела 2.1), довела је до незнатног смањења активности, нарочито у случају када је метиленски фрагмент додатно супституисан метил групом. Упркос постојању поравнања позитивних N_{PLS} -коэффициентата/**1YIN**_{AAC}/**1YIM**_{AAC} мапа (Додатни материјал I: Сlike ДМ3Д и ДМ3Ђ), мало повећање стерног притиска са биоизостерном променом од S ка CH₃-CH-функционалној групи у односу на Н6 Met388 није био у потпуности толерисано.

Увођење било које алифатичне функције према хеликсима Н6 и Н7, односно структури насумице увијања између хеликса Н6 и Н7 било је тешко прихваћено од стране лиганд-везивног домена, што хе доказано преклапањем позитивних e_{PLS} -коэффициентата и негативних **1YIN**_{AAC} мапа добијених из е пробе преко *o*-F атома једињења **1YIN** и Н6 Met388, указујући на репулзивне јон-диполне интеракције (Додатни материјал I: Сlike ДМ33Д и ДМ33Ђ). Слично сазнање могло се применити и на **3ERD** (Табела 2.1: Слика 3.2Б), односно тетраhydroхризески дериват **1L2I** (Табела 2.2, Слика 3.3А), једињења која су испољила парцијални агонизам према ER α али су били потпуни агонисти према ER β . Лиганд са ознаком **3ERD** (Слика 3.2Б) остварио је компактну биоактивну конформацију у односу на Н6 захваљујући једној од својих

Резултати и дискусија

двају *trans*-етил група, успостављајући неполарне интеракције са Н3 Ala350 и Н6 Leu384, односно са R-остацима аминокиселина Phe404 и Leu428 које припадају структури насумице увијања између хеликса Н6 и Н7, респективно (упоредити преклапања $N_{PLS-коэффицијента}$ и **3ERD**_{AAC} мапа на Слици 3.2Б). Поменути етил група **3ERD** није чак ни била осетљива на мутације Н6 C381S и C417S (унутар структуре насумице увијања између хеликса Н6 и Н7) (**2B1Z** комплекс, Додатни материјал I: Слика ДМ5В). Што се тиче једињења **1L2I**, пројекције $N_{PLS-коэффицијента}/1L2I$ _{AAC} (Слика 3.3А) суптилно су указале на хидрофобни утицај етил групе на терминалну метил групу Н6 Met388 и бочни ланац аминокиселине Ile424 из структуре насумице увијања између хеликса Н6 и Н7; такве интеракције нису виђене код аналога са ознаком **1ERE**. Ипак, и поред повољних индикација добијених из мапа проистеклих из А и С проба (Додатни материјал I: Сlike ДМ6Б и ДМ7А, ДМ12Б, и ДМ12А, респективно) синтони који носе *trans*-етил групу са способношћу интеракције са Н6 нису погодни у процесу дизајна антагониста ER α јер њено присуство води ка парцијалном агонизму. Преферирана интеракција са Н6 Met388 јесте заправо електростатичка и то она коју је, у складу са преклапањем позитивних $N_{PLS-коэффицијента}/5AK2$ _{AAC} полиедара, остварио са Н6 лактонски карбонил кумарина (Слика 3.3Б).

ER α LBD R3: Свеобухватни значај R3

Област R3 оивичена је хеликсима Н3, Н11 и Н12 и од великог је значаја јер је њена улога да изврши диференцијацију између парцијалних агониста и антагониста. Са приступном запремином од 450 Å³, скоро дупло већом од оне коју формирају спојени региони R1 и R2 (245 Å³), регион R3 представља велику неокупирану просторну шупљину, која је једнако присутна чак и након везивања парцијалних агониста и агониста. Просторно је R3 подељен од стране аминокиселине Н3 Thr347 на доњи део, окружен регионима R1 и R2, и горњи део, чију границу представља Н12 те је таква просторна расподела употребљена и у даљој дискусији. Аминокиселина Н3 Thr347 нарочито је значајна јер ступа у интеракцију са Н11 Leu525 и Н12 Leu536 да би одржала LBD у тзв. затвореној конформацији, због чега AF-2 остаје стабилна и стичу се услови за везивање ко-активатора [73]. Са тачке гледишта дизајна лекова, иновативни антагонист ER α који је у стању да у потпуности окупира R3 морао би да интерферира са Н3 Thr347, што би водило до промене положаја Н12 и спречавању везивања ко-активатора [73].

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Доњи део региона R3 унутар лиганд-везивног домена ER α : Хидрофобне интеракције.

Анализа 3-D QSAR модела добијеног из N пробе дала је извесне назнаке о структурним мотивима помоћу којих је могуће разликовање антагониста од парцијалних агониста. Према моделу, регион R3 требао би да буде окупиран супституентима главних језгара антагониста попут C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала пронађених у структурама једињења **1ERR**, **2R6W** и **2R6Y** (Табеле 2.1 и 2.2 Слика 3.2А, Додатни материјал I: Сlike ДМ4Б и ДМ3В, респективно) или Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала какви су се могли видети у структурама једињења **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **1XP9**, **1YIM**, **1YIN**, и **1XPC** (Табеле 2.1 и 2.2, Слика 3.2В, Додатни материјал I: Сlike ДМ3А, ДМ3Б, ДМ3Г и ДМ4А, респективно). С тим у вези, у складу са позитивним $N_{PLS-коэффициентима}/L_{AAC}$ мапама, сваки од супституентима главних језгара антагониста остварио је повољне стерне интеракције са Н6 Trp383 и Н12 Leu536 преко централног бензеновог прстена унутар бочног ланца, што је такође потврђено и позитивним $A_{PLS-коэффициентима}/L_{AAC}$ мапама и $C_{PLS-коэффициентима}/L_{AAC}$ изоконтурима за једињења **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **1XP9**, **1YIM**, **1YIN**, и **1XPC** (Додатни материјал I: Сlike ДМ6В и ДМ11В, ДМ8А и ДМ13А, ДМ8Б и ДМ13Б, ДМ8Г и ДМ13Г, ДМ8Д и ДМ13Д, ДМ8Ђ и ДМ13Ф, ДМ9А и ДМ14А респективно). Централни бензенов прстен, надаље означен са **Ph**, било као конституент 2-(4-хидроксифенил)бензо[*b*]тиофен-6-ола на положају Δ^9 **1ERR**, **2R6W** и **2R6Y** (Табеле 2.1 и 2.2) или као функционална група унутар ((3*S*)-3-(4-хидроксифенил)-2,3-дихидробензо[*b*][1,4]оксатин-6-ола везаног на положају C9 **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **1XP9**, **1YIM**, **1YIN** и **1XPC** (Табеле 2.1 и 2.2), био је позициониран у средини LBD, олакшавајући ротацију Н12 Leu536 према унутрашњости LBD и требало би га посматрати као четврти главни фармакофорни мотив у структури антагониста ER α . Благе структурне модификације Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикла, попут оних у структури Ph-O-(CH₂)₂-N⁺R₁R₂ пронађеној код једињења **2BJ4** (Табела 2.1) или унутар фрагмента Ph-O-*trans*-CH=CH-COOH, какав је био карактеристика **5AK2** (Табела 2.2), нису промениле допринос **Ph** на антагонистичку активност, што је потврђено позитивним $N_{PLS-коэффициентима}/2BJ4_{AAC}$ мапама и $N_{PLS-коэффициентима}/5AK2_{AAC}$ изоконтурима (Сlike 3.3Ђ и 3.3Б).

Интеракција **Ph** присутног у антагонистима (**1ERR**, **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **2R6Y**, **1XP9**, **1YIM**, **1YIN**, **1XPC**, **2R6W**, **2BJ4**, и **5AK2**) са метил групом бочног ланца Н3 Thr347 условила је да се поменута аминокиселина подвргне индукованом пролагођавању према Н11 Leu25 и Н12 Leu536 [73]. У исто време, хидроксилна група

Резултати и дискусија

бочног ланца Thr347 променила је своју просторну оријентацију ван LBD и то према аминокиселини Н3 Met343 [73]. Слободна енергија ослобођена током управо описане конформационе промене Н3 Thr347 утврдила се за формирање Н3 Thr347-Н11 Leu525-Н12 Leu536 хидрофобне мреже, односно за дислокацију хеликса Н12 као последице формирања хидрофобне мреже [73]. Индуковано прилагођавање Н12 стабилизовано је аминокиселином Н3 Asp351 (видети под-секцију *Горњи део региона R3 унутар лиганд-везивног домена ERα*), што је резултовало смањењем афинитета RNAP II транскрипционе машинерије према самом рецептору. Надаље, према експерименталним подацима, хидрофобна мрежа Н3 Thr347-Н11 Leu525-Н12 Leu536 такође је била стабилизована формирањем додатне Н3 Ala350-**Ph**-Н11 Leu525 мреже, што је индицирано позитивним $N_{PLS-коэффицијентима}/L_{AAC}$ мапама (Слике 3.2А и 3.2В, Додатни материјал I: Слике ДМ3А, ДМ3Б, ДМ3В, ДМ3Г, ДМ3Д, ДМ3Ђ, ДМ4А и ДМ4Б, Слике 3.2Ђ и 3.3Г, респективно).

Способност неког молекула да изазове дислокацију Н12, а самим тим и формирање горе наведених хидрофобних мрежа, стога је повезана са његовим антагонистичким понашањем. Оно што је веома интересно, графичка анализа 3-D QSAR модела генерисаног из N пробе нотирала је Н3 Thr347 као врло важну аминокиселину унутар LBD, с обзиром да она представља „окидачки механизам“ за индуковано прилагођавање Н12. У овом сценарију, једињење које испољава своју активност као антагонист омогућава формирање Н3 Thr347-Н11 Leu525-Н12 Leu536 хидрофобне мреже док парцијални агонисти то не омогућавају (једињења попут **3ERD**, **1ERE** и **1X7R/2QA8** (Табеле 2.1 и 2.2, једињења наведена у опадајућем реду активности). И заиста, друга етил група једињења **3ERD** остварила је интеракцију са Н3 Thr347 сличну оној коју је остварила 18α -CH₃ група једињења **1ERE** (Слика 3.2Г), што ипак није било довољно за адекватну хидрофобну стабилизацију метил групе бочног ланца Н3 Thr347, како је закључено на основу позитивних $N_{PLS-коэффицијената}/3ERD_{AAC}$, $A_{PLS-коэффицијената}/3ERD_{AAC}$, и $C_{PLS-коэффицијената}/3ERD_{AAC}$ мапа (Слика 3.2Б, Додатни материјал I: Слике ДМ6Б и ДМ11Б); како метил група бочног ланца Н3 Thr347 није остварила никакве интеракције са Н12 Leu536, у комплексима парцијалних агониста није дошло до структурне промене у површини AF-2 [73]. С друге стране, супституција поменуте етил групе **3ERD** волуминознијим ароматичним остатком као код **2BJ4** (Табела 2.1, Слика 3.2Ђ), довела је до поремећаја на површини AF-2 [82,84]. Закључак је да супституција **Ph** мање волуминознијом групом, или још специфичније,

Докторска дисертација Незрине Куртановић

потпуно одсуство хидрофобних интеракција са Н3 Thr347, као код **1X7R** и **2QA8** (Слика 3.3Г и Додатни материјал I: Слика ДМ4В), могу бити кључни у диференцијацији парцијалних агониста од антагониста.

Доњи део региона R3 унутар лиганд-везивног домена ER α : Водоничне везе и електростатичке интеракције.

Постојање позитивних $N_{PLS-коэффицијената}/L_{AAS}$ мапа указале су на фармаколошку улогу карбонилне функционалне групе која се налазила унутар C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикла једињења **1ERR**, **2R6W** и **2R6Y** (Табеле 2.1 и 2.2, Слика 3.2 А, Додатни материјал I: Сlike ДМ4Б и ДМ3В) у смислу грађења електростатичких интеракција са Н11 His524 и Н3 Thr347. Резултати анализе одговарајућих 3-D QSAR мапа указале су да карбонилну групу или њене биоизостере треба узети у обзир у будућим рационалном дизајну антагониста ER α .

Додатно, етаноламински мост, инкорпориран у C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикле, Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикле, или сличне структурне обрасце, виђене унутар **1ERR**, **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **2R6Y**, **1XP9**, **1YIM**, **1YIN**, **1XPC** и **2R6W**, био је прекривен плавим $N_{PLS-коэффицијентима}/$ жућим L_{AAS} мапама (Табеле 2.1 и 2.2, Сlike 3.2А и 3.3В, Додатни материјал I: Сlike ДМ3А, ДМ3Б, ДМ3В, ДМ3Г, ДМ3Д, ДМ3Ђ, ДМ4А и ДМ4Б), чиме је дефинисано да постоје одбојне електростатичке интеракције између атома кисеоника етаноламинског моста и -ОН групе бочног ланца Н3 Thr347. На основу анализе $e_{PLS-коэффицијената}/L_{AAS}$ мапа (Додатни материјал I: Сlike ДМ31А, ДМ31В, ДМ33А, ДМ33Б, ДМ33В, ДМ33Г, ДМ33Д, ДМ33Ђ, ДМ34А и ДМ34Б) закључено је да је улога премешћујућег кисеоника била врло важна и да се он може сматрати петим главним фармакоморним мотивом, неопходним у структури ефикасног антагониста ER α , надаље означеним као фармакофорна особина **Оху**. Надаље, **HD/OA** $PLS-коэффицијенту/L_{AAS}$ мапе (Додатни материјал I: Сlike ДМ16А, ДМ16В, ДМ18А, ДМ18Б, ДМ18В, ДМ18Г, ДМ18Д, ДМ18Ђ, ДМ19А и ДМ19Б, респективно) указивале су да **Оху** може да се понаша и као акцептор водоничне везе (енг. hydrogen bonding acceptor, HBA) у односу на Н3 Thr347. Сличне индикације добијене су и након анализе мапа генерисаних из преосталих проба, те је због свеукупне важности аминокиселине Н3 Thr347 фрагмент са **Оху** фармакофорном особином у будућем дизајну увек имплементиран унутар једињења проистеклих током израде ове докторске дисертације.

Резултати и дискусија

Горњи део региона R3 унутар лиганд-везивног домена ERα: Хидрофобне интеракције

Да би утицао на индуковано прилагођавање H12 и његову дислокацију у односу на лиганд-везујући домен антагонист ERα требао би такође да поседује функционалну групу способну да награди водоничне везе са H3 Asp351 [73] (видети под-секцију *Горњи део региона R3 унутар лиганд-везивног домена ERα: Водоничне везе и електростатичке интеракције*). Међу функционалним групама погодним за остваривање наведених интеракција издвојиле су се оне у виду *N*-хетероцикала, интегралних конституената горе наведених C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала и Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала, као што су прстен пиперазина код **1ERR**, **1SJ0**, **1YIN**, **2R6W** и **1UOM** (Слика 3.2А, Додатни материјал I: Сlike ДМ3Б, ДМ3Ђ и ДМ4Б, Слика 3.3Ђ, респективно), прстен (3*R*,4*R*)-3,4-диметилпиролидина у структури **1XP1** (Слика 3.2В), прстен (3*S*,4*S*)-3,4-диметилпиролидина код **1XP6** (Додатни материјал I: Слика ДМ3А), прстен пиролидина виђен код једињења **2R6Y**, **1XP9**, **1YIM** и **1XPC** (Додатни материјал I: Слика ДМ3В, ДМ3Г, ДМ3Д и ДМ4А), прстен 2-фенил-1*H*-индола унутар **2IOK** и **2IOG** (Сlike 3.2Д и 3.3В), односно октахидро-1*H*-пиридо[1,2-а]пиразина као структурна карактеристика **1XQC** (Додатни материјал I: Слика ДМ5Б). Најизраженији биопотенцијал исказали су антагонисти који су у свом саставу садржали прстеневе пиперазина и пиролидина (Табеле 2.1 и 2.2). Својом повећаном дужином и волуминозношћу, C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикли и Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикли изазвали су промену положаја H12 унутар AF-2 функције и спречили везивање ко-активатора унутар геномског индиректног пута. Као последица, није било ангажовања RNAP II транскрипционе машинерије, те није дошло до развоја рака дојке [66,68].

Ипак, у складу са паром позитивних N_{PLS} -коэффицијената и негативних L_{AAC} полиедара, атоми угљеника пиперазина (**1ERR**), (3*R*,4*R*)-3,4-диметилпиролидина (**1XP1**) и (3*S*,4*S*)-3,4-диметилпиролидина (**1XP6**), услед неповољних и одбојних стерних интеракција, стабилизовали су просторни положај H12 истовремено се позиционирајући у близини тзв. унакрсне-секције H12 Leu536-Leu539-Glu542-Met530-Leu540 (односно дела нуклеарног рецептора са секвенцом LLEML). Ближе информације о стерном утицају прстена пиперазина нису добијене из 3-D QSAR мапа проистеклих из А или С проба (Додатни материјал I: Сlike ДМ6А и ДМ11А, ДМ6В и ДМ11В, односно ДМ8А и ДМ13А, те ДМ26В и ДМ28А респективно), али су преклопљени позитивни NA_{PLS} -коэффицијенту/негативне **1ERR**_{AAC} мапе (Додатни материјал I: Слика ДМ26А) указале на то да би смањење интензитета van der Waals интеракција

Докторска дисертација Незрине Куртановић

могло да доведе до лакшег индукованог прилагођавања H12 антагонисту. Овакав резултат сугерисао је да хетероцикли можда и нису најпогоднији носилац атома HBD који би ступио у интеракцију са H3 Asp351.

У сагласности са преклопљеним позитивним $N_{PLS-коэффицијентима}$ и негативним $2R6W_{AAC}/1XP1_{AAC}/1XP6_{AAC}$ пољима, додавање метил супституената у структури широлидина, као код једињења са ознакама **1XP1** и **1XP6** (Слика 3.2В и Додатни материјал I: Слика ДМ3А), или његова биоизостерна промена у пиперазин, као код **2R6W** (Додатни материјал I: Слика ДМ4Б), довело је до негативних стерних судара са H12 Leu536 и H12 Tyr537, што је имало за последицу испољавање значајно мање антагонистичке активности (као код **2R6W**, $1 pK_i$ јединица ниже, Табела 2.2). С друге стране, позиционирање метил групе унутар етаноламинског моста у циљу формирања хиралног (*S*)-метил деривата, као у структури **1XP9**, или (*R*)-енантиомера као код **1XPC**, резултовало је повећањем биопотенцијала. Пораст биопотенцијала био је вероватно последица позитивних стерних интеракција са H12 Leu531, што је доказано преклапањем позитивних $N_{PLS-коэффицијената}/1XP9_{AAC}/1XPC_{AAC}$ изоконтуре (Додатни материјал I: Сlike ДМ3Г и ДМ4А, респективно).

Горњи део региона R3 унутар лиганд-везивног домена ERα: Водоничне везе и електростатичке интеракције.

Као што је предочено поравнањем позитивних $N_{PLS-коэффицијената}/L_{AAC}$ мапа (Сlike 3.2 и 3.3, Додатни материјал I: Сlike ДМ3-ДМ35), сви антагонисти који су садржали позитивно наелектрисани атом азота или сличну HBD биоизотерну функционалну групу унутар фрагмената C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала и Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала (Табеле 2.1 и 2.2), понашали су се као SERMs и наградили су водоничне везе са H3 Asp351, након чега је последично дошло до дислокације H12. Међутим, лиганд-везивни центар естроген рецептора α такође је био расположив и за функционалну групу у виду диметиламиноетанола која је виђена у структури **2BJ4** (Табела 2.1) (односно за редукцију хетероцикала уопште), како је назначено паром црвених $N_{PLS-коэффицијената}/$ зелених **2BJ4**_{AAC} мапа (Слика 3.2Ђ) које су преклопиле терцијарни амин, односно $N_{PLS-коэффицијентима}/2BJ4_{AAC}$ полиедрима који су окруживали H12. Чинило се чак да би и функционалне групе које генерално садрже и HBA и HDB као фармакофорне особине, попут карбоксилне групе (**5AK2**), такође могле престављати активаторе H3 Asp351 (Слика 3.3Б, црвени $N_{PLS-коэффицијентима}/$ зелене **5AK2**_{AAC} мапе као доказ). Без обзира

Резултати и дискусија

на то, интеракција фенилакрилне киселине са H3 Asp351 (односно функционалне групе пронађене у структурама једињења **5AK2** или **1R5K**) довела је до испољавања SERD фармакологије [74,75] јер је поменута функционална група узроковала дестабилизацију ER α након дислокације H12: сâм остатак фенилакрилне киселине нарушио је формирање водоничних веза између H12 Leu536 и H12 Tyr537 (вероватно заједно са још једним молекулом воде) унутар структуре насумице увијања између хеликса H11 и H12; као последица нарушавања поменуте мреже водоничних веза дошло је до помењања H12 даље у односу на H11 што је довело до повећања хидрофобности површине лиганд-везујућег домена унутар терцијарне структуре ER α (аминокиселине H12 Leu536, H12 Leu539, H12 Leu540 и H12 Met543 више нису биле сакривене у хидрофобном језгру), затим смањења стабилности ER α и последичне деградације у протеозомима. Ипак, обзиром на важност обају HBA и HDB фармакофорних особина, **HBX** као особина која би садржала карактеристике обе форме требало би да представља шести и последњи главни фармакофорни мотив у структури ефикасног ефикасног антагониста ER α . У том смислу, претходно изречена констатација да се хетероциклус не мора сматрати најпогоднијим носиоцем HBD атома за интеракцију са H3 Asp351, могла би се, у светлу последњих сазнања, преформулисати на начин да би хетероцикл чак могао и да се задржи ако се супституише одговарајућим **HBX** фармакофорним особинама. Према томе, стерни допринос хетероцикла би се на тај начин задржао, али би његов укупни допринос био оснажен другом функционалном групом способном за интеракцију са H3 Asp351.

Иако су у примарној структури естроген рецептора α уочене мутације D351Y (мутација повезана са естрогенским одговором анти-естрогена, смањеном базалном трансактивацијом, са недостатком промене у естроген-индукованој трансактивацији, односно са естроген-индукованом трансактивацијом услед смањења концентрације протеина 1 одговорног за развој метастаза, енгл. metastasis-associated protein 1, MTA-1) или D351E (мутација повезана са недостатком промене у естроген-индукованој трансактивацији), нису доступни никакви експериментални подаци о антагонистима комплексираним са таквим мутираним рецепторима, због чега је и даље неизвесно какви ће заиста бити структурни ефекти HBA или мешовите HBX функционалне групе на поменуте мутације. Међутим, H12 Y537S мутација пронађена у комплексима са ознаком **2QA8**, **2QA6**, и **2B1Z** (Табела 2.2, Додатни материјал I: Сlike ДМ4В, ДМ5А и ДМ5В) утицала је на формирање водоничних веза између H3 Asp351 и

Докторска дисертација Незрине Куртановић

комплексираних лиганада, што је резултовало ометањем H12 Leu536 ротације и дислокације. Стога су задржавање H12 у затвореној конформацији, односно мутације на нивоу H3 Asp351, односно H12 Y537S и H12 D538G мутације, за које је познато да као изоловане из метастаза резистентних на антихормоне, фактори који имају важну улогу било у преокрету ER α , антиестрогеној активности ER α , или фармакологији естроген-селективних ER модулятора сличној естрогенској.

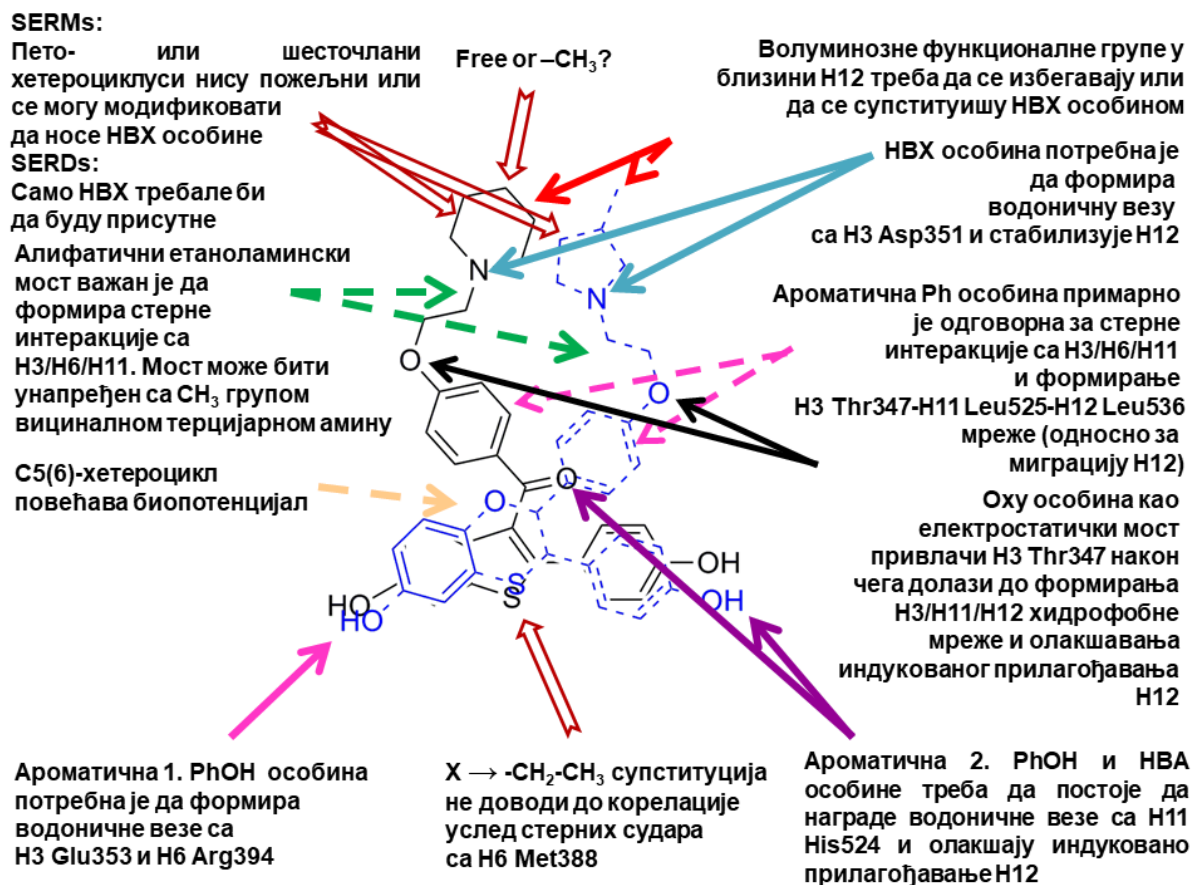
Анализа молекулских детерминанти антагониста ER α након интерпретације 3-D QSAR модела генерисаних 3-D QSAutogrid/R методологијом

Интеракције између лиганада и рецептора интерпретиране помоћу претходно описаних 3-D QSAR мапа, које су биле повољне или неповољне за биоактивност потпуних антагониста и парцијалних агониста ER α , могу се сумирати у генерални модел зависности активности од структуре (енг. structure-activity relationships, SAR) [336], шематски приказан на нивоу лиганада означених са **1ERR** и **1XP1** као темплата (Слика 3.4). Како је у претходном делу излагања описано, свих шест фармакофорних карактеристика (**1. PhOH**, **2. PhOH**, **C5(6)-Хетероцикл**, **Ph**, **Oxy** и **HBX**) биле су неопходне да би се дефинисали потентни антагонисти ER α . Детаљније, **1. PhOH** требала би да окупира регион R1, да ступи у интеракцију са H3 Glu353 и H6 Arg394. Што се тиче региона R2, било би неопходно да **2. PhOH** ступи у интеракцију са H11 His524. Обе фармакофорне особине **1. PhOH** и **2. PhOH**, од суштинског су значаја за одржавање високог нивоа биоактивности антагониста. Две фармакофорне особине требало би да буду структурно повезане помоћу фармакофорне особине **C5(6)-Хетероцикла**, не би ли се оствариле повољне електростатичке интеракције са H6 Met388, односно π - π интеракције са аминокиселинама присутним у R2.

Додатни бензенев прстен, тј. **Ph** фармакофорна особина требало би да буде повезана са **C5(6)-Хетероциклом** да би формирала троугаона структура заједно са фармакофорним особинама **1. PhOH** и **2. PhOH**. Присуство **Ph** од суштинске је важности за подстицање формирања H3 Thr347-H11 Leu525-H12 Leu536 хидрофобне мреже, да би се омогућила дислокација H12 услед индукованог прилагођавања према антагонисту. Фармакофорна особина **Oxy** која би требало да се налази унутар етаноламинског моста, важна је за остваривање интеракција са H3 Thr347. Финални сегмент потенцијално активног антагониста, сходно SAR анализи, била би **HBX** фармакофорна особина која би требала да привуче H3 Asp351 у смислу грађења

Резултати и дискусија

водоничне везе ради олакшавања просторног померања H12, а која може бити инкорпорирана унутар пето- или шесточланих хетероцикла носилаца позитивно наелектрисаних хетероатома.



Слика 3.4. SAR модел антагониста ER α виђен кроз преклапање **1ERR** (пуне беле линије) и **1XP1** (испрекидане плаве линије). Обавезне интеракције назначене су пуним стрелицама, важне интеракције назначене су испрекиданим стрелицама, могућа супституција биоизостерима назначена је оивиченим стрелицама.

Процена способности различитих алгоритама и функција погодака за репродукцију кристалних структура парцијалних агониста и антагониста ER α користећи софтвере бесплатне за академску заједницу

Како сваки генерисани 3-D QSAR модел треба да буде процењен у циљу утврђивања колика је његова моћ предвиђања, протоколи поравнања на основу структуре рецептора (SB) и лиганата (LB) креирани су да би се дефинисала биоактивна конформација са једињењима чија је активност позната али не и начини интеракције са ER α . Процене поравњања (енг. alignment assessments) [336] према структури рецептора извршене су у овој фази истраживања помоћу софтвера отвореног кода или софтвера

Докторска дисертација Незрине Куртановић

бесплатног за академску заједницу. Експериментални протоколи репродукције кристалних структура лиганата према структури молекулске мете извршени су помоћу програма за молекулско доковање AutoDock, AutoDock Vina (у даљем тексту Vina) и DOCK, док су за протоколе репродукције кристалних структура лиганата према структури сâмих лиганата коришћени парови програма Obconformer/Open3DALIGN и Balloon/ShaEP. Извршено је четири нивоа процене SB и LB AA протокола [336]. Што се тиче SB AA протокола извршено је поновно доковање експерименталних конформација (енг. *experimental conformation re-docking*, ECRD, поновно доковање насумичних конформација (енг. *randomized conformation re-docking*, RCRD), унакрсно доковање експерименталних конформација (енг. *experimental conformation cross-docking*, ECCD) и унакрсно доковање насумичних конформација (енг. *randomized conformation cross-docking*, RCCD). Аналогно, LB AA протоколи извршени су применом процене поновног поравнања експерименталних конформација (енг. *experimental conformation re-alignment*, ECRA), поновног поравнања насумичних конформација (енг. *randomized conformation re-alignment*, RCRA), унакрсног поравнања експерименталних конформација (енг. *experimental conformation cross-alignment*, ECCA) и унакрсног поравнања насумичних конформација (енг. *randomized conformation cross-alignment*, RCCA). Резултати SB AA и LB AA приказани су у Табелама 3.2-3.5, Сликама 3.5 и 3.6, као и Сликама ДМ36-ДМ43 у оквиру Додатног материјала I. Током извршења SB AA протокола програм Vina испољио је највећу прецизност приликом репродуковања експерименталних структура лиганата (Додатни материјал I: Сlike ДМ36-ДМ40) док је током извршења LB AA протокола најтачнији био програмски пар Obconformer/Open3DALIGN (Додатни материјал I: Сlike ДМ41-ДМ45).

Процена поравнања базираног на структури молекулске мете

За процену поравнања базираног на структури молекулске мете (SB поравнање), лиганди ER α су подвргнути претходно описаном протоколу за поновно и унакрсно доковање [336]. Различити алгоритми и функције погодака, имплементирани у програмима AutoDock, Vina, односно DOCK, коришћени су за репродукцију експерименталних биоактивних конформација лиганата ER α . Употребом унакрсног доковања флексибилност рецептора укључена је на дискретан начин [341].

Резултати и дискусија

Табела 3.2. Репродукција кристалних структура лиганата ER α природног типа на основу структуре молекулске мете током ECRD, RCRD, ECCD и RCCD фаза

Јед. ЕК ^а	AutoDock		Vina	DOCK		AutoDock		Vina	DOCK		
	BD ^б	BC ^в		P ^г	Ф ^д	BD ^б	BC ^в		P ^г	Ф ^д	
			ECRD						RCRD		
1ERE	2,691 ^б	2,955	1,101	2,347	2,921	1,894	7,406	1,106	3,492	3,343	
1ERR	2,376	2,772	1,482	3,043	2,976	1,698	8,453	1,222	3,697	2,276	
1GWQ	2,494	2,543	7,968	3,042	3,557	7,899	7,897	7,955	2,976	3,034	
1R5K	1,609	2,011	1,546	1,543	1,672	1,982	1,981	1,632	3,961	3,928	
1SJ0	10,529	10,488	0,964	4,374	4,697	17,391	18,396	1,446	2,169	2,226	
1X7E	1,640	1,640	3,349	2,843	2,973	1,180	1,516	3,216	2,725	2,743	
1X7R	7,933	7,934	7,920	9,374	11,943	7,848	7,831	7,871	5,496	6,393	
1XP1	1,614	1,411	1,448	2,116	1,936	1,539	1,512	1,492	0,974	0,974	
1XP6	2,221	2,142	1,217	1,923	2,427	1,143	1,418	1,224	0,697	0,893	
1XP9	0,998	0,998	1,108	4,367	4,992	1,217	1,229	1,952	2,147	2,346	
1XPC	1,366	1,224	0,936	3,997	4,072	1,940	1,292	1,033	2,661	2,774	
1XQC	1,392	1,101	0,907	1,639	1,774	1,150	1,144	1,051	1,743	1,893	
1YIM	1,746	1,506	1,739	2,268	2,439	1,655	1,173	1,924	1,532	1,326	
1YIN	1,356	1,366	1,343	1,767	1,935	6,019	1,083	1,816	0,892	1,342	
2BJ4	1,347	1,199	1,957	2,641	2,728	1,095	1,315	1,827	0,667	3,276	
2IOG	5,765	5,765	0,507	3,176	3,238	8,126	2,486	1,600	3,421	4,318	
2IOK	7,494	5,957	0,811	1,742	1,698	6,335	4,177	0,886	2,541	4,326	
3ERD	7,805	7,572	1,121	3,247	3,448	2,495	7,756	1,770	2,443	3,437	
ТД%*	61,11	52,77	83,33	41,67	44,44	61,11	58,33	83,33	52,77	41,67	
			ECCD						RCCD		
1ERE	4,726	5,717	1,798	2,871	3,028	4,943	5,727	1,932	2,996	4,726	
1ERR	7,654	5,466	1,702	3,741	3,916	8,342	5,638	1,554	3,941	7,654	
1GWU	3,770	5,237	2,139	3,042	2,937	4,326	4,716	2,942	3,084	3,770	
1R5K	4,498	4,096	4,460	1,391	1,561	4,761	3,974	5,494	1,761	4,498	
1SJ0	6,198	5,008	1,931	2,761	2,937	7,169	6,841	1,554	3,041	6,198	
1X7E	5,217	3,441	4,747	3,916	4,176	5,371	7,316	5,364	4,313	5,217	
1X7R	7,426	7,829	6,326	7,342	8,103	6,431	8,392	5,427	11,274	7,426	
1XP1	6,454	4,819	1,797	3,416	5,417	5,476	5,738	1,731	14,287	6,454	
1XP6	6,617	3,871	1,673	2,176	2,938	5,893	4,976	1,438	4,316	6,617	
1XP9	6,799	4,688	1,903	4,576	7,328	7,391	8,391	1,561	11,284	6,799	
1XPC	9,218	5,236	1,153	4,226	5,491	8,931	10,426	1,271	8,313	9,218	
1XQC	5,950	5,732	2,500	2,761	2,937	6,141	6,271	2,671	3,032	5,950	
1YIM	5,599	4,464	2,828	3,042	3,021	4,312	3,918	2,931	3,771	5,599	
1YIN	6,032	5,115	2,047	2,471	2,555	5,974	5,773	2,117	2,918	6,032	
2BJ4	6,212	5,883	1,214	2,884	2,917	6,184	7,391	2,516	2,996	6,212	
2IOG	10,528	9,013	7,257	4,326	5,761	11,276	13,439	8,391	5,391	10,528	
2IOK	7,782	6,792	7,260	1,217	4,371	7,339	8,391	6,343	2,176	7,782	
3ERD	5,425	5,639	1,176	3,225	3,261	6,431	2,439	1,917	3,483	5,425	
ТД%	0,00	0,00	61,11	27,78	19,44	0,00	2,77	52,78	13,89	0,00	

^аЕкспериментална конформација. ^бНајбоља докована конформација. ^вНајбоља кластерна конформација. ^гРигидно доковање. ^дФлексибилно доковање. ^ђВредности корена средњих квадрата одступања измерене између тешких атома експерименталне и поновно поравнате конформације лиганда. ^еНије доступно. ^жТачност доковања.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

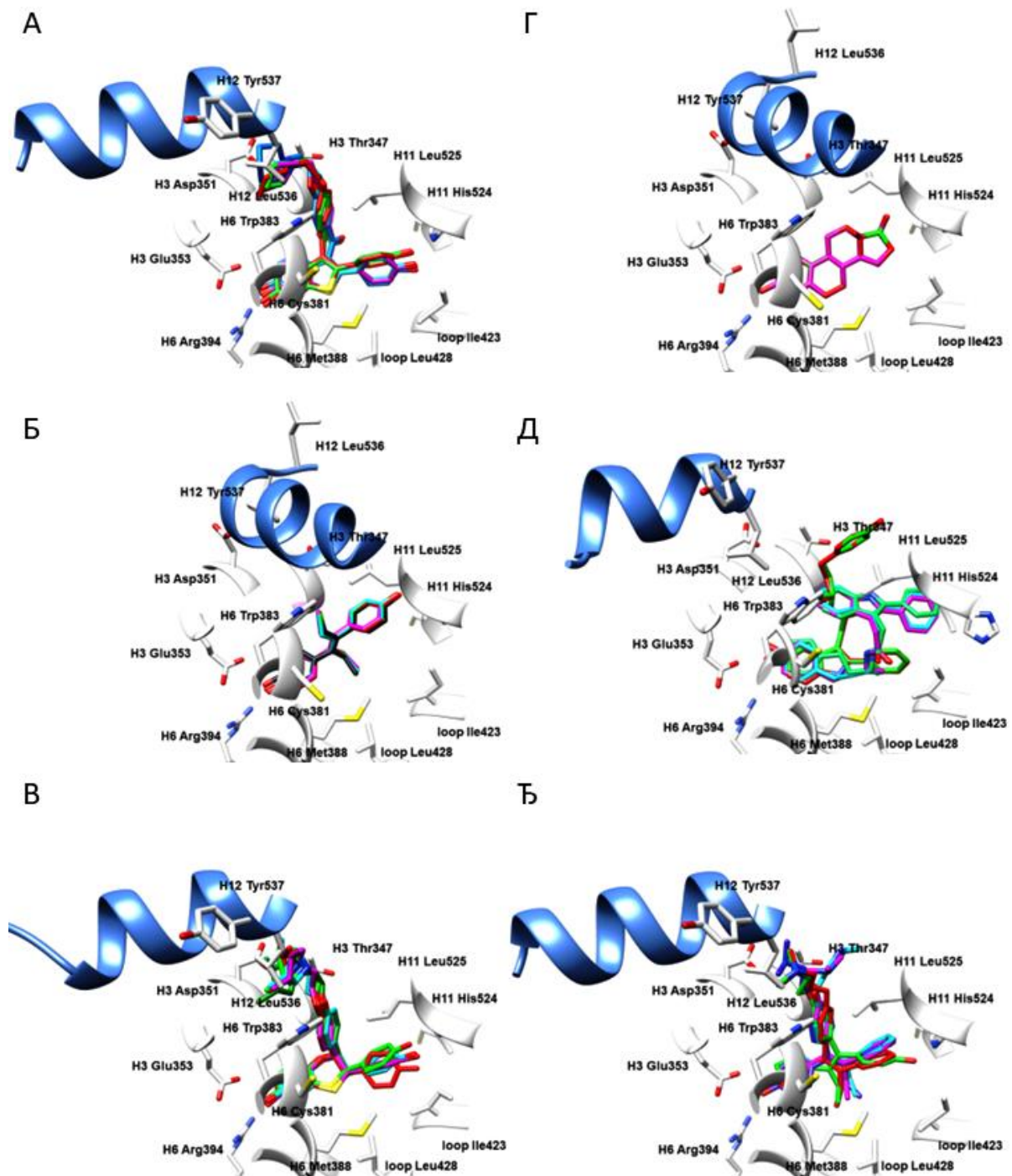
Табела 3.3. Репродукција кристалних структура лиганада ER α природног типа на основу структуре молекулске мете током ECRD, RCRD, ECCD и RCCD фаза

Јед. ЕК ^а	AutoDock		Vina	DOCK		AutoDock		Vina	DOCK		
	BD ^б	BC ^в		P ^г	Ф ^д	BD ^б	BD ^б	BC ^в		P ^г	
			ECRD					RCRD			
1L2I	0,781 ^б	0,908	0,634	1,118	1,252	0,678	0,852	1,828	7,201	7,216	
1UOM	1,287	1,414	1,379	1,863	1,995	1,967	2,141	1,413	1,786	1,801	
2B1Z	2,633	2,762	0,392	0,876	1,008	2,637	2,811	0,386	0,759	0,774	
2QA6	1,643	1,772	5,945	6,429	6,561	5,926	6,100	6,044	6,417	6,432	
2R6W	1,619	1,746	2,128	2,612	2,744	7,487	7,661	1,456	1,829	1,844	
2R6Y	8,680	8,807	1,223	1,707	1,839	1,455	1,629	1,144	1,517	1,532	
4TUZ	0,913	1,040	0,245	0,729	0,861	0,559	0,733	0,185	0,558	0,573	
5AK2	4,427	4,554	7,024	7,508	7,640	6,69	6,864	7,090	7,463	7,478	
ТД%^ж	68,75	68,75	68,75	68,75	68,75	56,25	50,00	75,00	62,50	62,50	
			ECCD					RCCD			
1L2I	4,261	4,433	1,125	2,992	2,167	4,752	4,967	1,78	4,633	4,338	
1UOM	4,746	4,918	2,983	6,85	7,025	5,068	5,283	2,893	6,746	6,451	
2B1Z	3,130	3,302	1,826	2,693	2,868	2,891	3,106	1,208	2,061	1,766	
2QA6	3,303	3,475	2,918	4,785	4,962	4,027	4,242	2,976	4,929	4,634	
2R6W	5,443	5,615	6,983	7,855	8,025	5,204	5,419	7,537	8,398	8,095	
2R6Y	5,592	5,764	5,599	6,466	6,641	5,45	5,665	5,842	6,695	6,400	
4TUZ	2,059	2,231	1,771	3,638	2,813	2,266	2,481	1,044	2,897	2,602	
5AK2	4,388	4,56	2,345	НД ^е	НД	5,028	5,243	4,231	5,084	4,789	
ТД%^ж	6,25	6,25	50,00	12,50	18,75	12,50	6,25	50,00	12,50	18,75	

^аЕкспериментална конформација. ^бНајбоља докована конформација. ^вНајбоља конформација унутар кластера. ^гРигидно доковање. ^дФлексибилно доковање. ^бВредности корена средњих квадрата одступања измерене између тешких атома експерименталне и поновно поравнате конформације лиганда. ^еНије доступно. ^жТачност доковања.

Израчунати проценти тачности доковања (DA) [336] открили су да су AutoDock и Vina били способни да репродукују експерименталних конформација лиганда пронађених у рецептору природног типа било у ECRD или RCRD фази, са тачношћу изнад 50% (Табела 3.2). Међутим, током експеримената унакрсног доковања само је Vina показала да може да репродукује експерименталне конформације са прихватљивим DA од 61,11% и 52,78% за ECCD, односно RCCD, респективно. Сличан тренд такође је примећен код лиганада ко-кристализованих унутар рецептора мутираног типа (Табела 3.3), где је DA у RCCD износила 50,00%, док AutoDock и Dock нису успели да репродукују одговарајуће експерименталне конформације. Стога је поступак процене способности програма да узврши поравњање базирано на структури молекулске мете потврдио да је програм Vina најприкладнији за репродукују биоактивних конформација лиганада ER α било у природном или мутираном рецептору (Слика 3.5, Додатни материјал I: Сlike ДМ36-ДМ40).

Резултати и дискусија



Слика 3.5. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ERα помоћу програма Vina: **1ERR** (А) ЕС плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **3ERD** (Б), ЕС црна, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1XP1** (В), ЕС светло зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1ERE** (Г), ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2IOK** (Д), ЕС светло зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; и **2BJ4** (Ђ) ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Процена поравњања базираног на структури лиганада

Слично протоколима за SB поравнање, поступак LB поравњања спроведен је са лигандима екстрахованим из ER α природног или мутираног типа. LB поравнање изведено је помоћу парова програма Obconformer/Open3DALIGN и Balloon/ShaEP. Сâм поступак поравњања изведен је помоћу софтвера Open3DALIGN или ShaEP, док су насумичне конформације лиганада генерисане модула Obconformer имплементираним у пакет OpenBabel или помоћу програма Balloon. Након примене програмског пара Balloon/ShaEP, добијене су две конформације за свако једињење, једна генерисана помоћу подударана поље-графа и просторне електронске густине, названа shaer конформација, и она добијена на основу преглапања само просторне електронске густине, названа shaer.onlyshape конформација. Критеријум процента тачности поравњања (AA) био је у распону између 0 (без поравњања) и 1 (максималне перформансе поравњања).

Узимајући у обзир способност поравњања обе врсте лиганада (Табеле 3.4 и 3.5, Слика 3.6, Додатни материјал I: Сlike ДМ41-ДМ45), Obconformer/Open3DALIGN пар програма био је тачнији од Balloon/ShaEP само на нивоу R_{CSA} и стога је изабрани за накнадно поравнање LB молекула унутар тест сетова и дизајнираних једињења. Стога је Obconformer/Open3DALIGN драгоцен пар софтвера који је могуће користити у виртуелном скенирању и дизајнирању нових антагониста.

Процена способности предвиђања биоактивности 3-D QSAR модела генерисаног из N пробе

У циљу процене способности предвиђања биоактивности 3-D QSAR модела проистеклог из N пробе за једињења са познатим или непознатим биоактивним конформацијама, коришћена су четири тест сета описана у претходном делу текста (TS_{CRY} и три моделирана TS: TS_{MOD1}-TS_{MOD3}, Табеле 3 и 5, Додатни материјал I: Табеле ДМ42-ДМ47, респективно). Из процене способности различитих алгоритама да репродукују SB и LB биоактивне конформације ко-кристализованих лиганада ER α проистекла су правила за генерисање биоактивних конформација помоћу којих би биопоза било ког претходно нетестираног једињења могла бити генерисана и учитана у 3-D QSAR модел проистекао из N пробе у циљу предвиђања биоактивности.

Резултати и дискусија

Табела 3.4. Репродукција кристалних структура лиганата ER α природног типа на основу структуре самих лиганата током ECRA, RCRA, ECCA и RCCA.

Јед. ЕК ^б	Open3DALIGN		Balloon/ShaEP		OC/Open3DALIGN ^а		Balloon/ShaEP		
	Резултат ^б	O3A ^г	Shaep ^д	shaep.onlyshape ^ђ	Резултат ^б	O3A ^г	Shaep ^д	shaep.onlyshape ^ђ	
			ECRA					RCRA	
1ERE	301,934	0,999 ^г	0,881 ^е	0,713 ^е	291,783	0,509	0,979	0,776	
1ERR	542,565	0,999	0,889	0,755	395,133	0,523	0,751	0,650	
1GWQ	256,325	0,999	0,949	0,851	253,327	0,969	0,971	0,861	
1QKU	291,989	0,999	0,988	0,752	291,891	0,999	0,999	0,758	
1R5K	281,373	0,999	0,922	0,818	266,298	0,941	0,954	0,968	
1SJ0	539,744	0,999	0,922	0,752	479,475	0,81	0,741	0,639	
1X7E	324,825	0,999	0,841	0,769	301,654	0,948	0,945	0,834	
1X7R	324,566	0,999	0,871	0,822	322,735	0,985	0,986	0,895	
1XP1	551,741	0,999	0,905	0,733	452,591	0,656	0,786	0,647	
1XP6	551,747	0,999	0,889	0,732	474,567	0,753	0,768	0,652	
1XP9	539,743	0,999	0,854	0,715	485,244	0,811	0,830	0,709	
1XPC	539,742	0,999	0,878	0,734	480,376	0,769	0,805	0,675	
1XQC	560,983	0,999	0,838	0,683	483,004	0,755	0,795	0,657	
1YIM	532,229	0,999	0,926	0,753	469,508	0,771	0,744	0,621	
1YIN	560,827	0,999	0,919	0,756	474,557	0,758	0,806	0,669	
2BJ4	455,143	0,999	0,873	0,653	335,58	0,594	0,672	0,569	
2IOG	629,634	0,999	0,701	0,517	507,612	0,726	0,601	0,488	
2IOK	477,731	0,999	0,891	0,751	354,701	0,584	0,624	0,527	
3ERD	301,932	0,999	0,811	0,713	286,943	0,892	0,946	0,764	
ТП %^ж		100	100	100		100	100	100	
			ECCA					RCCA	
1ERE	320,599	0,663	0,695	0,600 ^г	317,820	0,657	0,652	0,581	
1ERR	346,360	0,676	0,710	0,596	323,398	0,585	0,596	0,510	
1GWQ	320,090	0,649	0,647	0,576	319,032	0,637	0,668	0,590	
1QKU	314,701	0,644	0,687	0,604	319,037	0,656	0,697	0,599	
1R5K	275,430	0,785	0,965	0,822	278,560	0,951	0,933	0,932	
1SJ0	367,865	0,715	0,734	0,629	345,444	0,620	0,678	0,582	
1X7E	318,310	0,643	0,635	0,573	315,563	0,623	0,673	0,589	
1X7R	316,776	0,630	0,673	0,592	318,741	0,636	0,681	0,594	
1XP1	366,160	0,694	0,732	0,619	345,001	0,624	0,659	0,572	
1XP6	365,770	0,695	0,729	0,618	341,348	0,606	0,628	0,546	
1XP9	369,457	0,718	0,730	0,622	346,299	0,643	0,677	0,586	
1XPC	364,763	0,708	0,738	0,630	342,142	0,626	0,687	0,585	
1XQC	356,986	0,694	0,720	0,601	343,548	0,633	0,661	0,581	
1YIM	369,811	0,717	0,750	0,637	343,896	0,622	0,695	0,586	
1YIN	367,879	0,721	0,742	0,625	344,364	0,638	0,678	0,583	
2BJ4	346,894	0,728	0,735	0,626	325,450	0,621	0,667	0,574	
2IOG	318,781	0,564	0,601	0,513	313,713	0,512	1,562	1,562	
2IOK	308,750	0,555	0,687	0,566	307,178	0,543	0,610	1,894	
3ERD	320,599	0,663	0,687	0,591	318,876	0,647	0,679	0,586	
ТП %^ж		100	100	100		100	95	90	

^аОбconformer/Open3DALIGN. ^бЕкспериментална конформација. ^вКвалитет суперпозиције. ^гOpen3DALIGN конформација. ^дShaEP shape конформација. ^ђShaEP onlyshape конформација. ^еТачност поравнања измерена између тешких атома конформације експерименталног и поравњаног лиганда. ^жТачност поравнања.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

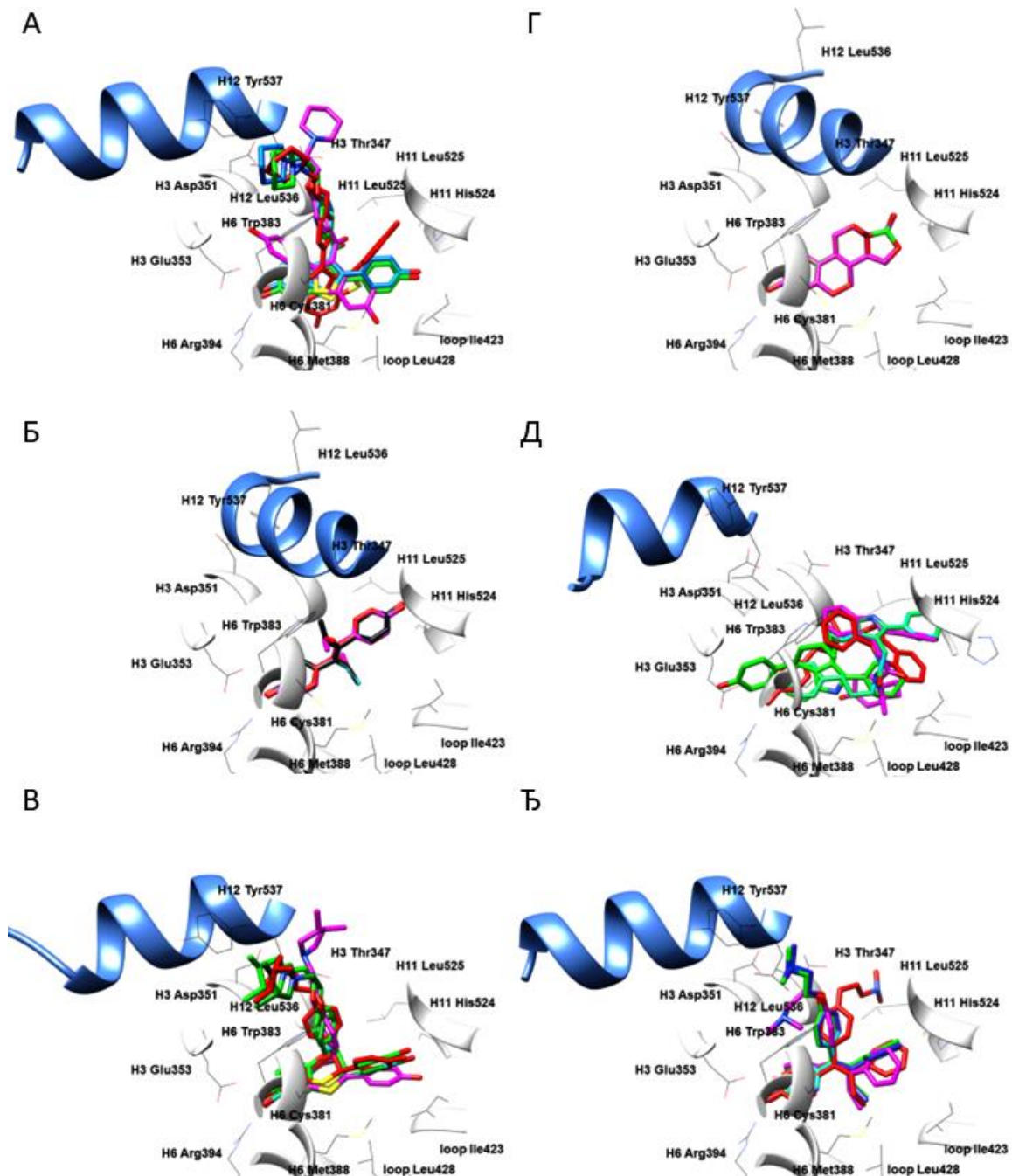
Табела 3.5. Репродукција кристалних структура лиганата ER α мутираног типа на основу структуре самих лиганата током ECCA, RCRA, ECCA и RCCA фаза

Јед. ЕК ^б	Open3DALIGN		Balloon/ShaEP		OC/Open3DALIGN ^а		Balloon/ShaEP		
	Резултат ^б	О3А ^г	Shaep ^д	shaep.onlyshape ^ђ	Резултат ^б	О3А ^г	Shaep ^д	shaep.onlyshape ^ђ	
			ECRA				RCRA		
1L2I	355,413	0,999 ^е	0,948	0,765	347,294	0,960	0,961	0,770	
1UOM	529,955	0,999	0,902	0,731	425,073	0,672	0,728	0,602	
2B1Z	309,988	0,999	0,988	0,775	309,836	0,999	0,999	0,783	
2QA6	299,841	0,999	0,911	0,845	269,476	0,841	0,845	0,792	
2R6W	554,464	0,999	0,899	0,754	462,903	0,730	0,724	0,626	
2R6Y	530,468	0,999	0,859	0,726	434,604	0,759	0,792	0,702	
4TUZ	378,462	0,999	0,988	0,770	377,685	0,996	0,996	0,773	
5AK2	530,066	0,999	0,956	0,683	464,812	0,858	0,653	0,667	
ТП%*		100	100	100		100	100	100	
			ECCA				RCCA		
1L2I	302,810	0,696	0,729	0,640	303,185	0,697	0,723	0,637	
1UOM	306,361	0,585	0,644	0,566	295,466	0,554	0,575	0,516	
2B1Z	298,764	0,696	0,745	0,661	298,068	0,703	0,741	0,662	
2QA6	295,327	0,667	0,738	0,660	296,510	0,684	0,752	0,672	
2R6W	300,391	0,567	0,632	0,550	292,102	0,524	0,563	0,508	
2R6Y	303,428	0,594	0,651	0,572	295,865	0,560	0,62	0,543	
4TUZ	294,187	0,642	0,718	0,621	294,461	0,622	0,706	0,625	
5AK2	305,562	0,672	0,713	0,602	295,921	0,611	0,664	0,584	
ТП%*		100	100	100		100	77,77	77,77	

^аObconformer/Open3DALIGN. ^бЕкспериментална конформација. ^вКвалитет суперпозиције. ^гOpen3DALIGN конформација. ^дShaEP shape конформација. ^ђShaEP onlyshape конформација. ^еТачност поравнања измерена између тешких атома конформације експерименталног и поравњаног лиганда. ^жТачност поравнања.

Сходно томе, способност предвиђања биоактивности најбољег 3-D QSAR модела процењена је на четири у претходном делу текста описана тест сета (Табела 3 и Табела 3.6, Додатни материјал I: Табеле ДМ42-ДМ47), чија су једињења екстрахована из одговарајућих комплекса или нацртана и минимизирана помоћу молекулско-механичке оптимизације на основу алгоритама имплементираних у msketch модул програма MarvinSuite компаније Chemaxon. Биоактивне конформације моделираних једињења генерисане су на нивоу рецептора, користећи програм Vina, или на након упоређивања са осталим ко-кристализованим лигандима, помоћу алата Obconformer/Open3DALIGN.

Резултати и дискусија



Слика 3.6. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру ER α , помоћу програмског пара Obconformer/Open3DALIGN: **1ERR** (A), EC плава, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **3ERD** (Б), EC црна, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1XP1** (B), EC светло зелена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1ERE** (Г), EC љубичаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **2IOK** (Д), EC светло зелена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; и **2BJ4** (Ђ) EC љубичаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Примена T_{SCRY} за потребе способности предвиђања 3-D QSAR модела проистеклог из N пробе открила је да модел заснован на pIC₅₀ вредностима има способност предвиђања биолошких активности експериментално доступних лиганата чији је биопотенцијал исказан помоћу pK_i вредности (овде неадекватно коришћених као pIC₅₀ вредности), са ниским вредностима просечних апсолутних грешака предвиђања (енг. average absolute error of prediction, AAEP) од 1,2 и 1,17 за LOO и LSO SA оптимизоване 3-D QSAR моделе, респективно (Табела 3.6). Предвиђена вредност квадратног корелационог коефицијента q^2 (енг. q^2_{pred}) за експерименталне конформације износила је 0,3, што је било блиско вредностима које препоручује Tropsha са сарадницима [384]. Интересантно, скоро у свим случајевима поново поравњани молекули предвиђени су са нижим грешкама предвиђања. Тако, активности LB поравњаних једињења из T_{SCRY} предвиђене су са најнижим AAEP (0,84) и највише q^2_{pred} (0,61) вредностима. Ове вредности указале су на то да 3-D QSAR модели поседују добру моћ предвиђања како за експерименталне тако и за моделиране конформације. Оно што је јако значајно јесте да су правила за репродукцију SB и LB конформација омогућила да се 3-D QSAR моделу умањи грешка предвиђања која настала услед различитог начина представљања вредности биолошких активности (pIC₅₀ у односу на pK_i) за доступне експерименталне комплексе.

Табела 3.6. Примена 3-D QSAR модела проистеклог из N пробе на SB/LB предвиђање активности једињења унутар T_{SCRY}.

Унос	pK _i	ЕС пред. pK _i ^a		AAEP [†]	SB пред. pK _i ^a		AAEP [‡]	LB пред. pK _i ^a		AAEP [†]
		LOO ^b	LSO ^b		LOO ^b	LSO ^b		LOO ^b	LSO ^b	
3ERT	9,60	9,01	8,89	0,65	8,90	8,67	0,82	9,13	9,01	0,53
3UU7	8,79	7,92	7,85	0,90	9,12	8,50	0,02	8,66	7,94	0,49
3UUA	8,79	7,84	7,77	0,98	9,34	8,73	0,25	8,32	7,92	0,67
3UUC	5,70	5,93	5,63	0,08	5,63	6,46	0,35	5,72	5,12	0,28
4DMA	5,60	8,85	8,13	2,89	8,35	8,06	2,61	7,98	7,45	2,12
4MG6	6,00	4,89	4,21	1,45	5,43	4,18	1,20	4,44	4,12	1,72
4MG8	10,00	9,03	9,01	0,98	9,36	9,21	0,72	9,43	9,12	0,73
4MG9	6,00	7,08	6,96	1,02	6,78	6,32	0,55	6,46	5,46	0,04
4MGA	6,00	7,88	7,43	1,66	7,68	7,34	1,51	7,26	7,01	1,14
4MGC	7,00	7,58	7,14	0,36	7,85	7,21	0,53	7,18	6,44	0,19
4MGD	6,00	9,72	9,48	3,60	9,46	9,84	3,65	8,26	8,31	2,29
4TUZ	10,00	9,73	9,12	0,58	9,33	9,06	0,81	9,44	9,07	0,75
4ZN9	9,60	9,55	9,36	0,15	9,05	8,85	0,65	9,01	9,12	0,54

^aПредвиђања добијена SA моделима оптимизованих са LOO и LSO унакрсном валидацијом. ^bLOO унакрсна валидација. ^cLSO унакрсна валидација са 5-random-groups-out. [†]AAEP, просечна апсолутна грешка предвиђања LOO и LSO унакрсних валидација.

Резултати и дискусија

Надаље, просечне предвиђене pK_i вредности проистекле из поновно поравњаних конформација указале су на добар потенцијал да коришћење и SB и LB метода поравњана. Како је било очекивано, вредности коефицијената добијених из тест сетова од једињења доступних у литератури нису били на нивоу оних TC_{CRY} једињења, али је дубљом анализом утврђено да модел заиста поседује добар ниво предвиђања биолошке активности. Тако, TS_{MOD1} базиран на pIC_{50} вредностима био је састављен од природних производа и њихових аналога са биолошком активношћу у интервалу од 3,47 до 5,52 и окарактерисан са AAEP вредношћу предвиђања 3-D QSAR модела од 1,92. Ипак, узимајући у обзир само једињења са експерименталним pK_i вредностима нижим од 10 mM, које су биле блиске распону активности TR једињења (5,85 – 9,52), AAEP вредност спустила се на само 0,66; биолошка активност код више од 17% једињења била је исправно предвиђена са малом грешком предвиђања указујући на то да је модел са великом дозом поверења могуће користити у процесу виртуелног скенирања. Примена модела на предвиђање биолошких активности TS_{MOD2} (заснованог на pK_i вредностима) и TS_{MOD3} (заснованог на $pRBA$ вредностима) резултовала је AAEP вредностима у износу од 1,47 и 2,04, респективно. Опет, слично као код TC_{CRY} , pK_i и $pRBA$ вредности неадекватно су интерпретиране као pIC_{50} вредности: у ограниченом и симулираном виртуелном скенирању 28 једињења унутар TS_{MOD2} , 50% једињења било је предвиђено са pIC_{50} вредностима вишим од (100 nM) међу којима је њих 11 (78%) заиста исказало pK_i вредности које су биле у распону од 7,25 до 9,08; 45 једињења унутар TS_{MOD3} ($pRBA$ у интервалу између 1,45 и 6,72) била су предвиђена са pIC_{50} вредностима вишим од 5 а након филтрирања помоћу минималне предвиђене pIC_{50} вредност од 7 (100 nM), 10 од 25 (40%) једињења је имало $pRBA$ вредност вишу од 5. На основу изложене анализе и процењене способности предикције активности, SB и LB 3-D QSAR модели проистекли из 3-D QSAutogrid/R методологије представљају вредан алат у процесу дизајна лекова или виртуелног скенирања када се користе у циљу дизајнирања или селекције нових потентнијих парцијалних агониста/антагониста $ER\alpha$.

Правила за рационални дизајн нових антагониста $ER\alpha$ на основу 3-D QSAR модела проистеклих из 3-D QSAutogrid/R методологије

На основу детаљне анализе 3-D QSAR модела проистеклог из N пробе извршен је рационални дизајн иновативних антагониста $ER\alpha$ (Табела 3.7, једињења која припадају серији заснованој на 3-D QSAR студијама, у даљем тексту **3DQ**).

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 3.7. Структуре дизајнираних погодака, њихове предвиђене и експериментално одређене активности против ER α .

#	Структуре лиганда	SB пред. pIC ₅₀ ^a	LB пред. pIC ₅₀ ^b	Експ. pIC ₅₀ ^B	#	Структуре лиганда	SB пред. pIC ₅₀ ^a	LB пред. pIC ₅₀ ^b	Експ. pIC ₅₀ ^B
3DQ -1a		9,41	9,36	9,48	3DQ -3b		9,39	9,31	9,40
3DQ -2a		9,61	9,55	9,58	3DQ -1c		9,17	9,11	9,15
3DQ -3a		9,04	9,16	9,11	3DQ -2c		9,15	9,10	9,12
3DQ -4a		9,70	9,62	9,72	3DQ -1d		8,95	9,01	8,98
3DQ -1b		9,42	9,41	9,43	3DQ -2d		8,91	8,86	8,95
3DQ -2b		9,44	9,36	9,40	3DQ -1e		9,11	9,13	9,17

^aПредвиђене SB активности дизајнираних једињења против ER α помоћу 3-D QSAR модела генерисаног из N пробе; ^bПредвиђене LB активности дизајнираних једињења против ER α помоћу 3-D QSAR модела генерисаног из N пробе. ^BПредвиђене експерименталне активности дизајнираних једињења против ER α .

Резултати и дискусија

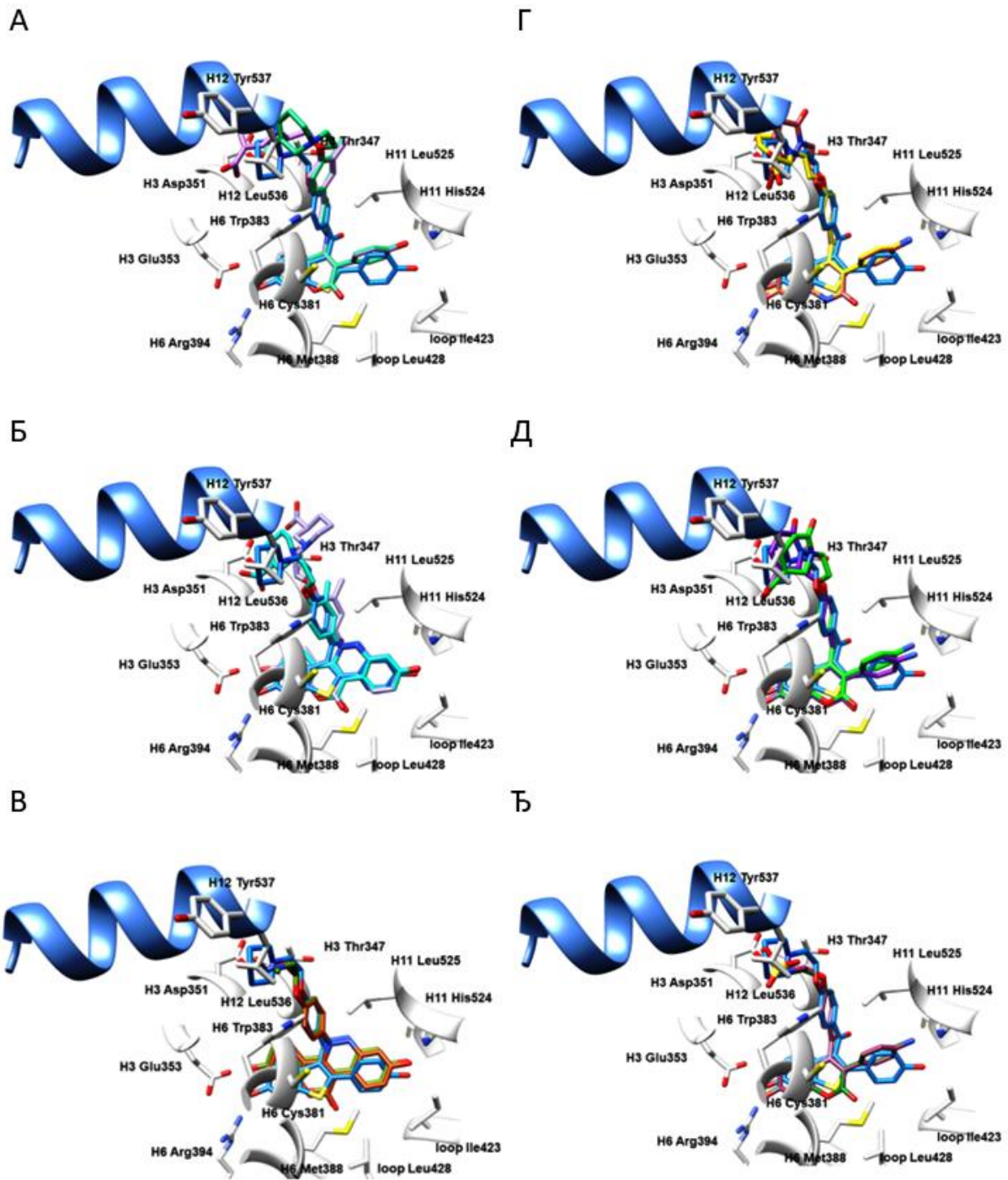
Дизајн је био фокусиран како на структурној оптимизацији једињења пронађеног у комплексу са ознаком **5AK2** [75], у смислу промене фармакологије наведеног једињења из SERD у SERM, тако и на развоју сличних једињења, што не би резултовао деградацијом самог рецептора у микрозомима након администрације. Тако, нова једињења са SERM фармакологијом дизајнирана су поштујући претходно описане хипотезе SAR модела, структурном оптимизацијом хромана и језгара сличних хроману као привилегованих структура [385], након чега су одређена приоритетна једињења за хемијску синтезу и биолошку евалуацију у смислу предвиђања биолошке активности помоћу 3-D QSAutogrid/R-Vina-Obconformer/Open3DALIGN протокола (Табела 3.7). Следећи поступци примењивани су у дизајну:

1. Дизајнирана једињења конструисана су на бази угљеничних језгара која се могу пронаћи у природним једињењима а која имају архитектуру **С6-Хетероцикла**, као што су кумарин, изокумарин, *2H*-хромен, *4H*-хромен, кинолин-2(*1H*)-он, *2H*-тиохромен-2-он;
2. Основна језгра морају садржати хидроксилну групу на положају *C7*, да би се испунили захтеви SAR модела за постојање **1. PhOH** фармакофорне особине унутар региона R1 у смислу формирања водоничних веза са H3 Glu353 и H6 Arg394;
3. Главна језгра изабрана су тако да могу да носе фенолне или анилинске остатке на положају *C3* како би се задовољили захтеви SAR модела у виду **2. PhOH** фармакофорне особине унутар региона R2, а све зарад успостављања водоничних веза са H11 His524 и да би се комплетирао **1. PhOH-С6-Хетероцикл-2. PhOH** конструкција. Изабране су следеће структуре које могу да окупирају регионе R1/R2: 7-хидрокси-3-(4-хидроксифенил)-*2H*-хромен-2-он или 3-(4-аминофенил)-7-хидрокси-*2H*-хромен-2-он (Табела 3.7, серија **3DQ-a**), 3-(4-аминофенил)-7-хидроксикинолин-2(*1H*)-он или 3-(4-аминофенил)-7-хидрокси-*2H*-хромен-2-он (Табела 3.7, серија **3DQ-b**), 7-хидрокси-3-(4-хидроксифенил)-*1H*-изохромен-1-он или 7-хидрокси-3-(4-аминофенил)-*1H*-изохромен-1-он (Табела 3.7, серија **3DQ-c**), 3-(4-хидроксифенил)-*2H*-хромен-7-ол или 3-(4-аминофенил)-*2H*-хромен-7-ол (Табела 3.7, серија **3DQ-d**), 3-(4-хидроксифенил)хроман-7-ол или 3-(4-аминофенил)хроман-7-ол (Табела 3.7, серије **3DQ-e**).

Докторска дисертација Незрине Куртановић

4. Положаји C3, C4, C2', и C4' основних језгара могли би бити супституисани било са пиперазином (положаји C3-C4-C2'-C4'), карбонилном групом (положај C4), или амино групом (положај C4), да би се оствариле неопходне електростатичке интеракције са H11 His524 и створила хемијска основа за увођење ароматичних остатака (односно фармакофорне особине **Ph**) унутар региона R3;
5. **Ph** и **Oxy** особине, као четврти и пети фармакофорни мотиви засновани на SAR-у, били су инкорпорирани помоћу 2-(*p*-толилокси)етанамина, 1-метил-4-пропоксибензена и 1-(4-(2-аминоетокси)фенил)етенена, укључујући *o*- и *m*-метилване облике. Функционалне групе које нису садржале **Ph**, али су садржале **Oxy** карактеристику, у облику 1-(аминоетокси)пропан-2-она, 1-(1-аминоетокси)пропан-2-она, 1-(2-аминоетокси)пропан-2-она, 1-(2-аминопропокси)пропан-2-она или 1-(1-аминопропан-2-илокси)пропан-2-она, такође су разматране, како би се тестирала неопходност **Ph** особине.
6. Стратегија дизајна функционалних група које би оствариле интеракцију са H12 надаље је валидирана кроз инкорпорацију хемијских ентитета способних да изазову дислокацију функције AF-2 и свеобухватну стабилизацију комплекса ER α : централни сегмент награђен на бензеновом прстену који је окупирао регион R3 довршен је након увођења различитих *N*-алкил супституисаних примарних или секундарних амина и сулфаминске киселине, као и различитих *N*-, *O*- и *N,O*-хетероцикала који су садржали **HBX** фармакофорне особине предвиђене SAR моделом, способних за интеракцију са H3 Asp351. Последње описани кораци у дизајну имали су за циљ да искористе хетероциклична једињења као носиоце **HBX** особина са фармакофорним својствима, истовремено прикривајући/смањујући потенцијалне негативне стерне ефекте.
7. Претходно описани протокол резултовао је у рационалном дизајну 3016 једињења (Додатни материјал I: Табела ДМ44), генерисаних комбинацијом свих могућих основних језгара и биоизостера, која су потом подвргнута SB/LB поравнању користећи Vina/Obsonformer/Open3DALIGN протокол и процедуре предвиђања pIC₅₀ вредности, коришћењем 3-D QSAR модела генерисаног из N пробе.

Резултати и дискусија



Слика 3.7. Преклапање између дизајнираних једињења **3DQ-4a** (А), SBC љубичаста, LBC зелена; **3DQ-2a** (Б), SBC плава, LBC тамно љубичаста; **3DQ-1a** (Ц), SBC жута, LBC црвена; **3DQ-1b** (Д), SBC маслинасто браон-црвена, LBC жута; **3DQ-2b** (Е), SBC љубичаста, LBC зелена; **3DQ-3b** (Ф) SBC зелена, LBC розе; и **1ERE**, EC плава, унутар ER α активног центра. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Дванаест најперспективнијих виртуелних поготка и нових потенцијалних антагониста ER α (Слика 3.7 и Додатни материјал I: Слика ДМ44, Табела 3.8), са дефинисаним биоактивним конформацијама помоћу SB/LB стратегије консензуса и предвиђеним вредностима биолошке активности [336], надаље синтетисано је и подвргнуто биохемијској евалуацији. Стратегија консензуса, која се заснивала на синергистичкој употреби главних методологија дизајна лекова (SB и LB), представља компјутациони алат за дизајнирање нових биоактивних једињења [336]. С тим у вези, кад год се претходно експериментално нетестирана конформација лиганда проистекла из SB поравнања подудара са оном добијеном LB поравнањем, тада је она вероватно биоактивна.

Након што су били подвргнути предвиђању биолошке активности, дизајнирана једињења формирала су тзв. сет за предвиђање, за потребе крајње процене предвиђања биолошких активности за развијене 3-D QSAR моделе (Табела 3.8). Интересантно, вредности квадратног корелационог коефицијента q^2_{pred} и AAEP за SB и LB моделе били су 0,93/0,04 и 0,88/0,06, респективно. Надаље, модели су се показали ефикасним у препознавању тренда биолошке активности са великом тачношћу, исправним предвиђањем најпотентнијих и најмање потентних деривата, доказујући тако да представљају ефикасни алат за дизајнирање нових и потентних антагониста ER α . И заиста, предвиђена биолошка активност једињења **3DQ-4a** била је већа од **1ERR** (најактивнијег једињења унутар тренинг сета) што је и потврђено експерименталним есејима са активношћу 3,89 пута већом (IC₅₀ = 190 pM) од **1ERR** (видети текст даље).

Поступци хемијске синтезе једињења 3DQ-1a до 3DQ-1e

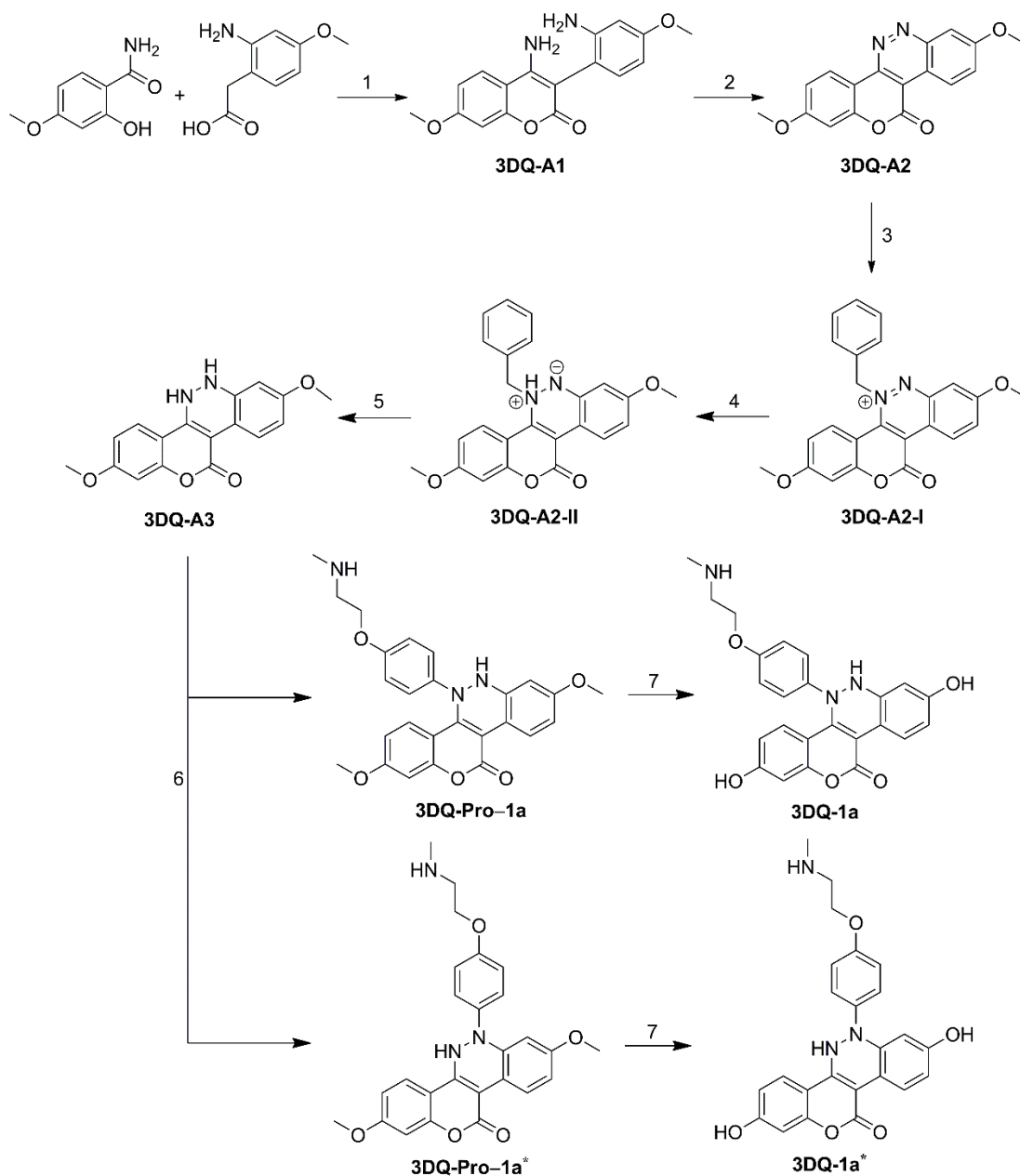
Коришћењем различитих приступа (Шеме 3.1-3.7), дизајнирана једињења синтетисана су у високим приносима. У главном делу текста детаљно су дискутовани синтетички протоколи који су резултовали синтезом једињења **3DQ-1a** до **3DQ-1e** велике чистоће, као и дискусија спектралних података. Подаци у виду ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹⁵N NMR, и ¹⁷O NMR спектра били су у потпуној сагласности са предложеним молекулским структурама. Сви NMR спектри снимљени су у DMSO-*d*₆ као растварачу, при чему су пикови растварача обично проналажени као ¹H NMR мултиплет на 2,50 ppm, ¹³C NMR мултиплет на 40,07 ppm и ¹⁷O NMR синглет на 13,00 ppm.

Резултати и дискусија

Синтеза једињења **3DQ-1a** и **3DQ-1a***

Синтеза једињења **3DQ-1** до **3DQ-3a** (Шеме 3.1, 3.2 и 3.3) била је условљена синтезом синтона **3DQ-A3**, који је синтетисан из интермеђера **3DQ-A1** и **3DQ-A2** (Шема 3.1).

Шема 3.1. Синтеза једињења **3DQ-1a** и **3DQ-1a***^a



^aРеагенси и услови: (1) As_2O_3 , безводни NEt_3 , 180°C , 18 h, затим K_2CO_3 , RT, 6 h; (2) *m*-BuONO (3 екв.), TFE (0,01 M), rt, 12 h; (3) BnCl, AgOTf, DMC; (4) *i*-Pr₂NEt, DMF; (5) 1N HCl, DMF; (6) K_2CO_3 , EtOH, рефлукс; (7) BBr_3 , CH_2Cl_2 , 0°C , 3h, рефлукс.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

3DQ-A1 је синтетисан у добром приносу (80%) реакцијом Perkin-ове кондензације између еквимоларних количина комерцијално доступних 2-хидрокси-4-метоксибензамида и 2-(2-амино-4-метоксифенил)сирћетне киселине, у медијуму сачињеном од анхидрида сирћетне киселине и триетиламина као растварача, на високој температури (180°C) и уз продужено реакционо време (18 h) [386]. Током синтезе **3DQ-A1**, тј. 4-амино-3-(2-амино-4-хидроксифенил)-7-хидрокси-2*H*-хромен-2-она, обе хидроксилне групе већ су биле заштићене као метокси форме унутар структура комерцијалних прекурсора, омогућавајући примарним аминима реактаната да буду подвргнути даљој структурној оптимизацији. Једињење **3DQ-A1** потом је подвргнуто циклизацији након чега је добијен интермедијер **3DQ-A2** (односно 2,8-диметокси-11*H*-хромено[4,3-с]цинолин-11-он, Шема 3.1, 90% принос) додавањем 3 еквивалента *tert*-бутил нитрита (^tBuONO) у 2,2,2-трифлуороетанолу (TFE) као растварачу [387]. Потом је **3DQ-A2** преведен у дериват хидразина **3DQ-A3** (Шема 3.1) процесом контролисане редукције [388]. Да би се редукција извршила, **3DQ-A2** и бензил-хлорид помешани су у присуству AgOTf, ради формирања *N*-бензил бензоцинолинијум интермедијера **3DQ-A2-I** (принос од 93%) [388]. Субсеквентно додавање Hünig-ове базе у DMF кап по кап резултовало је настанком раствора једињења **3DQ-A2-II** тамно љубичасте боје [388]. Раствор **3DQ-A2-II** неутрализован је са 1*N* HCl (450 μL, 1*N*) све док није дошло до промене боје из тамно љубичасте у наранџасту као резултат синтезе **3DQ-A3** (принос 93%) [388], једињења прекристалисаног из метанола.

Стехиометријским додавањем 2-(4-хлорофенокси)-*N*-метилеатанамина у етанолски раствор **3DQ-A3**, у условима рефлукса са безводним калијум-карбонатом, добијена је смеша **3DQ-Pro-1a** и **3DQ-Pro-1a*** (приноси од 44,2% и 36,4%, респективно), што је потврђено помоћу TLC-а (CHCl₃:EtOAc = 6:4 v/v као елуент) након чега су конституенти смеше раздвојени флеш хроматографијом на колони силика гела (CHCl₃:EtOAc:NH₃ = 50:20:10 v/v/v као елуент). Деривати **3DQ-1a** и **3DQ-1a*** добијени су деметилацијом једињења **3DQ-Pro-1a** и **3DQ-Pro-1a*** у приносу од 90%, респективно, коришћењем борон-трибромида (2 еквивалента по метокси функцији) у сувом дихлорометану на 0°C [389]. Финални продукти пречишћени су хроматографијом на колони силика гела (Et₂O:EtOAc = 75:25 v/v као елуент) [389].

Резултати и дискусија

Интерпретација спектралних података за једињења **3DQ-1a** и **3DQ-1a***

Синтеза **3DQ-1a** започета је циљаном конструкцијом **3DQ-A1** (Додатни материјал II: Сlike ДМ1-ДМ4), језгра базираног на 4-амино-3-(2-амино-4-хидроксифенил)-7-хидрокси-2*H*-хромен-2-ону чије су хидроксилне групе кумарина на положају C7 или фенолне хидроксилне биле циљано иницијално заштићене метил групама. Успешно извођење Perkin-ове кондензације потврђено је препознавањем кључних сигнала унутар спектралних података који су припадали језгру 4-амино-5,6-дихидро-2*H*-пиран-2-она, односно који су били последица затварања прстена кумарина. Тако су ¹³C NMR (Додатни материјал II: Слика ДМ2) и ¹⁷O NMR (Додатни материјал II: Слика ДМ4) сигнали на 165,57 односно 337,20 ppm потекли од лактонске карбонилне функционалне групе, док је етарски кисеоник уочен унутар ¹⁷O NMR спектра на 216,30 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ4). Надаље, угљеникови атоми C3=C4-NH₂ лактамског фрагмента, били су уочљиви у виду пикова на 81,89 односно 155,03 ppm у ¹³C NMR спектру (Додатни материјал II: Слика ДМ2), док је примарни амин на положају C4 кумаринског језгра (тј. положај N5 језгра 2,8-дихидрокси-5*H*-хромено[4,3-с]цинолин-11(6*H*)-она, односно азот који је означен као азот N₁) био окарактерисан оштрим мултиплетом унутар ¹H NMR спектра на 5,58 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ1), односно ¹⁵N NMR пиком на -287,80 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ3). Поред настанка 4-амино-2*H*-хромен-2-он као под-структуре, још једно важно постигнуће циљане синтезе било је увођење додатног примарног амина (тј. положаја N6 на језгру 2,8-дихидрокси-5*H*-хромено[4,3-с]цинолин-11(6*H*)-она, надаље означеног као азот N₂), односно *o*-NH₂ функционалне групе која је потицала из 3-метоксианилина као супституента положаја C3 кумарина. С тим у вези, ковалентна веза C3-C6' награђена између језгра кумарина и 3-метоксианилина потврђена је ¹³C NMR сигнаlima на 81,89 односно 115,91 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ2), чиме су се стекли услови за позиционирање *o*-NH₂ функције у близини C3=C4-NH₂ лактамског фрагмента (потврђено ¹H NMR мултиплетом на 6,11 ppm, Додатни материјал II: Слика ДМ1, ¹³C NMR сигналом на 148,55 ppm, Додатни материјал II: Слика ДМ2, те ¹⁵N NMR пиком на -308,40 ppm, Додатни материјал II: Слика ДМ3) Коначно, увођење две метокси групе у структуру синтона **3DQ-A1**, потврђено је ¹H NMR дублетом на 3,79 ppm, где је синглет на 3,79 ppm потицао од *p*-OCH₃ групе 3-метоксианилина а синглет на 3,80 ppm од кумаринске C7-OCH₃ групе (Додатни материјал II: Слика ДМ1), затим ¹³C NMR мултиплетом на 56,04 ppm (Додатни

Докторска дисертација Незрине Куртановић

материјал II: Слика ДМ2), као и одговарајућим ^{17}O NMR синглетима на 63,00 ppm и 50,70 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ4).

Оксидација **3DQ-A1** која је уследила, резултовала је стварањем бензо[с]хинолонског фрагмента унутар структуре **3DQ-A2** (Додатни материјал II: Слика ДМ5-ДМ8), у којем је настанак везе -N=N- потврђен појавом ^{15}N NMR дублета на 70,05 ppm (сигнал за N_1 на 67,90 ppm, пик за N_2 на 72,20 ppm, Додатни материјал II: Слика ДМ7). Због формирања -N=N- везе, положај C4 унутар двоструке везе емитовао је на нижој вредности поља унутар ^{13}C NMR спектра (150,47 ppm, Додатни материјал II: Слика ДМ6).

Интермедијерни **3DQ-A2** затим је претворен у *N*-бензил бензоцинолинијумску форму (**3DQ-A2-I**, Додатни материјал II: Слика ДМ9-ДМ11), чије је формирање индиректно потврђено континуираним смањењем ^{13}C NMR поља за положај C4 унутар **3DQ-A2-I** (синглет на 145,99 ppm, Додатни материјал II: Слика ДМ10), као последица супституције са позитивно наелектрисаним азотом. Коначно, неутрализација **3DQ-A2-I** до **3DQ-A2-II** (Додатни материјал II: Слика ДМ12-ДМ14) резултовала је потпуним губитком сигнала положаја C4 у ^{13}C NMR спектру (Додатни материјал II: Слика ДМ13). Даља конверзија **3DQ-A2-II** у **3DQ-A3** (Додатни материјал II: Слика ДМ15-ДМ18) потврђена је појавом сигнала асоцираних са атомима азота хидразинског типа, односно присуством ^1H NMR синглета на 5,70 ppm и 4,73 ppm за N_1 и N_2 (Додатни материјал II: Слика ДМ15), као и ^{15}N NMR синглета на -92,10 ppm за N_1 (Додатни материјал II: Слика ДМ17).

Користећи **3DQ-A3** као полазну компоненту, формирана су једињења **3DQ-1a** и **3DQ-2a**. Тако, супституција било положаја N_1 или положаја N_2 2-(4-хлорофенокси)-*N*-метилетанамином, у сврху синтезе **3DQ-Pro-1a** (Додатни материјал II: Слика ДМ19-ДМ22) и **3DQ-Pro-1a*** (Додатни материјал II: Слика ДМ23-ДМ26), респективно, била је евидентна губитком ^1H NMR синглета на 5,66 ppm и померањем сигнала за N_2 на 5,12 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ19) за **3DQ-Pro-1a**, односно губитком ^1H NMR синглета на 5,66 ppm и променом положаја сигнала за N_1 на 5,88 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ23) за **3DQ-Pro-1a***, што је био доказ успешног раздвајања интермедијера хроматографијом на колони. Инкорпорирање додатног ароматичног језгра окарактерисано је постојањем карактеристичних ^1H NMR и ^{13}C NMR сигнала. Етаноламински мост унутар **3DQ-Pro-1a**, односно **3DQ-Pro-1a***, био је препознат

Резултати и дискусија

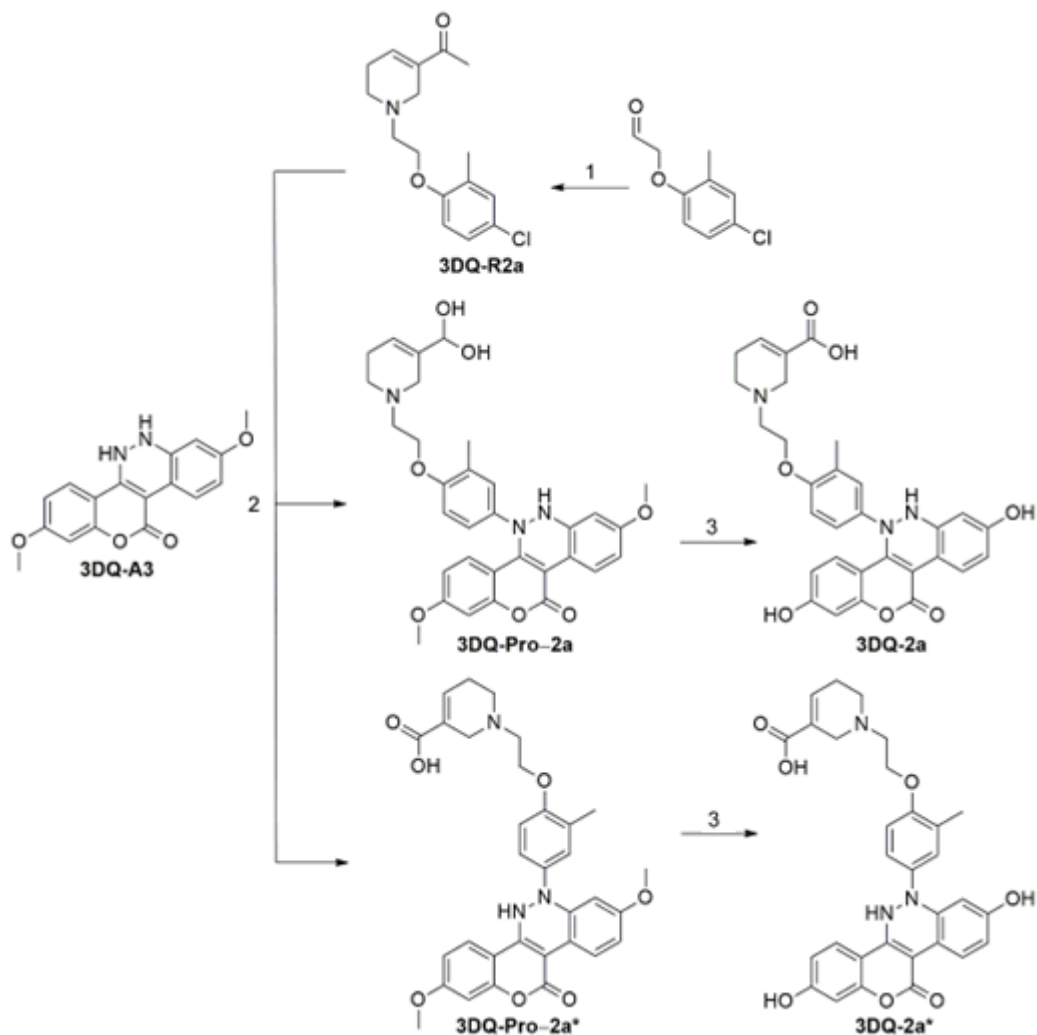
појавом ^{17}O NMR синглета на 78,00 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ22 и ДМ26), који су потицали од *p*-O атома, пикова унутар ^{13}C NMR спектра на 67,03 и 50,93 ppm за метиленске остатке вициналне атомима кисеоника и азота (Додатни материјал II: Сlike ДМ20 и ДМ24), односно ^{15}N NMR сигнала на -352,00 ppm које је емитовао атом азота из *N*-метил функционалне групе (Додатни материјал II: Сlike ДМ21 и ДМ25, респективно). Додатно, атом угљеника из *N*-CH₃ групе разликовао се од атома угљеника из *O*-CH₃ групе сходно појави синглета унутар ^1H NMR спектра на 1,84 (Додатни материјал II: Слика ДМ19) односно 2,54 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ23), тим редоследом, као и на основу појаве синглета унутар ^{13}C NMR спектра на 36,52 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ20 и ДМ24).

На крају, деметилација *p*-OCH₃ групе 3-метоксианилина и *C*7-OCH₃ групе кумарина, за потребе добијања **3DQ-1a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ27-ДМ30) односно **3DQ-1a*** (Додатни материјал II: Сlike ДМ31-ДМ34), потврђена је одсуством претходно поменутих ^1H NMR и ^{13}C NMR спектралних података, те појавом ^1H NMR синглета на 5,06 и 5,03 ppm које је емитовала *p*-OH група 3-аминофенола, односно синглета на 5,39 и 5,44 ppm проистеклих из *C*7-OH групе кумарина (Додатни материјал II: Сlike ДМ27 и ДМ31), респективно. Надаље, претходно забележени синглети унутар ^{17}O NMR спектра замењени су новим на 93,30 и 88,00 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ30 и ДМ34), чиме су реакције деметилације потврђене.

Синтеза једињења **3DQ-2a** и **3DQ-2a***

За потребе синтезе деривата **3DQ-2a** и **3DQ-2a*** (Шема 3.2) претходно је припремљен синтон **3DQ-R2a** (принос 88%), алкиловањем комерцијално доступне 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбонске киселине са комерцијално доступним 2-(4-хлоро-2-метилфенокси)ацеталдехидом, уз коришћење натријум-борхидрида у 2,2,2-трифлуороетанолу [390]. Додавањем еквимоларне количине **3DQ-R2a** у етанолски раствор **3DQ-A3**, у условима рефлукса и присуству безводног калијум-карбоната, формирала се смеша једињења **3DQ-Pro-2a** и **3DQ-Pro-2a*** у приносима од 46% и 41% из које су једињења **3DQ-2a** и **3DQ-2a*** добијени у приносу од 95% слично претходно описаним аналозима **3DQ-1a** и **3DQ-1a*** [389].

Шема 3.2. Синтеза једињења **3DQ-2a** и **3DQ-2a**^{*a}



^aРеагенси и услови: (1) 1,2 екв. NaBH₄, 2,2,2-трифлуороетанол, 40°C, 90 мин; (2) K₂CO₃, EtOH, рефлукс; (3) BBr₃, CH₂Cl₂, 0°C, 3h, рефлукс.

Интерпретација спектралних података за једињења 3DQ-2a и 3DQ-2a^{*}

Синтези **3DQ-2a** и **3DQ-2a**^{*} из **3DQ-A3** претходила је синтеза **3DQ-R2a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ35-ДМ38). Тако, купловањем 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине са 2-(4-хлоро-2-метилфенокси)ацеталдеhidом настала је C-N веза, квантификована ¹H NMR мултиплетом на 2,80 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ35), ¹³C NMR синглетом на 54,64 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ36) и ¹⁵N NMR синглетом на -330,10 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ37). Хидроксилна функционална група унутар карбоксилатног остатка 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине појавила се као ¹⁷O NMR синглет на 253,90 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ38), док је

Резултати и дискусија

карбонилна група уочена у виду ^{13}C NMR синглета на 166,47 и 337,20 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ36). Наравно, двострука веза унутар 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине емитовала је унутар ^{13}C NMR спектра на 126,73 и 142,15 ppm. Са друге стране, *p*-O, *p*-Cl и *o*-CH₃ функционалне групе уведене заједно са 2-(4-хлоро-2-метилфеноски)ацеталдехидом, детектоване су унутар ^{13}C NMR спектра на 155,18, 127,71 и 130,76 ppm, тим редоследом (Додатни материјал II: Слика ДМ36), док је *o*-CH₃ супституент квантификован ^1H NMR мултиплетом на 2,39 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ35) и ^{13}C NMR синглетом на 16,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ36).

Кондензација **3DQ-R2a** са **3DQ-A3** очекивано је кулминирала субституцијом било N_1 или N_2 , да би се добили **3DQ-Pro-2a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ39-ДМ42) и **3DQ-Pro-2a*** (Додатни материјал II: Сlike ДМ43-ДМ46). Као и раније, постојање ^1H NMR пикова на 5,00 или 5,82 ppm, за атом N_2 у структури **3DQ-Pro-2a** односно атом N_1 у структури **3DQ-Pro-2a*** (Додатни материјал II: Сlike ДМ39 и ДМ43), значило је да је раздвајање интермедијера хроматографијом на колони било више него успешно. Додатни доказ одвијања овакве кондензације пронађен је у ^{13}C NMR сигнаlima при 137,61 и 141,94 ppm за **3DQ-Pro-2a**, односно за **3DQ-Pro-2a*** (Додатни материјал II: Сlike ДМ40 и ДМ44), респективно, које су емитовале C- N_1 везе, формиране уместо *p*-Cl супституисаних угљеникових атома.

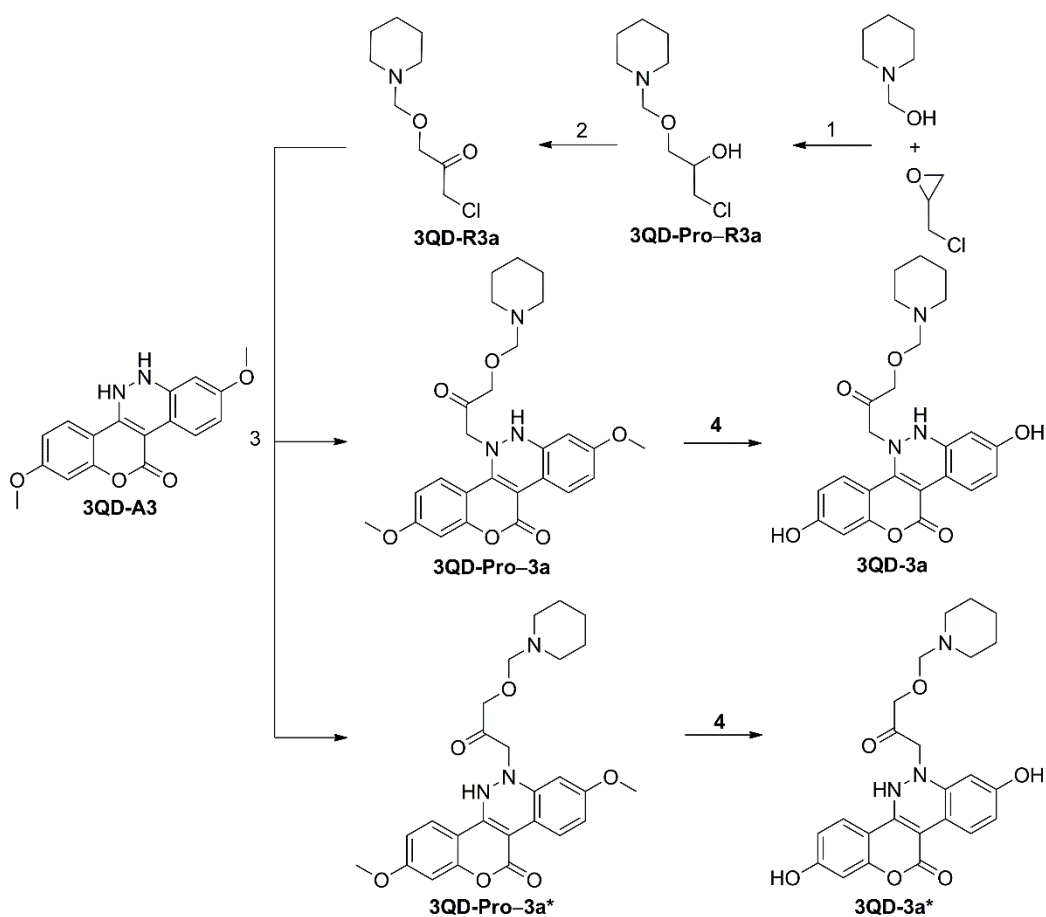
Наравно, трансформација **3DQ-Pro-2a** и **3DQ-Pro-2a*** у **3DQ-2a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ47-ДМ50) и **3DQ-2a*** (Додатни материјал II: Сlike ДМ51-ДМ54) потврђена је реакцијама деметиловања C7-OCH₃ групе из кумарина односно *p*-OCH₃ групе 3-метоксианилина: ^1H NMR сигнали на 5,39 (5,46) и 5,06 (5,04) ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ47 и ДМ51) и ^{17}O NMR синглети на 93,30 и 88,00 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ50 и ДМ54) сведочили су да је деметилација извршена успешно.

Синтеза једињења **3DQ-3a** и **3DQ-3a***

Као и у случају синтезе **3DQ-A2**, синтон **3DQ-A3** употребљен је као полазно једињење за припрему **3DQ-3a** и **3DQ-3a*** (Шема 3.3). Како би синтеза била успешно извршена, најпре је припремљен рацемични алкохол **3DQ-Pro-R3a** у приносу од 97.5% из пиперидин-1-илметанола и (±)-епихлорохидрина, коришћењем LiBr као

катализатора на 0°C, и пречишћен хроматографијом на колони силика гела (*n*-хексан:EtOAc: =85:15 v/v као елуент) [391]. Потом је **3DQ-Pro-R3a** оксидован до једињења **3DQ-R3a** у високом приносу (95%) са H₂O₂ [392], на собној температури у условима без растварача и коришћењем 3,5-диметилпиразолијум-флуорохромата(VI) као катализатора (односно C₅H₈N₂H[CrO₃F], DmpzHFC), припремљеног како је описано на другом месту [393]. Једињења **3DQ-3a** (у приносу од 95%) и **3DQ-3a*** (у приносу од 95%) добијена су из **3DQ-R3a** преко **3DQ-Pro-3a** (у приносу од 46%) и **3DQ-Pro-3a*** (у приносу од 41%), спајањем реагенса са **3DQ-A3**, коришћењем идентичне процедуре као за припрему **3DQ-1a** и **3DQ-1a*** [389].

Шема 3.3. Синтеза једињења **3DQ-3a** и **3DQ-3a***^a



^aРеагенси и услови: (1) LiBr, 0°C, 5 мин, DMC; (2) H₂O₂, DmpzHFC, 2 min, собна температура; (3) K₂CO₃, EtOH, рефлукс; (4) BBr₃, CH₂Cl₂, 0°C, 3h, рефлукс.

Интерпретација спектралних података за једињења **3DQ-3a** и **3DQ-3a***

Крајња улога **3DQ-A3** као реактанта била је да омогући синтезу једињења **3DQ-**

Резултати и дискусија

3a и **3DQ-3a***. С тим у вези најпре је било потребно синтетисати **3DQ-Pro-R3a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ55-ДМ58) и **3DQ-R3a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ59-ДМ62). Тако су S_N2 отварање епоксида 2-(хлорометил)оксирана и супституција нуклеофила из растварача са примарном хидроксилном групом пиперидин-1-илметанола која је уследила, резултовали синтезом **3DQ-Pro-R3a**, при чему су описане реакције најпрецизније окарактерисане ^{17}O NMR синглетом на 10,80 ppm (Додатни материјал II: S58), као и сигнаlima унутар ^1H NMR и ^{13}C NMR спектра на 4,98 и 69,58 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ55 и ДМ56, респективно), док је формирање нове етарске везе нотирано ^{17}O NMR синглетом на 18,00 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ58).

Редукција **3DQ-Pro-R3a** до **3DQ-R3a** потврђена је након губитка ^1H NMR сигнала хидроксилне групе (Додатни материјал II: Сlike ДМ59), као и препознавањем карбонилне групе као синглета унутар ^{13}C NMR спектра на 201,58 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ60).

Након тога, кондензација терминалног угљеника $-\text{CH}_2\text{-Cl}$ функционалне групе једињења **3DQ-R3a** са **3DQ-A3**, у циљу синтезе **3DQ-Pro-3a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ63-ДМ66) односно **3DQ-Pro-3a*** (Додатни материјал II: Сlike ДМ67-ДМ70), потврђена је појавом ^1H NMR синглета за **3DQ-Pro-3a** и **3DQ-Pro-3a*** на 5,71 и 5,47 (Додатни материјал II: Сlike ДМ63 и ДМ67), ^{13}C NMR синглета на 59,09 и 62,88 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ64 и ДМ68) и ^{15}N NMR синглета at -244,00 и -92,10 ppm, које су емитовали $-\text{CH}_2\text{-N}_1$ (**3DQ-Pro-3a**) или $-\text{CH}_2\text{-N}_2$ (**3DQ-Pro-3a***) фрагменти, респективно.

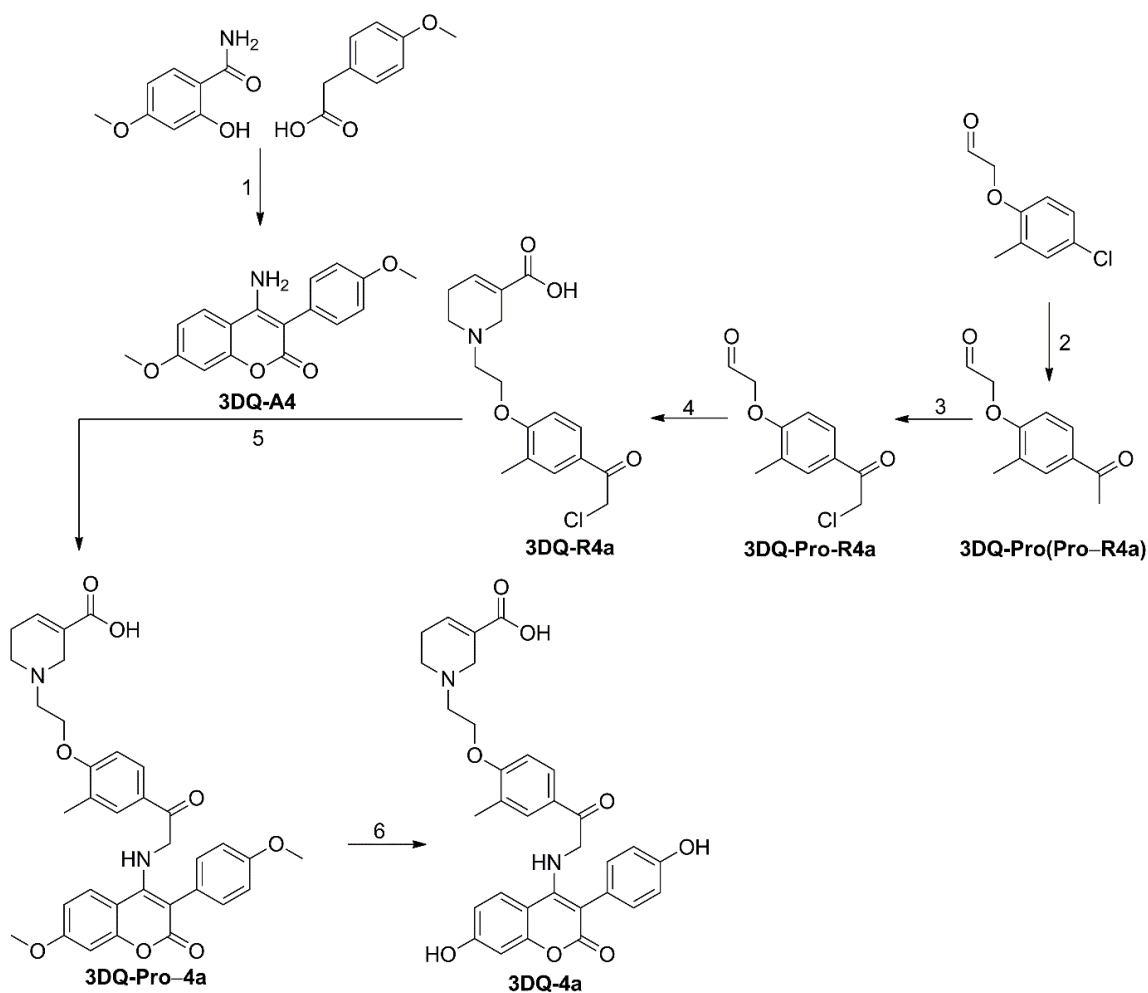
Деметилација **3DQ-Pro-3a** или **3DQ-Pro-3a*** у сврху синтезе **3DQ-3a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ71-ДМ74) или **3DQ-3a*** (Додатни материјал II: Сlike ДМ75-ДМ78), потврђена је очекиваним спектралним подацима.

Синтеза једињења **3DQ-4a**

Једињење **3DQ-4a** (Шема 3.4) припремљено је након синтезе 4-аминокумаринског деривата **3DQ-A4** (у приносу од 80,12%) Рецкман-овом кондензацијом [386] 2-хидрокси-4-метоксибензамида са комерцијално доступном 2-(4-метоксифенил)сирћетном киселином. Надаље, **3DQ-A4** је куплован са **3DQ-R4a** [390], реагенсом припремљеним у корацима које следе. Синтеза поменутог реагенса започета

је оксидативним купловањем 2-(4-хлоро-2-метилфенокси)ацеталдехида са триетиламином катализованом паладијумом, у присуству ТВАВ (*n*-Bu₄NBr), ZnO и DMSO као растварача, након чега је добијен интермедијер **3DQ-Pro(Pro-R4a)** (у приносу од 81%), који је накнадно хлорисан до једињења **3DQ-Pro-R4a** (принос од 95%) [394]. Добијени алдехид је потом кондензован са комерцијално доступном 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином, уз коришћење натријум-борхидрида као редукционог средства у 2,2,2-трифлуороетанолу, да би се добио је **3DQ-R4a** [390]. Наравно, кондензација **3DQ-R4a** са **3DQ-A4**, резултовала је двостепеном синтезом једињења **3DQ-4a** (у приносу од 90%), уз коришћење познатих синтетичких протокола [389].

Шема 3.4. Синтеза једињења **3DQ-4a**



^aРеагенси и услови: (1) Ac₂O, безводни NEt₃, 180°C, 18 h, затим K₂CO₃, RT, 6 h; (2) NEt₃, PdCl₂(MeCN)₂, H₂O, ТВАВ (1,5 екв.), ZnO (1,3 екв.), DMSO, 100°C, 6 h; (3) млаз Cl₂, 45 мин, 0°C; (4) 1,2 екв. NaBH₄, 2,2,2-трифлуороетанол, 40°C, 90 мин; (5) K₂CO₃, EtOH, рефлукс; (6) VBr₃, CH₂Cl₂, 0°C, 3h, рефлукс.

Резултати и дискусија

Интерпретација спектралних података за једињење **3DQ-4a**

Две су најзначајније разлике у синтези једињења **3DQ-4a** у поређењу са продукцијом **3DQ-2a** и **3DQ-2a***: (1) замена **3DQ-A3** као почетног синтона, обзиром на чињеницу да је поступак био усмерен ка избегавању N_2 атома; и (2) структурне модификације **3DQ-R4a** у поређењу са **3DQ-R3a**, у смислу замене *p*-Cl атома са 1-хлоропропан-2-оном. Тако је конструкција 4-амино-7-метокси-3-(4-метоксифенил)-2H-хромен-2-она (**3DQ-A4**, Додатни материјал II: Сlike ДМ79-ДМ82) потврђена уочавањем ^1H NMR мултиплета на 5,62 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ79) и ^{15}N NMR синглета на -287,80 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ81), откривајући постојање N_1 примарног амина. Преостали сигнали за функционалне групе **3DQ-A4**, заједнички са **3DQ-A3**, рутински су откривени у структури **3DQ-A4** интерпретацијом одговарајућих ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{15}N NMR, ^{17}O NMR спектра (Додатни материјал II: Сlike ДМ79-ДМ82).

С друге стране, синтеза **3DQ-4a** из **3DQ-A4** била је условљена синтезом **3DQ-Pro(Pro-R4a)** (Додатни материјал II: Сlike ДМ83-ДМ85), **3DQ-Pro-R4a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ86-ДМ88) и **3DQ-R4a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ89-ДМ92). Тако је синтеза **3DQ-Pro(Pro-R4a)** окарактерисана супституцијом *p*-Cl групе унутар 2-(4-хлоро-2-метилфенокс)ацеталдехида карбонилном. Новоуведена ацетил група препозната је у виду ^1H NMR мултиплета на 2,51 ppm, емитовањем сигнала метил групе (Додатни материјал II: Слика ДМ83), као и препознавањем ^{13}C NMR синглета приписаних карбонилној и метил групи на 197,37 и 27,79 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ84). Потом је супституција новоуведене ацетил групе атомом хлора унутар **3DQ-Pro-R4a** потврђена постојањем мултиплета проистеклог из метиленске функционалне групе на 4,55 ppm унутар ^1H NMR спектра (Додатни материјал II: Сlike ДМ86), као и угљеничног костура исте у виду ^{13}C NMR синглета на 49,36 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ87). Већ окарактерисано купловање алдехида са 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином (**3DQ-R4a**, Додатни материјал II: Сlike ДМ89-ДМ92) верификовано је сигнаlima који су одговарали онима код **3DQ-R2a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ35- ДМ38).

Коначно, кондензација **3DQ-R4a** са **3DQ-A4** потврђена је појавом сигнала података унутар ^1H NMR, ^{13}C NMR и ^{15}N NMR спектра које је емитовала новонастала -CH₂-NH- веза у структурама **3DQ-Pro-4a** (Додатни материјал II: Сlike ДМ93-ДМ96) и

Докторска дисертација Незрине Куртановић

3DQ-4a (Додатни материјал II: Сlike ДМ97-ДМ100): за атом угљеника пронађени су одговарајући ^1H NMR и ^{13}C NMR сигнали на 4,31 (4,35) и 51,87 (51,87) ppm, респективно, за атом азота ^1H NMR и ^{15}N NMR пикови на 6,28 (8,63) ppm и -271,80 (-271,80) ppm, тим редоследом. Наравно, конверзија **3DQ-Pro-4a** до **3DQ-4a** потврђена је реакцијама деметилације: хидроксилна група на положају C7 кумарина откривена је интерпретацијом ^1H NMR синглета на 5,33 ppm и ^{17}O NMR синглета на 93,90 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ97 и ДМ100), док је фенолна -ОН група емитовала у ^1H NMR спектру на 12,41 ppm (помак ка вишем пољу највероватније због одсуства N_2 , Додатни материјал II: Сlike ДМ97), односно у ^{17}O NMR спектру на 88,50 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ100).

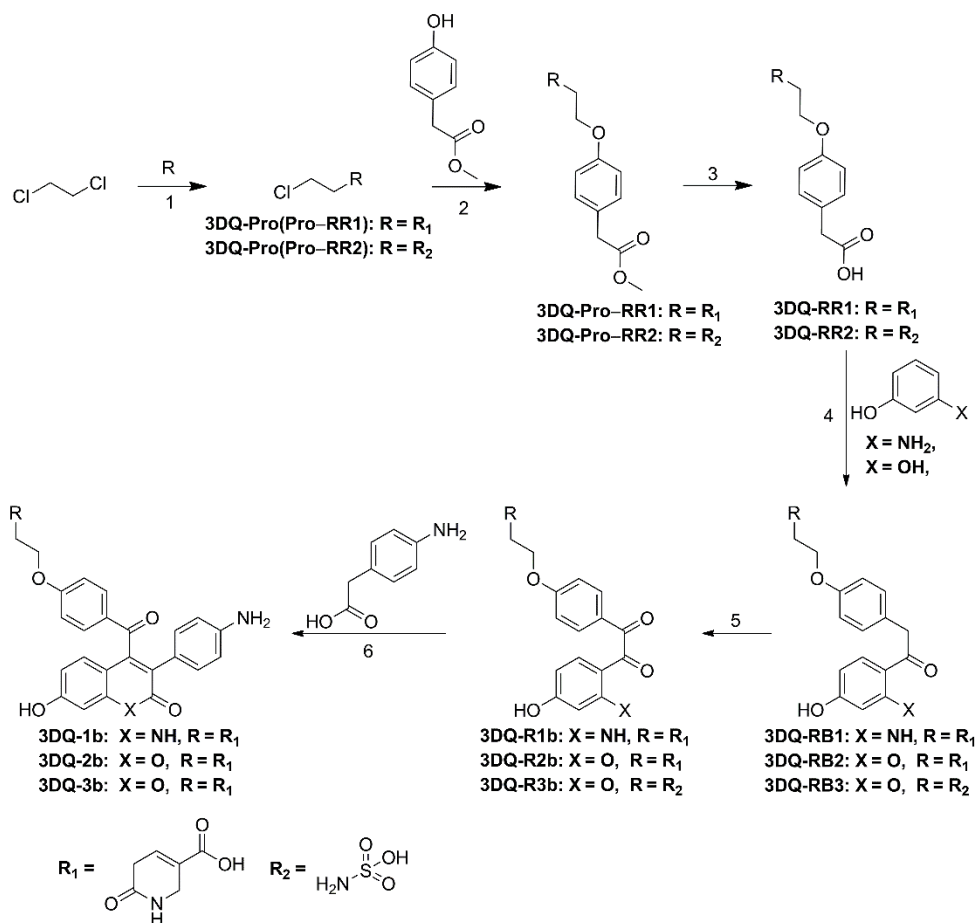
Синтеза једињења **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b**

Присуство карбонилне групе на положају C4 било хинолин-2(1*H*)-онског језгра једињења **3DQ-1b** или кумаринског језгра једињења **3DQ-3b**, захтевало је другачију стратегију у синтези (Шема 3.5). Тако, за припрему једињења **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b**, реагенси **3DQ-Pro(Pro-RR1)** и **3DQ-Pro(Pro-RR2)** претходно су припремљени у високим приносима (95%), реакцијом алкиловања 1,2-дихлороетана са 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином или сулфаминском киселином, рефлуктовањем у медијуму калијум-карбоната, калијум-јодида и ацетона [395]. Даље купловање **3DQ-Pro(Pro-RR1)** или **3DQ-Pro(Pro-RR2)** са метил 2-(4-хидроксифенил)ацетатом, у диметилформаиду и безводном калијум карбонату, под рефлуксом и безводним условима [396], резултовало је синтезом интермедијера **3DQ-Pro-RR1** и **3DQ-Pro-RR2** у приносима од по 95%. Након тога, селективна хидролиза метил-естара [397] са литијум хлоридом у диметилформаиду, уз коришћење микроталасног зрачења, резултовала је синтезом деривата карбоксилних киселина **3DQ-RR1** и **3DQ-RR2** у приносу од 95%. Субсеквентна Friedel-Crafts-ова ацилација било 3-аминофенола са **3DQ-RR1** или резорцинола са **3DQ-RR1** или **3DQ-RR2**, уз коришћење $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, као катализатора и растварача у атмосфери засићеној аргоном, довела је до синтезе деоксибензоинских деривата **3DQ-RB1** (на бази 3-аминофенола), **3DQ-RB2** (на бази резорцинола), односно **3DQ-RB3** (на бази резорцинола) у приносима од 95% [398]. Оксидација метилених функционалних група присутних у структурама **3DQ-RB1**, **3DQ-RB2** или **3DQ-RB3** до карбонилне извшена је уз помоћ селенијум-диоксида у раствору диоксана и воде (однос 19:1), дајући једињења **3DQ-**

Резултати и дискусија

R1b, **3DQ-R2b** и **3DQ-R3b** у приносу од 91, 90, односно 92% [398]. На крају су језгра хинолин-2(1*H*)-она или кумарина добијена кондензацијом **3DQ-R1b**, **3DQ-R2b** и **3DQ-R3b** са 2-(4-аминофенил)сирћетном киселином у ацетону, у присуству калијум карбоната, под рефлуксом и безводним условима; финални производи **3DQ-1b**, **3DQ-2b** или **3DQ-3b** добијени су у приносима од 91, 90, односно 89% након пречишћавања и рекристализације из метанола.

Шема 3.5. Синтеза једињења **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b**^a



^aРеагенси и услови: (1) 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилна киселина или сулфаминска киселина, K₂CO₃, KI, ацетон, рефлукс, 72 h; (2) DMF, безводни K₂CO₃, 100°C (3) LiCl/DMF, MWI; 30 мин; (4) BF₃·OEt₂, Ar, 85°C; (5) SeO₂, 1,4-диоксан/H₂O; (19:1), 110°C; (6) ацетон, K₂CO₃, рефлукс, 4–5 h.

Интерпретација спектралних података за једињења 3DQ-1b до 3DQ-3b.

Синтеза **3DQ-Pro(Pro-RR1)** (Додатни материјал II: Сlike ДМ101-ДМ104) и **3DQ-Pro(Pro-RR2)** (Додатни материјал II: Сlike ДМ105-ДМ108) била је од пресудне важности за крајњу продукцију **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b**. Тако, купловањем 6-оксо-

Докторска дисертација Незрине Куртановић

1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине са 1,2-дихлоретаном (односно синтезом **3DQ-Pro(Pro-RR1)**) недвосмислено је потврђено присуством ^{15}N NMR синглета на - 287,10 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ103), који се односио на супституцију азота пореклом из 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине. Штавише, sp^3 хибридизовани угљеник N-C везе (бивши 1,2-дихлороетански угљеник) унутар структуре **3DQ-Pro(Pro-RR1)** препознат је у виду ^1H NMR синглета на 3,18 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ101), као и у виду ^{13}C NMR синглета на 49,61 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ102). Са друге стране, sp^3 хибридизовани угљеник C-C1 везе препознат је унутар ^1H NMR мултиплета на 3,74 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ101), као и ^{13}C NMR синглетом на 41,63 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ102). Надаље, хидроксилни део карбоксилне групе 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине констатован је на хемијском померању од 13,24 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ101) односно на 253,90 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ104) унутар ^1H NMR и ^{17}O NMR спектра у облику оштрих синглета, док је карбонилна функционална група емитовала као ^{13}C NMR синглет на 166,47 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ102) односно као ^{17}O NMR синглет на 337,20 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ104). Двострука веза на положају C3 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине, која је била носилац карбоксилне групе, препозната је помоћу ^{13}C NMR синглета на 124,96 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ102), док је позиција C4 нотирана као ^1H NMR синглет на 7,44 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ101) и ^{13}C NMR синглет на 130,74 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ102). Надаље, C6 карбонилна група емитовала је као ^{13}C NMR синглет на 167,89 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ102) и ^{17}O NMR синглет од 346,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ104). Што се тиче положаја преосталих угљеникових атома прстена 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине, положај C2 препознат је помоћу ^1H NMR синглета на 4,20 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ101) односно ^{13}C NMR синглета на 42,77 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ102), док је позиција C5 била евидентна након интерпретације ^1H NMR мултиплета на 2,85 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ101) и ^{13}C NMR синглета на 33,68 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ102).

Што се тиче синтезе **3DQ-Pro(Pro-RR2)**, супституција 1,2-дихлороетана сулфанилном киселином потврђена је појавом синглета унутар ^{15}N NMR спектра на - 114,90 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ107). Одговарајући sp^3 хибридизовани угљеник N-C везе емитовао је као ^1H NMR мултиплет на 3,04 ppm (Додатни материјал

Резултати и дискусија

II: Слика ДМ105) и као ^{13}C NMR синглет на 49,61 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ106). Са друге стране, sp^3 хибридовани угљеник C-C1 везе препознат је унутар ^1H NMR мултиплета на 3,53 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ105), као и у виду ^{13}C NMR синглета на 42,78 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ106). Надаље, хидроксилна група сумпорне киселине уочена је у облику ^1H NMR синглета на 12,23 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ105) и ^{17}O NMR синглета на 150,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ108), док су карбонилне групе емитовале као ^{17}O NMR мултиплети на 143,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ108).

Даља купловања **3DQ-Pro(Pro-RR1)** и **3DQ-Pro(Pro-RR2)** са метил 2-(4-хидроксифенил)ацетатом, ради синтезе **3DQ-Pro-RR1** (Додатни материјал II: Слика ДМ109-ДМ112) и **3DQ-Pro-RR2** (Додатни материјал II: Слика ДМ113-ДМ116), респективно, потврђена су хемијским померањем sp^3 хибридованог угљеника бивше C-C1 везе из **3DQ-Pro(Pro-RR1)** и **3DQ-Pro(Pro-RR2)** зарад остваривања везе са кисеоником некадашње хидроксилне групе метил 2-(4-хидроксифенил)ацетата (доказ је био одсуство било каквог сигнала -OH групе унутар ^1H NMR, ^{13}C NMR или ^{17}O NMR спектра за **3DQ-Pro-RR1** и **3DQ-Pro-RR2**, Додатни материјал II: Сlike ДМ109-ДМ116). Тако, унутар структура једињења **3DQ-Pro-RR1** и **3DQ-Pro-RR2** разматрани угљеников атом препознат је у ^1H NMR спектрима на 4,14 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ109 и ДМ113), односно унутар ^{13}C NMR спектра на 66,18 и 67,10 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ110 и ДМ114), респективно. Надаље, формирање -CH₂-O- везе унутар сваког од прекурсора такође је потврђено путем ^{17}O NMR синглета на 78,00 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ112 и ДМ116).

Преостали део метил 2-(4-хидроксифенил)ацетата окарактерисан је очекиваним спектралним подацима: унутар структура **3DQ-Pro-RR1** и **3DQ-Pro-RR2** бензенски прстен препознат је у виду ^1H NMR мултиплета на 6,85 и 6,97 ppm, односно 7,37 и 7,42 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ109 и ДМ113), као и у виду ^{13}C NMR мултиплета на 114,50 и 114,92 ppm, односно 130,12 и 130,04 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ110 и ДМ114), респективно. Надаље, за свако од једињења, -CH₂- везе између ароматичног прстена и естра номиране су помоћу ^1H NMR мултиплета на 2,81 и 3,57 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ109 и ДМ113), односно помоћу ^{13}C NMR синглета на 40,85 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ110 и ДМ114); карбонилни кисеоник метил ацетата емитовао је у виду ^{17}O NMR синглета на 364,20 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ112 и ДМ116), естарски кисеоник као ^{17}O NMR синглет на 136,60 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ112 и ДМ116); естарска метил група

Докторска дисертација Незрине Куртановић

такође је била потврђена ^1H NMR мултиплетима на 3,76 или 3,73 ppm (Додатни материјал II: Слике ДМ109 и ДМ113) или ^{13}C NMR синглетима на 51,82 ppm (Додатни материјал II: Слике ДМ110 и ДМ114).

Наравно, једињења **3DQ-RR1** (Додатни материјал II: Слика ДМ117-ДМ120) и **3DQ-RR2** (Додатни материјал II: Слика ДМ121-ДМ124) припремљена су за додатну структурну оптимизацију уклањањем естарске метил групе из одговарајућих прекурсора (реакција која је окарактерисана губитком одговарајућих сигнала метил групе било унутар ^1H NMR или ^{13}C NMR спектра, Додатни материјал II: Слике ДМ109, ДМ110, ДМ113 и ДМ114, респективно), односно појавом хидроксилне групе у ^1H NMR (Додатни материјал II: Слике ДМ117 и ДМ121) и ^{17}O NMR спектрима (Додатни материјал II: Слике ДМ120 и ДМ124): констатовани су ^1H NMR синглети на 14,99 и 17,71 ppm (Додатни материјал II: Слике ДМ117 и ДМ121) и ^{17}O NMR мултиплет на 270,70 ppm (Додатни материјал II: Слике ДМ120 и ДМ124), респективно.

По синтези, **3DQ-RR1** је употребљен за ациловање 3-аминофенола како би се добио деоксибензоин **3DQ-RB1** (Додатни материјал II: Слике ДМ125-ДМ128), док су оба молекула, **3DQ-RR1** и **3DQ-RR2**, употребљени за ациловање ресорцинола у сврху добијања деоксибензоина **3DQ-RB2** (Додатни материјал II: Слике ДМ129-ДМ132) и **3DQ-RB3** (Додатни материјал II: Слике ДМ133-ДМ136). Тако је увођење 3-аминофенола у структуру **3DQ-RB1** потврђено појавом ^1H NMR мултиплета на 6,86 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ125) и ^{15}N NMR синглета на -308,40 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ127), чиме је потврђено присуство *o*-NH₂ групе, као и појавом ^1H NMR синглета на 8,35 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ125) односно ^{17}O NMR синглета на 88,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ128) асоцираних са *p*-ОН групом. Структуре једињења **3DQ-RB2** и **3DQ-RB3** међусобно су разликоване на основу *o*-ОН групе, уочене у форми различитих ^1H NMR синглета на 3,48 (Додатни материјал II: Слика ДМ129) односно 8,62 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ133), обзиром да су ^{17}O NMR синглети били на идентичном хемијском померању од 91,50 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ132 и ДМ136).

Након тога, оксидација **3DQ-RB1**, **3DQ-RB2**, и **3DQ-RB3** редом је резултовала синтезом **3DQ-R1b** (Додатни материјал II: Слике ДМ137-ДМ140), **3DQ-R2b** (Додатни материјал II: Слике ДМ141-ДМ144) и **3DQ-R3b** (Додатни материјал II: Слике ДМ145-ДМ148), респективно. Сваки од реактаната оксидован је на -CH₂- мосту, између ароматичног прстена и естарске функционалне групе, што је квантификовано губљењем одговарајућих ^1H NMR сигнала, док је новоуведени атом угљеника

Резултати и дискусија

карбонилне групе емитовао на вишем пољу у ^{13}C NMR спектру, на 192,77 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ138, ДМ142 и ДМ146).

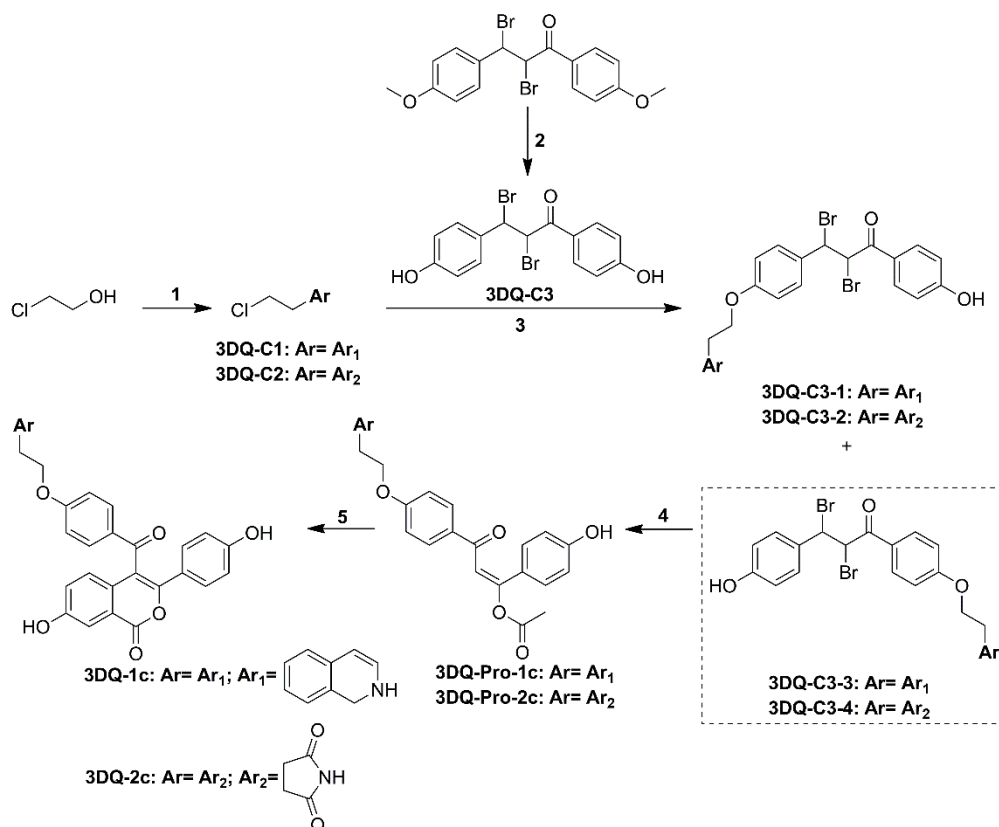
На крају, кондензација **3DQ-R1b**, **3DQ-R2b** или **3DQ-R3b** са 2-(4-аминофенил)сирћетном киселином дала је **3DQ-1b** (Додатни материјал II: Сlike ДМ149-ДМ152), **3DQ-2b** (Додатни материјал II: Сlike ДМ153-ДМ156) или **3DQ-3b** (Додатни материјал II: Сlike ДМ157-ДМ160). Тако, **3DQ-1b** означен је као дериват хинолин-2(1*H*)-она, где је формирање језгра индиректно закључено одсуством ^1H NMR мултиплета за *o*-NH₂ и појавом одговарајућег синглета за -NH- фрагмент на 8,07 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ149), као и померањем ^{15}N NMR сигнала секундарног амина према горњем пољу (синглет на -242,70 ppm, Додатни материјал II: Слика ДМ151). С друге стране, затварање кумаринског прстена код једињења **3DQ-2b** или **3DQ-3b** потврђено је одсуством ^1H NMR пикова за *o*-ОН али и присуством ^{17}O NMR синглета на 216,30 ppm који су потекли од кисеоничног моста (Додатни материјал II: Сlike ДМ156 и ДМ160). Надаље, постојање хинолин-2(1*H*)-она или лактонске карбонилне групе на положају С2 кумаринског језгра у одговарајућим једињењима доказано је постојањем ^{13}C NMR синглета на 163,75 (Додатни материјал II: Слика ДМ150) односно 160,53 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ154 и ДМ158), као и постојањем ^{17}O NMR сигнала на 306,00 (Додатни материјал II: Слика ДМ152) односно 337,20 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ156 и ДМ160), респективно. Формирање -С3=С4- двоструке везе хинолин-2(1*H*)-она или кумарина било је евидентно након губитка карбонилне групе на положају С3 као прекурсора, која се налазила у структурама реактаната **3DQ-RR1** и **3DQ-RR2**, као и лоцирањем ^{13}C NMR пикова на 138,91 и 134,45 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ150), односно 133,73 и 144,68 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ154 и ДМ158), једињења **3DQ-1b**, односно **3DQ-2b** и **3DQ-3b**, тим редоследом. Наравно, супституција положаја С3 хинолин-2(1*H*)-она или кумарина ароматом у структурама **3DQ-1b**, односно **3DQ-2b** и **3DQ-3b**, потврђена је препознавањем ^{13}C NMR синглета који су потицали од угљеникових атома С3-С1' ковалентне везе на 138,81 и 121,76 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ150), односно на 133,73 и 119,48 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ154 и ДМ158). Коначна потврде синтезе **3DQ-1b** односно **3DQ-2b** и **3DQ-3b**, добијена је интерпретацијом сигнала који су додељени хидроксилној групи на положају С7 било хинолин-2(1*H*)-онског или кумаринског језгра, респективно, као и новоуведеној *p*-NH₂ групи која је била заједничка свим једињењима: С7-ОН остварила је трансмисију у виду изолованих ^1H NMR синглета на 5,25 односно 5,73 и 5,45 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ149,

DM153 и DM157), односно у виду ^{17}O NMR синглета на 88,00 или 93,90 ppm (Додатни материјал II: Сlike DM152, DM156 и DM160), док је група $p\text{-NH}_2$ нотирана као ^1H NMR мултиплет на 4,93 односно 5,36 и 5,30 ppm (Додатни материјал II: Сlike DM149, DM153 и DM157) или ^{15}N NMR синглет на -310,30 ppm (Додатни материјал II: Сlike DM151, DM155 и DM159), респективно.

Синтеза једињења 3DQ-1c и 3DQ-2c

Деривати изокумарина **3DQ-1c** и **3DQ-2c** (Шема 3.6) били су припремљени помоћу Rh(III)-катализоване циклизације бензових киселина са 3-алкоксипроп-2-ен-1-онским дериватима [399] **3DQ-Pro-1c** и **3DQ-Pro-2c**.

Шема 3.6. Синтеза једињења **3DQ-1c** и **3DQ-2c**^a



^aРеагенси и услови: (1) 1,2-дихидроизокинолин или пирролидин-2,5-дион, 2-хлороетан-1-ол, K_2CO_3 , KI, ацетон, рефлукс, 72 h; (2) BBr_3 , CH_2Cl_2 , 0°C , 3h, рефлукс; (3) DMF, безводни K_2CO_3 , 100°C , 96 h; (4) CH_3COOH , MeOH, rt, 30 мин; (5) 3-хидроксибензоева киселина, $[\text{RhCr}^*\text{Cl}_2]_2$ (5 mol %), 2 екв. $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, PhMe, 120°C .

Припрема ових деривата започела је еквимоларним алкиловањем било 1,2-дихидроизокинолина (односно Ar_1) или пирролидин-2,5-диона (односно Ar_2) са 2-хлороетанолом, након чега су добијени интермедијерни производи **3DQ-C1** и **3DQ-C2**

Резултати и дискусија

у приносима од по 95% [389]. Синтон **3DQ-C3** (у приносу од 95%) добијен је уклањањем метил група [389] са комерцијално доступног 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-метоксифенил)пропан-1-она и затим је реаговао са еквимоларним количинама било **3DQ-C1** или **3DQ-C2** у раствору DMF и безводног калијум-карбоната, у условима рефлукса, да би се наградили производи **3DQ-C3-1** (у приносу од 48%) и **3DQ-C3-3** (у приносу од 50%), као и **3DQ-C3-2** (у приносу од 44%) и **3DQ-C3-4** (у приносу од 52%), потврђени TLC-ом (Et₂O: EtOAc = 70:30 v/v као елуент) и раздвојени флеш хроматографијом на колони силика гела (Et₂O: EtOAc = 50:50 v/v као елуент), да би потом били прекристалисани из MeOH [396]. По добијању, једињења **3DQ-C3-3** и **3DQ-C3-4** ступила су у реакцију са сирћетном киселином у метанолу на собној температури ради синтезе 3-алкоксипроп-2-ен-1-један деривата **3DQ-Pro-1c** и **3DQ-Pro-2c** у приносима од по 95% [400]. Након кондензације 3-хидроксибензоеве киселине било са **3DQ-Pro-1c** или **3DQ-Pro-2c**, у присуству 5 mol% [RhCr*Cl₂]₂ и 2 еквивалента Cu(OAc)₂·H₂O, у толуену на 120°C, добијени су производи **3DQ-1c** и **3DQ-2c** у приносима од 95% [399].

Интерпретација спектралних података за једињења **3DQ-1c** и **3DQ-2c**

Иако је синтеза изохромана **3DQ-1c** и **3DQ-2c** изведена купловањем одговарајућих бензоевих киселина са геминално супституисаним винил ацетатима богатим електронима, иницијални синтетички напори били су заправо усмерени ка синтези самих винил ацетата **3DQ-Pro-1c** и **3DQ-Pro-2c**. Синтеза ових прекурсора започета је једноставним купловањем 2-хлороетанола са 1,2-дихидроизохинолином или пиридин-2,5-дионом, дајући реактанте **3DQ-C1** (Додатни материјал II: Сlike ДМ161-ДМ163) и **3DQ-C2** (Додатни материјал II: Сlike ДМ164-ДМ167). Тако, кондензација 1,2-дихидроизохинолина и 2-хлороетанола (настанак прекурсора **3DQ-C1**) потврђена је присуством ¹⁵N NMR синглета на -287,10 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ163), којим је ногирана супституција азота. Даље, *sp*³ хибридовани угљеници (бивши угљеници из 2-хлороетанола) у структури **3DQ-C1**, препознати су у као ¹H NMR дублет на 2,94 ppm (-CH₂-N- фрагмент) и мултиплет на 3,61 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ161), односно као ¹³C NMR синглети у опсегу од 41,07 до -52,74 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ162), док су атоми угљеника прстена 1,2-дихидроизохинолина формирали сигнале у ¹H NMR спектру у интервалу од 4,40 до 7,10 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ161) те унутар ¹³C NMR спектра у интервалу од 51,86 до 140.38 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ162).

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Што се тиче **3DQ-C2**, кондензација пирролидин-2,5-диона са 2-хлороетанолам верификована је појавом ^{15}N NMR синглета на -231,41 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ166). Карбонилне групе на положајима C2 и C5 препознате су као ^{13}C NMR мултиплет на 178,27 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ165), односно као ^{17}O NMR мултиплет на 371,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ167); sp^3 хибризовани атоми угљеника проистекли било из 2-хлороетанола или из пирролидин-2,5-диона препознати су као ^1H NMR мултиплети на 3,56 и 3,51 ppm, односно 2,73 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ164) (одговарајући ^{13}C NMR сигнали били су у виду синглети у интервалу од 39,35 до 43,37 синглета и мултиплета на 28,21 ppm, Додатни материјал II: Слика ДМ165).

Још један важан моменат у синтези **3DQ-1c** и **3DQ-2c** била је потпуна деметилација комерцијално доступног 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-метоксифенил)пропан-1-она до 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-хидроксифенил)пропан-1-она (тј. **3DQ-C3**, Додатни материјал II: Сlike ДМ168-ДМ170). Тако, постојање два фенолна остатка потврђено је одговарајућим NMR сигнаlima: слободна хидроксилна група унутар 4-хидроксифенилног остатка, директно везана за C1 угљеников атом 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-хидроксифенил)пропан-1-она (тј. група означена као OH_1), уочена је као оштар и интензиван синглет на 8,21 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ168), односно као оштар и интензиван синглет на 88,50 ppm (као интегрални део ^{17}O NMR дублета на 84,40 ppm, Додатни материјал II: Слика ДМ170); присуство слободне хидроксилне групе 4-хидроксифенилног остатка директно везаног за C3 угљеник 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-хидроксифенил)пропан-1-она (тј. група означена као OH_2) било је евидентно на основу оштрог и интензивног ^1H NMR синглета на 3,81 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ168) те оштрог и интензивног ^{17}O NMR синглета на 88,50 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ170).

Даље, услови за синтезу геминално супституисаних винил ацетата богатих електронима створени су кондензацијом реактаната **3DQ-C1** и **3DQ-C2** са **3DQ-C3**. Добијена су четири производа: **3DQ-C3-1** (Додатни материјал II: Сlike ДМ171-ДМ174) и **3DQ-C3-2** (Додатни материјал II: Сlike ДМ175-ДМ178), као последица купловања било **3DQ-C1** или **3DQ-C2** са хидроксилном групом C3 4-хидроксифенил остатка 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-хидроксифенил)пропан-1-она, односно **3DQ-C3-3** (Додатни материјал II: Сlike ДМ179-ДМ182) и **3DQ-C3-4** (Додатни материјал II: Сlike ДМ183-ДМ186), као производи кондензације **3DQ-C1** или **3DQ-C2** са C1 4-хидроксифенил остатком 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-хидроксифенил)пропан-1-она.

Резултати и дискусија

Синтеза **3DQ-C3-1** верификована је постојањем слободне хидроксилне групе C1 4-хидроксифенил остатка 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-хидроксифенил)пропан-1-она (тј. OH_1 групе) оштрим и интензивним 1H NMR синглетом на 8,31 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ171, те оштрим и интензивним ^{17}O NMR синглетом на 88,50 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ174). С друге стране, етерификација C3 4-хидроксифенил групе 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-хидроксифенил)пропан-1-она (тј. OH_2 групе), потврђена је детекцијом пика на 78,00 ppm, као саставног дела ^{17}O NMR дублета на 83,25 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ174). Одговарајућа слободна хидроксилна група једињења **3DQ-C3-2** детектована је 1H NMR синглетом на 8,38 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ175), док су ^{17}O NMR сигнали (Додатни материјал II: Слика ДМ178), било за слободну или супституисану хидроксилну групу, били идентични оним за **3DQ-C3-1**. Међутим, пикови су се значајно разликовали након синтезе **3DQ-C3-3** и **3DQ-C3-4**. Тако, супституција OH_1 групе **3DQ-C3-3** резултовала је појавом пикова за слободну OH_2 групу, оштрог и интензивног 1H NMR синглета на 4,06 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ179) те оштрог и интензивног ^{17}O NMR синглета на 80,50 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ182). Одговарајућа OH_2 група **3DQ-C3-4** детектована је у виду 1H NMR синглета средњег интензитета на 8,29 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ183), док је ^{17}O NMR сигнал био идентичан оном за **3DQ-C3-3** (Додатни материјал II: Слика ДМ186). Етарски сигнал након супституције OH_1 код **3DQ-C3-3** или **3DQ-C3-4**, пронађен је на 78,00 ppm у оквиру ^{17}O NMR спектра, унутар горе описаног дублета (Додатни материјал II: Сlike ДМ182 и ДМ186).

Даља синтеза **3DQ-Pro-1c** (Додатни материјал II: Сlike ДМ187-ДМ190) и **3DQ-Pro-2c** (Додатни материјал II: Сlike ДМ191-ДМ194) подразумевала је употребу **3DQ-C3-3** или **3DQ-C3-4** као синтона. Тако су **3DQ-C3-3** или **3DQ-C3-4** трансформисани у **3DQ-Pro-1c** и **3DQ-Pro-2c** као деривате 3-алкоксипроп-2-ен-1-она, супституцијом атома брома на положају C3 бившег 2,3-дибромо-1,3-*bis*(4-хидроксифенил)пропан-1-она са ацетокси остатком, као и елиминацијом брома на положају C2. Сврха синтезе **3DQ-Pro-1c** и **3DQ-Pro-2c** била је добијање *trans*-оријентисаних прекурсора који ће бити лако конвертовани у **3DQ-1c** и **3DQ-2c**, као циљане производе. Тако, замена бромом супституисане C3 метиленске функционалне групе (1H NMR синглет на 5,67 ppm и ^{13}C NMR синглети на 49,60 ppm, било за **3DQ-C3-3** или **3DQ-C3-4**, Додатни материјал II: Сlike ДМ179, ДМ180, ДМ183 и ДМ186) =CH-ацетокси фрагментом, уз грађење *trans*-двоструке везе у структури **3DQ-Pro-1c** или **3DQ-Pro-2c**, квантификована је померањем ^{13}C NMR сигнала ка вишем пољу (^{13}C NMR сигнали ма

169,79 ppm, Додатни материјал II: Сlike ДМ188 и ДМ192). Надаље, за сваки од прекурсора, тј. **3DQ-Pro-1c** и **3DQ-Pro-2c**, инкорпорирање ацетокси групе потврђено је следећим пиковима: етарски кисеоник емитовао је као ^{17}O NMR синглет на 140,00 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ190 и ДМ194; угљеник карбонилне групе препознат је на основу ^{13}C NMR синглета на 167,64 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ188 и ДМ192), кисеоник карбонилне групе нотираан је на основу ^{17}O NMR синглета на 393,00 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ190 и ДМ194), док је метил група формирала пар ^1H NMR мултиплета на 2,11 и 2,13 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ187 и ДМ191) и ^{13}C NMR синглет на 20,91 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ188 и ДМ192). С друге стране, елиминација брома са метиленске групе на положају C2 уз стварање *trans*-везе била је очигледна након анализе ^1H NMR синглета на 6,83 и 7,09 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ187 и ДМ191), као и анализом ^{13}C NMR синглета на 111,33 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ192 и ДМ196).

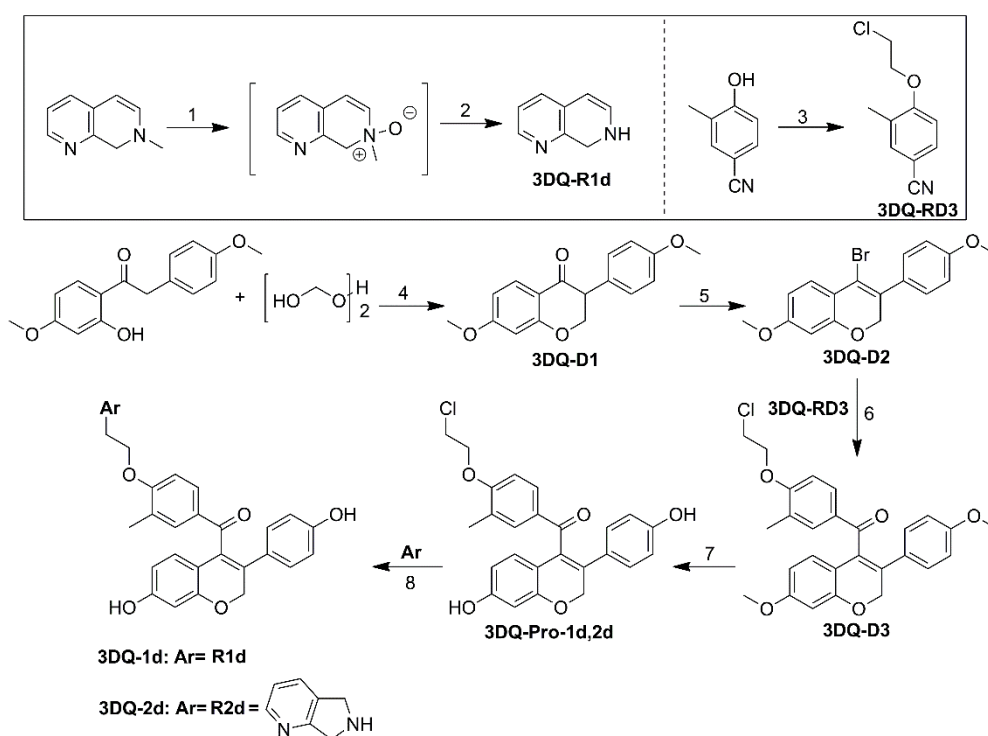
Конституција *trans*-двоструких веза унутар **3DQ-Pro-1c** или **3DQ-Pro-2c** била је структурни предуслов за кондензацију прекурсора са 3-хидроксибензојевом киселином, што је резултовало затварањем изокумаринских прстенова **3DQ-1c** (Додатни материјал II: Сlike ДМ195-ДМ198) и **3DQ-2c** (Додатни материјал II: Сlike ДМ199-ДМ202). Тако, поменуте двоструке везе постале су положаји C3=C4 **3DQ-1c** или **3DQ-2c**, препознате као ^{13}C NMR сигнали на 154,43 односно 125,40 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ196 и ДМ200), респективно (смањење, односно повећање поља за sp^2 хибридизоване C3 и C4 атоме последица је инкорпорације C3=C4 двоструких веза у хетероциклични систем, респективно). Надаље, новоуведена карбоксилне група, у облику лактонског кисеоника изокумарина код **3DQ-1c** или **3DQ-2c**, препозната је као ^{17}O NMR синглет на 262,00 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ198 и ДМ202). С друге стране, присуство карбонилне групе потврђено је следећим спектралним подацима: атом угљеника емитовао је као ^{13}C NMR синглет на 160,77 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ196 и ДМ200, респективно); кисеоник карбонилне групе препознат је као оштар ^{17}O NMR синглет на 336,20 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ198 и ДМ202, респективно). На крају, *p*-OH група пореклом из 3-хидроксибензојеве киселине формирала је за оба једињења ^{17}O NMR синглет на 88,50 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ198 и ДМ202).

Резултати и дискусија

Синтеза једињења **3DQ-1d** и **3DQ-2d**

Синтеза изофлавона (односно деривата хроман-4-она) **3DQ-1d** и **3DQ-2d** (Шема 3.7) захтевала је претходну синтезу реагенса **3DQ-R1d** и **3DQ-R2d**.

Шема 3.7. Синтеза једињења **3DQ-1d** и **3DQ-2d**^a



^aРеагенси и услови: (1) 1 екв. *m*-CPBA, CHCl₃, -5°C, 20 мин, (2) 0,25 екв. FcCH₂COOH, 50°C, 2 h; (3) DMF, безводни K₂CO₃, 100°C; (4) 25% вод. Me₂NH, EtOH, рефлукс; (5) PBr₃, бензен, 80°C; (6) 1.6 M *n*-бутиллитијум у хексану, суви етар, N₂, 0-5°C; (7) EtSH/AlCl₃, DCM, 0°C, 3 h; (8) 7,8-дихидро-1,7-нафтиридин или 6,7-дихидро-5H-пироло[3,4-*b*]пиридин, суви DMF, TBAI, 80°C.

Реагенс **3DQ-R2d** (6,7-дихидро-5H-пироло[3,4-*b*]пиридин) био је комерцијално доступан, док је **3DQ-R1d** (односно 7,8-дихидро-1,7-нафтиридин) припремљен *N*-деметилацијом комерцијално доступног 7-метил-7,8-дихидро-1,7-нафтиридина у приносу од 95% у два корака: (1) *N*-оксидацијом са *meta*-хлоропероксибензојевом киселином (*m*-CPBA); (2) третманом *N*-оксида са фероценсирћетном киселином (тј. фероцен/фероценијум (Fc/Fc⁺) системом) као редокс катализатором, потврђеним TLC-ом (CHCl₃:MeOH:NH₄OH = 85:15:1 v/v/v као елуент) [401]. Синтеза једињењ **3DQ-1d** и **3DQ-2d** започела је кондензацијом 1-(2-хидрокси-4-метоксипренил)-2-(4-метоксипренил)етанона са параформалдехидом у базним условима, као би се добио прекурсор 7-метокси-3-(4-метоксипренил)хроман-4-он (**3DQ-D1**, 95% приноса) [398].

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Рефлуктовање једињења **3DQ-D1** са PBr_3 у сувом бензену даље је водило ка синтези интермедијера 4-бромоизофлавена **3DQ-D2** у приносу од 85% [398] који је, ради очувања стабилности, одмах трансформисан у анјонску форму, помоћу *n*-бутил литијума на 0°C. Касније је једињење **3DQ-D2** кондензовано са реактантом **3DQ-RD3** (односно 4-(2-хлороетокси)-3-метилбензонитрилом), раније припремљеним кондезовањем комерцијално доступних 4-хидрокси-3-метилбензонитрила и 1,2-дихлороетана у приносу од 95% [398] да би се синтетисало једињење **3DQ-D3** у добром приносу [398]. Деметилација метокси група једињења **3DQ-D3** помоћу EtSH/безводног AlCl_3 , резултовала је формирањем прекурсора **3DQ-Pro-1d,2d** у приносу од 95%, који је потом реаговао са **3DQ-R1d** и **3DQ-R2d**, у сувом DMF-TBAI, да би се добили циљани продукти **3DQ-1d** и **3DQ-2d** у приносима од 95%, респективно [398].

Интерпретација спектралних података за једињења **3DQ-1d** и **3DQ-2d**

Синтеза деривата хроман-4-она **3DQ-1d** (Додатни материјал II: Сlike ДМ222-ДМ225) и **3DQ-2d** (Додатни материјал II: Сlike ДМ226-ДМ229) потврђена је интерпретацијом одговарајућих ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{15}N NMR и ^{17}O NMR спектара. Пажљиво планирање синтезе **3DQ-1d** и **3DQ-2d** подразумевало је извођење два пред-корака: синтезу 7,8-дихидро-1,7-нафтиридина (тј. **3DQ-R1d**, Додатни материјал II: Сlike ДМ203-ДМ205) из 7-метил-7,8-дихидро-1,7-нафтиридина, те синтезу 4-(2-хлороетокси)-3-метилбензонитрила (тј. **3DQ-RD3**, Додатни материјал II: Сlike ДМ206-ДМ209) из 4-хидрокси-3-метилбензонитрила. Тако, сви напори током синтезе **3DQ-R1d** били су усмерени ка *N*-деметилацији 7-метил-7,8-дихидро-1,7-нафтиридина. С обзиром на то да су структуру овог прекурсора карактерисале две врсте атома азота, алифатични и ароматични, њихова спектрална идентификација након деметилације алифатичног атома била је једноставна. Тако је алифатични амин потврђен лоцирањем оштрог и интензивног ^1H NMR синглета на 10,26 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ202) и односно ^{15}N NMR синглета на -257,80 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ205). Ароматични азот идентификован је ^{15}N NMR синглетом на -47,00 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ205).

С друге стране, структурна модификација 4-хидрокси-3-метилбензонитрила ка **3DQ-RD3** подразумевала је губљење сигнала *p*-ОН групе прекурсора унутар ^1H NMR или ^{17}O NMR спектара и појаву интензивног пика приписаног етарском кисеонику на 78,00 ppm унутар ^{17}O NMR спектра (Додатни материјал II: Сlike ДМ209). Увођење метиленских група 2-хлороетанола потврђено је помоћу ^1H NMR мултиплета на 3,81 и

Резултати и дискусија

4,20 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ206), који су потицали од атома хлора и угљеника вициналних кисеонику, респективно. Ови различити метиленски угљеници такође су сертификовани ^{13}C NMR синглетима на 43,63 односно 69,11 ppm. (Додатни материјал II: Слика ДМ207). Субституент у виду *o*-метил групе идентификован је ^1H NMR мултиплетом на 2,33 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ206) и ^{13}C NMR синглетом на 16,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ207), док су *p*-цијано групу одали атом угљеника као ^{13}C NMR синглет на 119,29 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ207) и атом азота као ^{15}N NMR синглет на -122,70 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ208).

Синтеза 7-метокси-3-(4-метоксифенил)хроман-4-она (**3DQ-D1**, Додатни материјал II: Сlike ДМ210-ДМ212) била је условљена купловањем 1-(2-хидрокси-4-метоксифенил)-2-(4-метоксифенил)етанона и параформалдехида, те формирањем језгра хроман-4-она. Тако, постојање етарског кисеоника у дихидро-2*H*-пиран-4(3*H*)-онском фрагменту језгра хроман-4-она, потврђено је лоцирањем ^{17}O NMR сигнала на 48,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ212); угљенични мост, који је повезао етарски кисеоник са карбонилном групом на положају С4, препознат је одговарајућим ^1H NMR и ^{13}C NMR пиковима (Додатни материјал II: Сlike ДМ210 и ДМ211): положај С2, пореклом из параформалдехида, нотирањем је као ^1H NMR синглет на 4,41 ppm односно ^{13}C NMR синглет на 70,33 ppm; положај С3 потекао од 1-(2-хидрокси-4-метоксифенил)-2-(4-метоксифенил)етанона, констатован је као ^1H NMR синглет на 4,61 ppm односно као ^{13}C NMR синглет на 48,77 ppm; С4 карбонилна група, пореклом из 1-(2-хидрокси-4-метоксифенил)-2-(4-метоксифенил)етанона, препозната је помоћу ^{13}C NMR синглета на 191,21 ppm. Даље, присуство два ароматична прстена у структури **3DQ-D1** потврђено је ^1H NMR мултиплетом у опсегу хемијског померања од 6,72 до 7,35 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ210) те одговарајућим ^{13}C NMR сигнаlima у опсегу од 101,18 до 129,17 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ211). На крају, својевољно уведене метокси групе (С7-ОСН₃ из хроман-4-она или *p*-ОСН₃ из 4-метоксифенила), опажене су у ^1H NMR спектру на 3,79 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ210), као део мултиплета на 3,80 ppm, као и унутар ^{13}C NMR спектра (Додатни материјал II: Слика ДМ211), као део мултиплета на 56,04 ppm. Унутар ^{17}O NMR спектра (Додатни материјал II: Слика ДМ212), кисеоник из С7-ОСН₃ групе хроман-4-она, констатован је као синглет на 65,00 ppm, док је кисеоник из *p*-ОСН₃ групе 4-метоксифенила емитовао унутар претходно поменутог дублета на 47,10 ppm, при хемијском померању од 46,20 ppm. Увођење брома на позицију С4 језгра хроман-4-она (тј. синтеза **3DQ-D2**, Додатни

Докторска дисертација Незрине Куртановић

материјал II: Сlike ДМ213-ДМ215) потврђено је након лоцирања ^{13}C NMR сигнала на нижем пољу, односно након померања сигнала са 191,21 на 124,10 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ214).

Међутим, супституција брома са 4-(2-хлороетокси)-3-метилбензонитрилом, за потребе синтезе **3DQ-D3** (Додатни материјал II: Сlike ДМ216-ДМ218), утицала је на процес увођења карбонилне групе на положај C4 језгра хроман-4-она и наравно на губитак сигнала цијано групе: угљеник C4 позиционирао се као ^{13}C NMR синглет на 146,08 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ217), угљеник карбонилне групе емитовао је као ^{13}C NMR синглет на 198,36 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ217), док је кисеоник карбонилне групе нотирао као ^{17}O NMR синглет на 469,30 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ218). Новоуведени ароматични остаци примећени су на основу постојања ^1H NMR сигнала у интервалу од 7,04 до 7,68 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ216), док је присуство *o*-CH₃ група констатовано на основу ^1H NMR мултиплета на хемијском померању од 2,30 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ216) и на основу ^{13}C NMR синглета на 16,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ217). Кисеонични мост потекао од 2-хлороетанола потврђен је оштрим и интензивним ^{17}O NMR синглетом на 469,30 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ218). С друге стране, -CH₂-O- и -CH₂-Cl-метиленски угљеници, који су чинили окосницу моста, били су евидентни као ^1H NMR мултиплети на 4,17 и 3,68 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ216), односно као ^{13}C NMR синглети на 69,11 и 43,63 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ217), тим редоследом.

Следећи корак у протоколу био је деметилација **3DQ-D3**, што је резултовало синтезом **3DQ-Pro-1d,2d** (Додатни материјал II: Сlike ДМ219-ДМ221). ^1H NMR синглети на 5,31 и 8,41 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ219) и ^{17}O NMR синглети на 93,30 и 88,50 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ221) сведочили су о деметилацији C7-OH групе хроман-4-она односно *p*-OH групе 4-метоксифенила.

Синтон **3DQ-Pro-1d,2d** потом је искоришћен као кључан за синтезу **3DQ-1d** (Додатни материјал II: Сlike ДМ222-ДМ225) односно **3DQ-2d** (Додатни материјал II: Сlike ДМ226-ДМ229) супституцијом халогена из 2-хлороетанола са 7,8-дихидро-1,7-нафтиридином или 6,7-дихидро-5*H*-пироло[3,4-*b*]пиридином, респективно. Обзиром на чињеницу да прекурсори једињења **3DQ-1d** и **3DQ-2d** нису садржали ниједан атом азота, увођење хетероцикла потврђено је помоћу ^{15}N NMR спектралних података (Додатни материјал II: Сlike ДМ224 и ДМ228) где је атом азота из **3DQ-Pro-1d,2d** унутар структуре **3DQ-1d** (7,8-дихидро-1,7-нафтиридин као супституент) или **3DQ-2d**

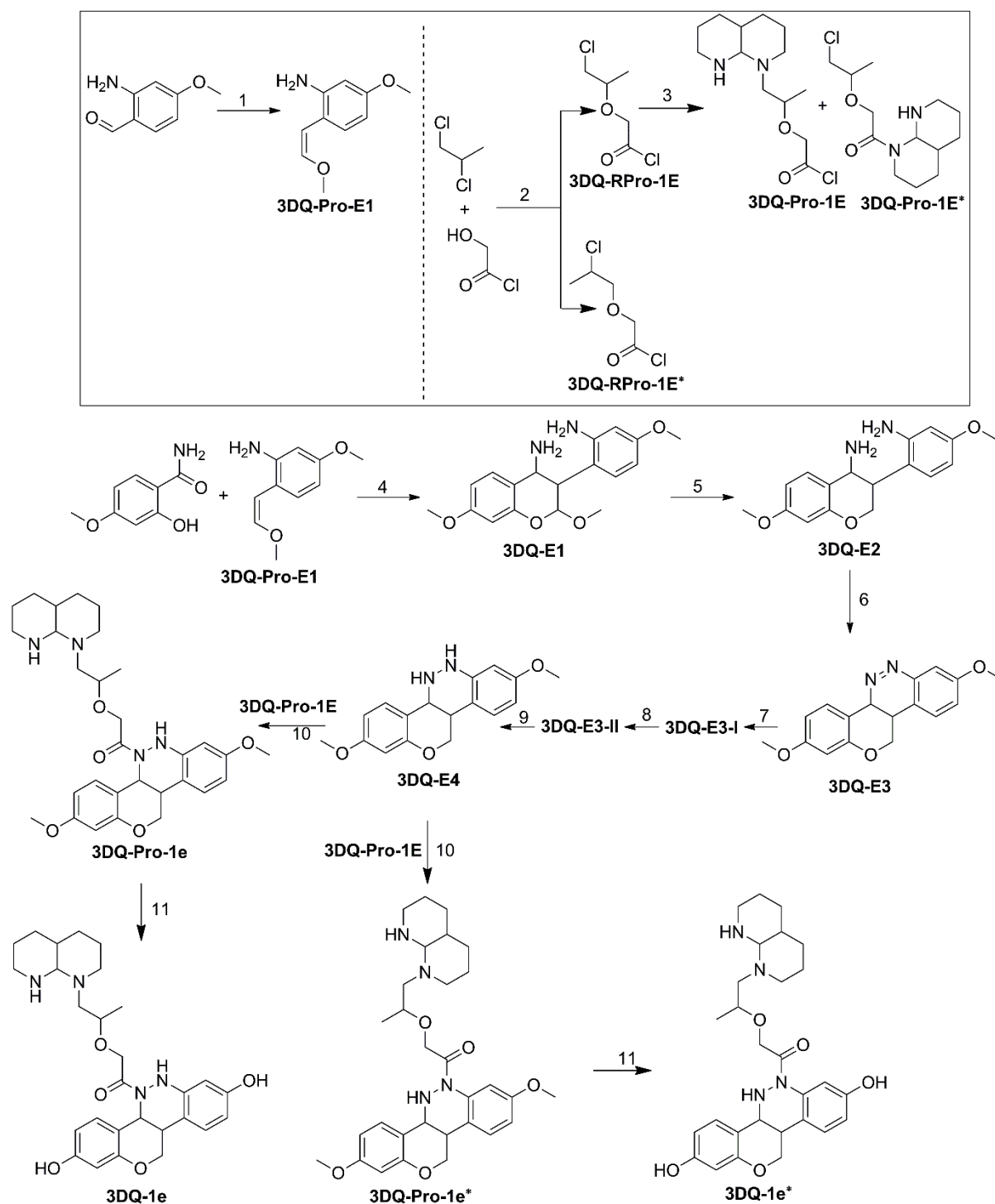
Резултати и дискусија

(6,7-дихидро-5*H*-пироло[3,4-*b*]пиридин као супституент) примећен на -287,30, односно на -315,50 ppm, респективно док је несупституисани ароматични азот за оба једињења био виђен као синглет на -47,00 ppm.

Синтеза једињења **3DQ-1e** и **3DQ-1e***

Синтеза **3DQ-1e** (Шема 3.8) захтевала је иницијалну припрему изофлавона **3DQ-E2**, чија је синтеза започела кондензацијом 2-хидрокси-4-метоксибензадина са еквимоларном концентрацијом **3DQ-Pro-E1** [400] (односно (*Z*)-5-метокси-2-(2-метоксивилин)анилина) у бензену, што је резултовало стварањем једињења **3DQ-E1** као смеше дијастереомера (у приносу од 80%) [401], након загревања раствора у затвореној туби на 80°C у року од 24 h. Реагенс **3DQ-Pro-E1** претходно је припремљен у добром приносу (90%) као смеша геометријских изомера у приближном односу 1:1 који су коришћени без даљег пречишћавања, третирањем комерцијално доступног 2-амино-4-метоксибензалдехида са Wittig-овим реагенсом у виду метоксиметилен(трифенил)фосфорана [401]. Настали ацетал **3DQ-E1** потом је конвертован у изофлавон **3DQ-E2** (92% приноса) [401], након редуктивног уклањања C2's метокси групе, коришћењем BF₃·OEt₂ и триетилсилана, што је резултовало стварањем језгра без C2' субституента. Надаље, једињење **3DQ-E2** преведено је у **3DQ-E4** (93% приноса), применом идентичне процедуре која је коришћена и за **3DQ-A3** [394]. Из једињења **3DQ-E4** потом су синтетисани **3DQ-1e** (у приносу од 95%) или **3DQ-1e*** (у приносу од 95%) кондензовањем **3DQ-E4** са **3DQ-Pro-1E**, реагенсом који је претходно приправљен у 2 корака: (i) први корак подразумевао је кондензацију [396] комерцијално доступних 1,2-дихлоропропана и 2-хидроксиацетилхлорида којом се добила смеша **3DQ-RPro-1E** (у приносу од 52%) и **3DQ-RPro-1E*** (у приносу од 46%) (TLC: CH₂Cl₂:EtOAc = 9,5:0,5 v/v као елуент), чије су компоненте раздвојене флеш хроматографијом на колони силика гела (CH₂Cl₂:EtOAc = 9:1 v/v као елуент); (ii) други корак подразумевао је кондензацију **3DQ-RPro-1E** са комерцијално доступним декахидро-1,8-нафтхиридином у сувом DMF-TBAI да би се наградили производи **3DQ-Pro-1E** (у приносу од 48%) и **3DQ-Pro-1E*** (у приносу од 46%) (TLC: *n*-хексан: EtOAc = 7:3 v/v као елуент) [398], такође раздвојени флеш хроматографијом на колони силика гела (*n*-хексан: EtOAc = 6:4 v/v као елуент). Напокон, адиција два еквивалента **3DQ-Pro-1E** у медијуму **3DQ-E4** резултовала је синтезом **3DQ-1e** и **3DQ-1e***, праћењем познатих протокола [390].

Шема 3.8. Синтеза једињења **3DQ-1e** и **3DQ-1e***^a



^aРеагенси и услови: (1) Ph₃P⁺CH₂OMeCl, LiHDMS, THF, 0°; (2) DMF, безводни K₂CO₃, 100°C, 96 h; (3) декахидро-1,8-нафтиридин, суви DMF, TBAI, 80°C; (4) Ac₂O, везводни NEt₃, 180°C, 18 h, потом K₂CO₃, RT, 6 h; (5) Et₃SiH, BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, 0°C; (6) *t*-BuONO (3 екв.), TFE (0.01 M), rt, 12 h; (7) (хлорометил)бензен, AgOTf, DMC; (8) *i*-Pr₂NEt, DMF; (9) 1N HCl, DMF; (10) K₂CO₃, EtOH, reflux; (11) BBr₃, CH₂Cl₂, 0°C, 3h, reflux.

Резултати и дискусија

Интерпретација спектралних података за једињења **3DQ-1e** и **3DQ-1e***.

Почетни корак у синтези једињења **3DQ-1e** био је стварање *cis*-оријентисаног реактанта **3DQ-Pro-E1** (Додатни материјал II: Слике ДМ230-ДМ233). Атоми угљеника поменуте *cis*-двоструке везе детектовани су ^1H NMR спектроскопијом, као синглет на 5,62 ppm приписан угљенику из бивше алдехидне функционалне групе, односно као дублет на 6,18 ppm који је приписан мосном атому ка етарском кисеонику (Додатни материјал II: Слика ДМ230); одговарајући атоми угљеника такође су потврђени као ^{13}C NMR синглети на 95,93 односно 150,23 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ231), респективно. Метил група новоуведеног енол етра нотирана је као ^1H NMR синглет на 3,51 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ230) те као ^{13}C NMR синглет на 55,90 ppm у оквиру дублета на 55,97 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ231). Постојање кисеоничног моста потврђено је ^{17}O NMR синглетом на 22,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ233). С друге стране, *p*- OCH_3 група била је видљива у ^1H NMR спектру на 3,79 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ230), као ^{13}C NMR синглет на 56,04 ppm унутар дублета на 55,97 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ231), те као ^{17}O NMR синглет на 50,70 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ233), док је сигнал *o*- NH_2 групе био видљив као ^1H NMR синглет на 5,41 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ230) и ^{15}N NMR синглет на -308,40 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ232). Наравно, ароматични угљеници били су на очекиваним хемијским померањима.

Још један важан реактант за синтезу **3DQ-1e** био је **3DQ-Pro-1E**. Овај реагенс синтетисан је из **3DQ-RPro-1E** (Додатни материјал II: Слике ДМ234-ДМ236), који је, пак, првобитно приправљен купловањем 1,2-дихлоропропана и 2-хидроксиацетил хлорида и изоловањем **3DQ-RPro-1E** из смеше са **3DQ-RPro-1E*** (Додатни материјал II: Слике ДМ237-ДМ239). Тако, етарски кисеоник на којем је изграђен **3DQ-RPro-1E**, нотиран је као ^{17}O NMR синглет на 18,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ236). Угљеник $-\text{CH}_2-\text{Cl}$ фрагмента 1,2-дихлоропропана препознат је ^1H NMR синглет на 3,43 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ234), односно као ^{13}C NMR синглет на 48,08 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ235), док је метил-супституисани угљеник квантификован као ^1H NMR синглет на 4,11 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ234), те као ^{13}C NMR синглет на 73,16 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ235). Сама метил група емитовала је као ^1H NMR мултиплет на 1,26 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ253) и као ^{13}C NMR синглет на 18,92 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ254). Надаље, C_2 угљеник бившег 2-хидроксиацетил хлорида био је препознат као

Докторска дисертација Незрине Куртановић

^1H NMR мултиплет на хемијском померању од 4,92 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ234) и као ^{13}C NMR синглет на 71,57 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ235). Угљеник карбонилне групе примећен је као ^{13}C NMR синглет на 167,23 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ235). С друге стране, једињење **3DQ-RPro-1E*** разликовало се у поређењу са **3DQ-RPro-1E** само по положају метил групе: ^1H NMR мултиплет на 1,57 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ237) као и ^{13}C NMR синглет на 21,27 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ238) потврдили су различит положај метил групе.

Реактант **3DQ-RPro-1E** даље је куплован са декахидро-1,8-нафтиридином да би се добила друга смеша која је садржала **3DQ-RPro-1E** (Додатни материјал II: Сlike ДМ240-ДМ243) и **3DQ-RPro-1E*** (Додатни материјал II: Сlike ДМ244-ДМ247). Тако, супституција халогена у структури **3DQ-RPro-1E** хетероциклом, у реону бившег 1,2-дихлоропропана, потврђена је ^{15}N NMR дублетом на -380,65 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ242), где је терцијарни амин произвео сигнал на -326,40 ppm док је секундарни (несупституисани) амин емитовао на -334,90 ppm. Супротно томе, супституција халогена из хлорида киселине у структури **3DQ-Pro-1E*** манифестовала се ^{15}N NMR синглетом на -287,10 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ246, преостали азот у декахидро-1,8-нафтиридину показао се као ^{15}N NMR синглет на -334,90 ppm). Преостали скелет **3DQ-Pro-1E** или **3DQ-Pro-1E*** био је на очекиваним хемијским померањима.

Након што су припремљени реактанти за синтезу **3DQ-1e**, започео је стварни протокол синтезе самог једињења. Тако, кондензацијом комерцијалног 2-хидрокси-4-метоксибензамида са **3DQ-Pro-E1** добијен је ацетал **3DQ-E1** базиран на хроману (Додатни материјал II: Сlike ДМ248-ДМ251). Кондензација у раствору бензена потврђена је откривањем кључних пикова насталих синтезом 3-(2-амино-4-метоксифенил)-2,7-диметоксихроман-4-амина, тј. након затварања хроманског прстена. Дакле, ^{17}O NMR синглет на 99,00 ppm додељен је ацеталном кисеонику (Додатни материјал II: Слика ДМ251) док је кисеоник метокси групе на положају C2 примећен као ^{17}O NMR синглет на 23,00 ppm (C2 метокси група такође је окарактерисана ^1H NMR мултиплетом на 3,35 ppm и ^{13}C NMR синглетом на 55.81 ppm, Додатни материјал II: Сlike ДМ248 и ДМ249). Надаље, било је важно констатовати формирање подструктуре C2-C3-C4-NH₂ као карактеристике хроманског језгра. С тога је постојање sp^3 -хибридизоване C2-C3 везе потврђено на основу одсуства пикова карактеристичних за атоме угљеника *trans*-двоструке везе: положај C2 био је дефинисан као ^1H NMR

Резултати и дискусија

синглет на 4,86 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ248) и као ^{13}C NMR синглет на 100,72 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ249), док је положај C3 виђен унутар ^1H NMR спектра као синглет на хемијском померању од 3,79 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ248) односно као ^{13}C NMR синглет на хемијском померању од 50,85 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ249). С друге стране, -C4-NH₂ фрагмент (тј. -C4-N₁, видети дискусију за **3DQ-A1**, **3DQ-A2**, и **3DQ-A3** у претходном тексту) нотиран је на следећи начин: позиција C4 потврђена је помоћу пика на 4,19 ppm унутар ^1H NMR спектра (Додатни материјал II: Слика ДМ248); азот N₁ директно везан за положај C4 хроманског језгра окарактерисан је ^1H NMR сигналом на 2,12 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ248) и ^{15}N NMR синглетом на -342,50 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ250). Поред конструкције хроманске под-структуре, још једно есенцијално достигнуће циљане синтезе било је увођење додатног примарног амина (азота N₂), односно *o*-NH₂ функционалне групе пореклом из **3DQ-Pro-E1**. Тако, ковалентна веза између хроманског језгра и **3DQ-Pro-E1** потврђена је ^{13}C NMR синглетима на 50,85 односно 120,89 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ249), чиме су се стекли услови за увођење *o*-NH₂ фрагмента (нотираног као ^1H NMR мултиплет на 5,78 ppm, Додатни материјал II: Слика ДМ248, односно као ^{15}N NMR синглет на -322,70 ppm, Додатни материјал II: Слика ДМ250) у близини N₁. Коначно, присуство преосталих метокси група (*p*-OCH₃ група из **3DQ-Pro-E1**, односно C7-OCH₃ групе хромана) у структури синтона **3DQ-E1** потврђено је очекиваним ^1H NMR мултиплетом на 3,79 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ248), ^{13}C NMR мултиплетом на 56,04 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ249), као и одговарајућим ^{17}O NMR синглетима при хемијском померању од 63,00 ppm и 50,70 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ251).

Након припреме, **3DQ-E1** је подвргнут редуктивном уклањању метокси групе на положају C2, ради генерисања изофлавана **3DQ-E2** (Додатни материјал II: Сlike ДМ252-ДМ255). Наравно, поменута редукција квантификована је одсуством спектралних података C2-OCH₃ групе, као и променом хемијских померања који су се односили на положај C2: појава ^1H NMR пика на 4,22 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ252) и ^{13}C NMR синглета на 67,98 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ253) били су кључни докази који су говорили у прилог описаној хемијској трансформацији. Субсеквентна оксидација **3DQ-E2** довела је до стварања бензо[*c*]хинолонског фрагмента унутар структуре **3DQ-E3** (Додатни материјал II: Сlike ДМ256-ДМ259), у којем је -N=N- веза ефикасно окарактерисана појавом два ^{15}N NMR синглета: сигнала за N₁ на 156,400 ppm и пика за N₂ на 26,70 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ258).

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Интермедијерни **3DQ-E3** потом је оксидован до **3DQ-E4**, слично једињењу **3DQ-A3**. Тако је **3DQ-E3** најпре конвертован у форму *N*-бензил бензоцинолинијума (**3DQ-E3-I**, Додатни материјал II: Сlike ДМ260-ДМ262), чије је генерисање индиректно потврђено одсуством ^{13}C NMR сигнала за положај С4 **3DQ-E3-I** (Додатни материјал II: Слика ДМ261), који је био везан за позитивно наелектрисани азот. Коначно, неутрализација **3DQ-E3-I** до **3DQ-E3-II** (Додатни материјал II: Сlike ДМ263-ДМ265) такође је потврђена потпуним губитком ^{13}C NMR сигнала положаја С4 (Додатни материјал II: Слика ДМ264). Трансформација **3DQ-E3-II** у **3DQ-E4** (Додатни материјал II: Сlike ДМ266-ДМ269) потврђена је постојањем јасне разлике између хидразинских азота, што је закључено присуством ^1H NMR синглета на 2,94 ppm и 3,09 ppm за N_1 , односно за N_2 (Додатни материјал II: Слика ДМ266), респективно, као и присуством ^{15}N NMR синглета на -298,90 ppm као обележја N_1 (Додатни материјал II: Слика ДМ268).

Последњи кораци у синтези **3DQ-1e** указивали су на кондензацију **3DQ-E4** и **3DQ-Pro-1E**. Као што се очекивало, кондензација је резултовала генерисањем два прекурсора, **3DQ-Pro-1e** (Додатни материјал II: Сlike ДМ270-ДМ273) и **3DQ-Pro-1e*** (Додатни материјал II: Сlike ДМ274-ДМ277). Продукција **3DQ-Pro-1e** претпостављала је супституцију N_1 те је спектрална анализа била усмерена ка претраживању трагова за N_2 : пронађен је дублет унутар ^1H NMR спектра на хемијском померању од 3,87 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ270). С друге стране, супституција N_1 потврђена је постојањем ^{15}N NMR синглета на -244,00 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ272), као и појавом ^{13}C NMR синглета за $-\text{C}=\text{O}-N_1$ фрагмент на 167,62 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ271). Што се тиче **3DQ-Pro-1e***, несупституисани N_1 је пронађен је као ^1H NMR синглет на хемијском померању од 3,35 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ274) и као ^{15}N NMR синглет на -298,90 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ276), као и локализацијом ^{13}C NMR синглета приписаног $-\text{C}=\text{O}-N_2$ фрагменту на 168,21 ppm (Додатни материјал II: Слика ДМ275).

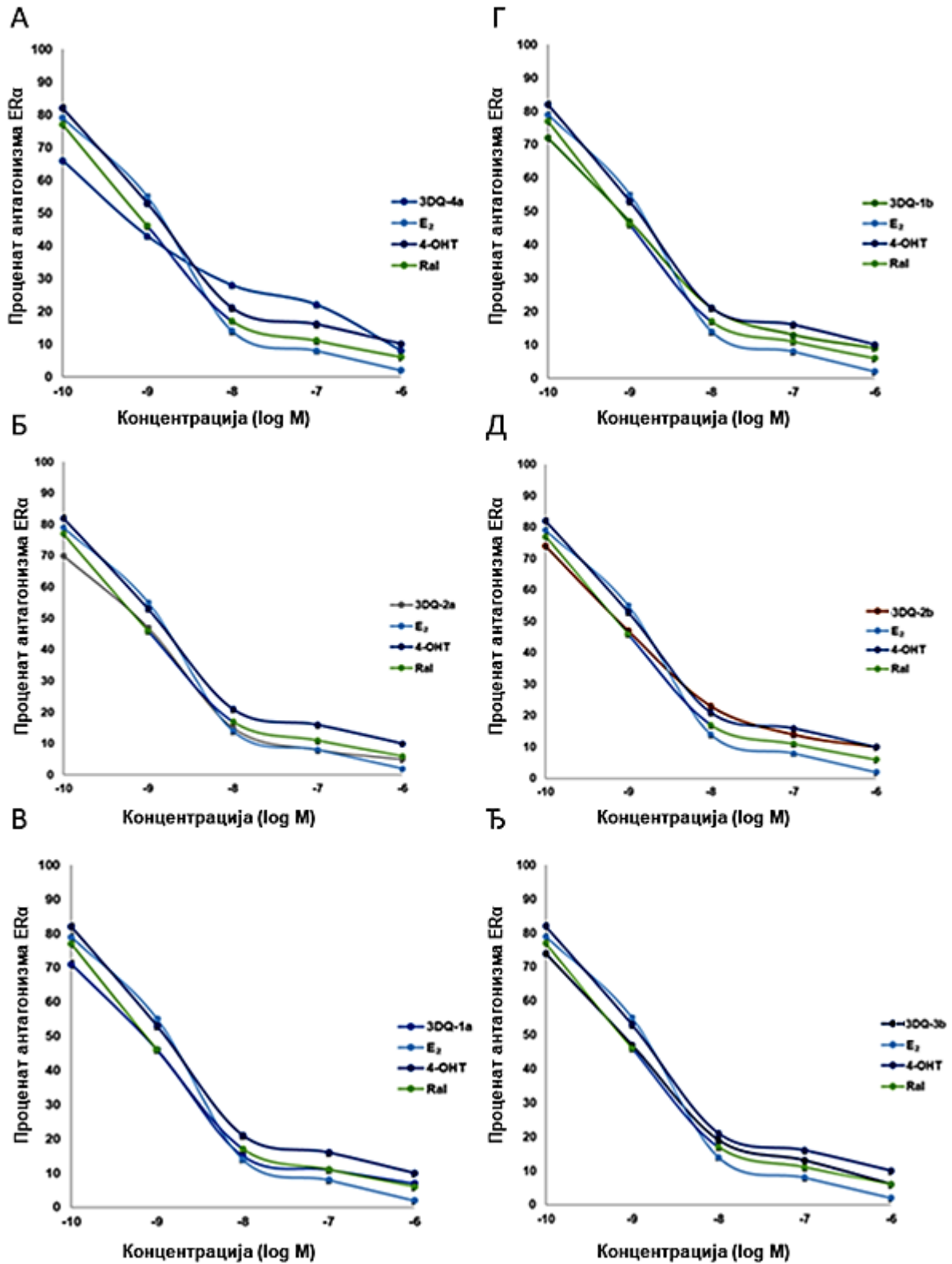
Финални производи **3DQ-1e** (Додатни материјал II: Сlike ДМ278-ДМ281) и **3DQ-1e*** (Додатни материјал II: Сlike ДМ282-ДМ285), добијени су селективном деметилацијом преосталих метокси група. Дакле, за **3DQ-1e** и **3DQ-1e***, хроманске С7-ОН и *p*-ОН групе верификоване су помоћу ^1H NMR синглета на хемијском померању од 4,75 (4,80) и 4,72 (9,73) ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ278 и ДМ282), као и на основу ^{17}O NMR синглета на 93,90 и 88,00 ppm (Додатни материјал II: Сlike ДМ281 и ДМ285), респективно.

Резултати и дискусија

Антагонистичка активности синтетисаних једињења 3DQ-1a до 3DQ-1e, релативни афинитети везивања према ER α и ER β и анализа биоактивних конформација

Вредности антагонистичке активности (односно IC₅₀ вредности) новосинтетисаних једињења **3DQ-1a** до **3DQ-1e**, заједно са њиховим релативним афинитетима везивања (енг. relative binding affinities, RBA) и константама антагонизма, одређене су у односу на ER α или ER β (Табела 3.8, Слика 3.8 и Додатни материјал II: Сликe ДМ298-ДМ302) [360,361]. **E₂**, **4-ОНТ** и **Ral** коришћени су као референтна једињења. Оно што је након извршених есеја било очигледно јесте да су експериментално одређене IC₅₀ вредности **3DQ-1a** до **3DQ-2e** у односу на ER α (Слика 3.8, Табела 3.8) биле у високој корелацији са предвиђеним (Табела 3.7): просечна вредност апсолутне грешке предвиђања за биоактивне конформације генерисане млекулским доковањем (енг. SB average absolute error of prediction, SB AAEP) била је свега 0,06 IC₅₀ јединица, док је за биоактивне конформације генерисане преклапањем са кристалним структурама ко-кристализованих лиганата ER α просечна вредност апсолутне грешке предвиђања (енг. LB AAEP) имала вредност од 0,10 IC₅₀ јединица. Најниже АЕР одређене су за једињења **3DQ-4a** и **3DQ-2a** (0,01/0,05 и 0,01/0,02 IC₅₀ јединице на SB/LB нивоу, респективно), за која је експериментално пронађено да су најпотентнија водећа једињења у студији (видети даљу дискусију), чиме је потврђен висок ниво предиктивне способности генерисаног 3-D QSAR модела из N пробе. Сва једињења осим **3DQ-2c**, **3DQ-3a**, **3DQ-1d**, **3DQ-2d**, **3DQ-1a***, **3DQ-2a***, **3DQ-3a*** и **3DQ-1e*** била су активнији антагонисти ER α **Ral**, са активношћу у pM опсегу, док су **3DQ-2c**, **3DQ-3a** и **3DQ-1d** били мало активнији или једнако активни као **4-ОНТ**.

Као што је коректно и предвиђено, најактивнији антагонист ER α био је **3DQ-4a** (Слика 3.8А, Табела 3.8), са активношћу са 3,89 пута већом од **Ral**. Унутар биоактивне конформације **3DQ-4a** (Слика 3.9А) језгро 7-хидрокси-3-(4-хидроксифенил)-2H-хромен-2-она заузело је просторни распоред сличан оном код једињења **5AK2** [75]: унутар најбоље доковане конформације, C7-ОН група кумарина формирала је HBs са Н3 Glu353 ($d_{\text{HB}} = 2,517 \text{ \AA}$) и Н6 Arg394 ($d_{\text{HB}} = 2,612 \text{ \AA}$), карбонилна група лактонског прстена остварила је електростатичке интеракције са Н6 Met388, док је новоуведена фенолна функционална група на положају C3 кумаринског језгра наградила водоничну везу са Н11 His524 ($d_{\text{HB}} = 2,841 \text{ \AA}$), што је био један од интерних циљева овде представљеног дизајна.



Слика 3.8. Антагонизам естроген рецептора α у присуству 3DQ-4a (А); 3DQ-2a (Б); 3DQ-1a (В); 3DQ-1b (Г); 3DQ-2b (Д); 3DQ-3b (Ђ).

Резултати и дискусија

Табела 3.8. Антагонистичке активности синтетисаних једињења **3DQ-1a** до **3DQ-1e**^{*}, релативни афинитети везивања према ER α и ER β , и одговарајуће антагонистичке константе.

Јед.	ER α ^a (IC ₅₀ nM)	ER β ^b (IC ₅₀ nM)	logRBA ^B ER α	logRBA ^Г ER β	K _a ER α ^d (nM)	K _a ER β ^h (nM)
3DQ-1a	0,33±0,27 ^e	77,53±0,35 ^{†,‡,§}	2,43	0,06	0,07	43,56 ^{†,‡,§}
3DQ-1a [*]	160,53±0,43 ^{†,‡,§}	28,82±0,57 ^{†,‡,§}	-0,26	0,49	36,07 ^{†,‡,§}	16,19 ^{†,‡,§}
3DQ-2a	0,26±0,09	98,25±0,38 ^{†,‡,§}	2,53	-0,04	0,06	55,20 ^{†,‡,§}
3DQ-2a [*]	143,93±0,46 ^{†,‡,§}	4,43±0,73 ^{†,‡,§}	-0,21	0,29	32,34 ^{†,‡,§}	25,52 ^{†,‡,§}
3DQ-3a	0,76±0,14	86,41±0,36 ^{†,‡,§}	2,07	0,01	0,17	48,54 ^{†,‡,§}
3DQ-3a [*]	375,32±0,63 ^{†,‡,§}	36,78±0,51 ^{†,‡,§}	-0,63	0,38	84,34 ^{†,‡,§}	20,66 ^{†,‡,§}
3DQ-4a	0,19±0,06	102,47±0,43 ^{†,‡,§}	2,67	-0,06	0,04	57,57 ^{†,‡,§}
3DQ-1b	0,37±0,24	72,48±0,53 ^{†,‡,§}	2,38	0,09	0,04	40,72 ^{†,‡,§}
3DQ-2b	0,39±0,18	74,46±0,55 ^{†,‡,§}	2,36	0,08	0,08	41,83 ^{†,‡,§}
3DQ-3b	0,39±0,11	79,54±0,31 ^{†,‡,§}	2,36	0,05	0,08	44,69 ^{†,‡,§}
3DQ-1c	0,71±0,43	42,73±0,64 ^{†,‡,§}	2,10	0,32	0,16	24,01 ^{†,‡,§}
3DQ-2c	0,75±0,12	57,32±0,32 ^{†,‡,§}	2,07	0,19	0,17	32,20 ^{†,‡,§}
3DQ-1d	1,05±0,14	69,88±0,53 ^{†,‡,§}	1,93	0,11	0,24	39,26 ^{†,‡,§}
3DQ-2d	1,13±0,08	62,09±0,74 ^{†,‡,§}	1,90	0,16	0,25	34,88 ^{†,‡,§}
3DQ-1e	0,67±0,08	67,14±0,35 ^{†,‡,§}	2,12	0,12	0,15	37,72 ^{†,‡,§}
3DQ-1e [*]	168,41±0,13 ^{†,‡,§}	31,87±0,55 ^{†,‡,§}	-0,28	0,45	37,84 ^{†,‡,§}	17,90 ^{†,‡,§}
E₂ ^ж	0,89±0,27	0,89±0,27 ^{‡,§}	2,00	2,00 ^{‡,§}	0,20	0,50
4-ОНТ ^з	1,12±0,06 [§]	3,61±0,64 [†]	1,90	1,39 [†]	0,25 [§]	2,03 [†]
Ral ^и	0,74±0,08 [‡]	74,30±0,42 [†]	2,08	0,08	0,17	41,24 [†]
Контрола ^ј	НД ^к	НД	НД	НД	НД	НД

^aКонцентрација која антагомира 50% сигналне активности ER α ; ^bКонцентрација која антагомира 50% сигналне активности ER β ; ^вЛогаритамска вредност процента релативног афинитета везивања према ER α ; ^ГЛогаритамска вредност процента релативног афинитета везивања према ER β (^ввредности и ^Гвредности релативног афинитета везивања (енг. relative binding affinity, RBA) израчунате су у односу на естрадиол са афинитетом од 100%, logRBA вредности веће од 0 указују на велики афинитет везивања, logRBA вредности између -2 и 0 указују на умерен интензитет везивања, logRBA вредности испод -2 указују на слаб интензитет везивања); ^dИзрачунате константе антагонизма (инхибиције) у односу на ER α ; ^hИзрачунате константе антагонизма (инхибиције) у односу на ER β ; ^eРезултати су представљени као средња вредност±стандардна девијација; ^ж**17 β -естрадиол**; ^з**4-хидроксиатамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОНТ**); ^и**Ралоксифен** (енг. **Raloxifene, Ral**); ^јБез лиганда (0,9% NaCl). ^кНије доступно. [†]p < 0,05 у поређењу са контролном групом; [‡]p < 0,05 у поређењу са **4-ОНТ**; [§]p < 0,05 у поређењу са **Ral**.

Надаље, супституент кумаринског језгра на позицији C4 у виду 2-амино-1-(4-хидрокси-3-метилфенил)етанона, успоставио је еклипсне стерне интеракције преко o-Me-Ph функционалне групе са метил групом бочног ланца Н3 Thr347, вероватно олакшавајући формирање хидрофобне мреже Н3 Thr347-Н11 Leu525-Н12 Leu536 и неопходну дислокацију Н12, затим хидрофобне интеракције у облику слова Т између метиленске групе и Н6 Trp383, као и електростатичке интеракције између p-

Докторска дисертација Незрине Куртановић

позициониране карбонилне групе и хидроксилне групе бочног ланца Н3 Thr347. У исто време, несупституисани угљеникови атоми *o*-Me-Ph функционалне групе остварили су стерне интеракције Т-типа са Н12 Leu536. Даље, као резултат стерног привлачења између етаноламинског моста једињења **3DQ-4a** и метил групе бочног ланца Н3 Thr347 дошло је до просторног поравнања остатка 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине између Н3 Asp351 и Н12 Leu536: метилени атоми угљеника прстена пиридина успоставили су стерне контакте са изобутил групом Н12 Leu536, хетероциклични атом азота заузео је просторни положај сличан оном виђеном у комплексу **1ERR** (тј. унутар биоактивне конформације **Ral**) [73] и успоставио је електростатичке интеракције са Н3 Asp351, док је С3-карбоксилна група формирала водоничну везу са Н3 Asp351 ($d_{\text{HВ}} = 2,962 \text{ \AA}$). У таквој констелацији, С3-СООН група налазила се испод равни Н3 Asp351-Н12 Leu536, значајно дислоцирана у односу на Н3 Asp351 у поређењу са **1R5K** и **5AK2** као једињењима са SERD фармакологијом, не доводећи до дестабилизације Н11/Н12 и деградације рецептора у протеозомима [74,75]: једињење **3DQ-4a** испољило је SERM фармакологију [73].

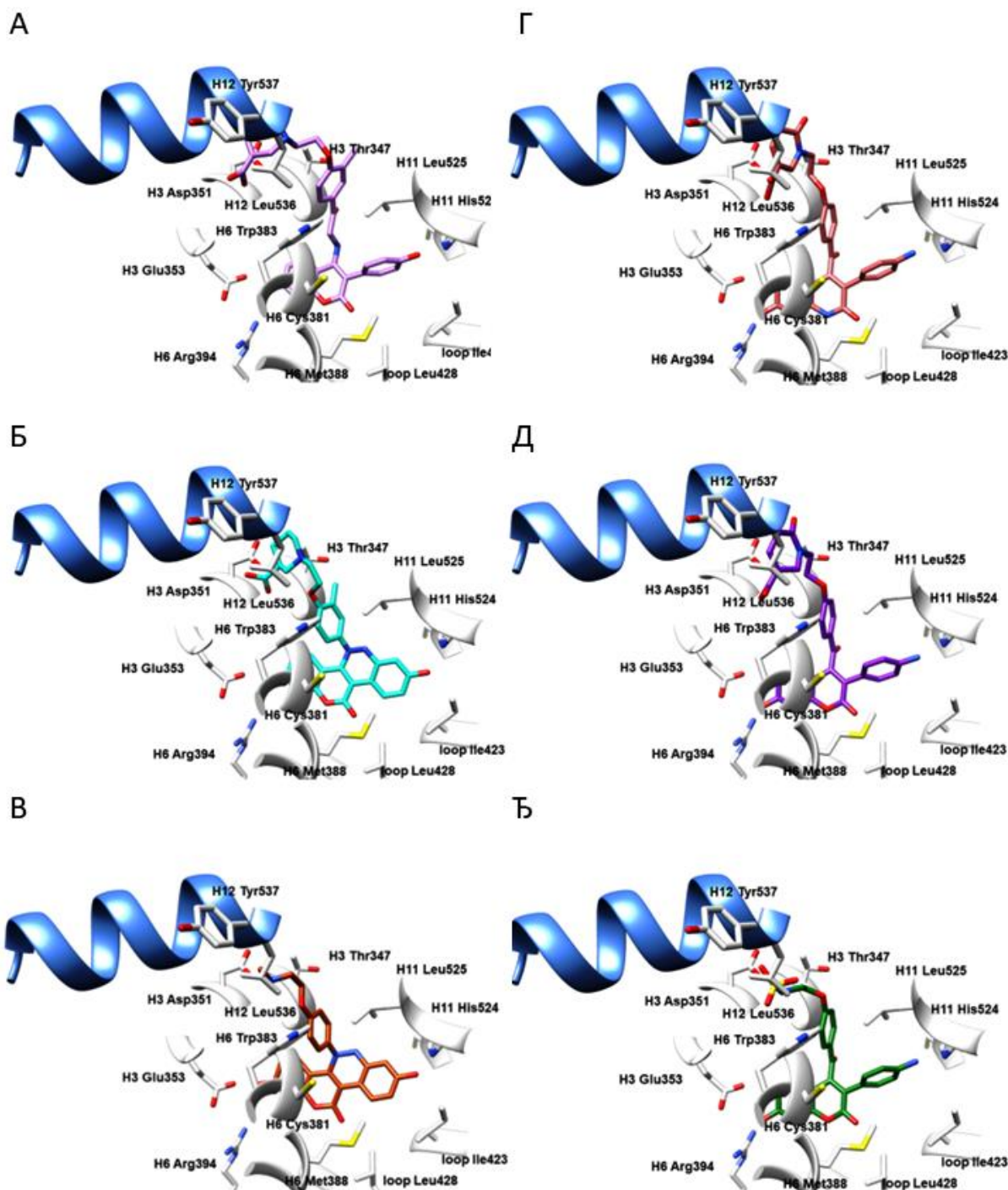
Једињење **3DQ-2a** (Слика 3.8Б, Табела 3.8) било је 1,37 пута мање активно од **3DQ-4a**, али 2,85 активније од **Ral**. Његово језгро 2,8-дихидрокси-5*H*-хромено[4,3-с]цинолин-11(6*H*)-она (Слика 3.9Б) заузело је повољну биоактивну конформацију унутар лиганд-везивног домена ER α , али је било ротирано у равни за 15° у односу на Н12, ако би се упоредило са језгром 7-хидрокси-3-(4-хидроксифенил)-2*H*-хромен-2-она једињења **3DQ-4a**. Сходно томе, јачине формираних водоничних веза са Glu353 ($d_{\text{HВ}} = 2,542 \text{ \AA}$) и Н6 Arg394 ($d_{\text{HВ}} = 2,618 \text{ \AA}$) биле су мање, што је резултовало и мањом вредношћу биолошке активности. И поред конформационе промене главног језгра, формирана је водонична веза са Н11 His524 ($d_{\text{HВ}} = 2,862 \text{ \AA}$). Ротација се догодила као последица супституције главног језгра са 1-(2-(2,4-диметилфенокси)етил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином, што је свакако било корисно у погледу биолошке активности: етаноламински мост лоцирао се у близини Н12 Leu536, док је 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбонска киселина била ближа аминокиселини Н3 Asp351. Иако слабија, водонична веза са Н3 Asp351 и даље је постојала ($d_{\text{HВ}} = 3,329 \text{ \AA}$) и била је успостављена преко карбоксилне групе на положају С3 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбонске киселина (што је резултовало понашањем једињења у складу са SERM фармакологијом [73]), али је атом азота унутар прстена тетрахиdropиридина остварио неочекиване електростатичке интеракције са хидроксилном групом бочног ланца Н3 Thr347. Надаље, несупституисани атом азота

Резултати и дискусија

унутар главног језгра 1,2-дихидропиридазина успоставио је електростатичке интеракције са Н11 His524, указујући на конверзију $-C(=O)$ у $-NH-$ као даљи разлог смањења биолошке активности **3DQ-2a** у односу на **3DQ-4a**.

Унутар структуре **3DQ-1a** (Слика 3.8В, Табела 3.8, Слика 3.9В), 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбонска киселина замењена је $-NH-CH_3$ функционалном групом, смањујући на тај начин стерни притисак према Н12. Ипак, чак је и секундарни амин поседовао довољан капацитет да награди водоничну везу са Н3 Asp351 ($d_{NH} = 2,814 \text{ \AA}$), на тај начин омогућавајући једињењу да испољи SERM фармакологију [73]. Будући да је једињење **3DQ-1a** делило идентично главно језгро са **3DQ-2a** (очекивано градећи водоничне везе са Н3 Glu353, Н6 Arg394 и Н11 His524 сличне јачине, $d_{NH} = 2,553, 2,594$ и $2,638 \text{ \AA}$, респективно) и да је било у стању да активира аминокиселину Н3 Asp351, одсуство $o-CH_3$ функционалне групе био је фактор који је узроковао 1,73 пута мању активност у односу на **3DQ-4a** (једињење **3DQ-1a** је и даље било 2,24 пута активније од **Ral**).

Одсуство $o-CH_3$ функционалне групе такође је био разлог ниже биолошке активности једињења **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b** у односу на **3DQ-4a**. Тако, у структурама једињења **3DQ-1b** (једињење изграђено на језгру хинолин-2(1*H*)-она, Слика 3.8Г, Табела 3.8, Слика 3.9Г, активност 1,94 пута слабија у односу на **3DQ-4a** али двоструко већа од **Ral**) и **3DQ-2b** (једињење базирано на језгру кумарина, Слика 3.8Д, Табела 3.8, Слика 3.9Д) активност 2,05 пута мања од **3DQ-4a** али 1,90 пута већа у односу на **Ral**), фрагмент 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине замењен је по принципу биоизостерије са 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином. Након формирања биоактивних конформација једињења **3DQ-1b** и **3DQ-2b** новоуведени фрагмент окупирао је простор ограничен аминокиселинама Н3 Asp351, Н3 Thr347 и Н12 Leu536. Маргинална разлика у биолошкој активности између **3DQ-1b** и **3DQ-2b** последица је разлике у дужини/снази водоничне везе која је успостављена између $C3-COOH$ остатка 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине и Н3 Asp351 (дужина водоничне везе једињења **3DQ-1b** била је $2,814 \text{ \AA}$ и била је јача у односу на водоничну везу успостављену од стране **3DQ-2b** чија је дужина била $2,911 \text{ \AA}$). Карбонилна група на положају С6 унутар 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине оба једињења успоставила је електростатичке интеракције са хидроксилном групом бочног ланца Н3 Thr347. Ипак, оба једињења антиципирана су као једињења са SERM фармакологијом [73].



Слика 3.9. Биоактивне конформације **3DQ-4a** (A); **3DQ-2a** (B); **3DQ-1a** (B); **3DQ-1b** (Г); **3DQ-2b** (Д); **3DQ-3b** (Ђ) унутар активног центра ER α . Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Што се тиче једињења **3DQ-3b** (Слика 3.8Ђ, Табела 3.8, Слика 3.9Ђ, активност 2,05 пута мања од **3DQ-4a** али 1,90 пута већа у односу на **Ral**), супституција 1,2,5,6-

Резултати и дискусија

тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине сулфаминском киселином испоставила се врло бенефитном јер је једињење **3DQ-3b** испољило идентичну вредност биолошке активности као **3DQ-2b**: остатак сулфаминске киселине остварио је компактне интеракције са Asp351 при чему су формиране две водоничне везе, једна преко секундарног амина ($d_{\text{HВ}} = 2,921 \text{ \AA}$) и једна од стране S-OH групе ($d_{\text{HВ}} = 2,852 \text{ \AA}$), осигуравајући SERM фармакологију [73]. Међутим, услед одсуства *o*-CH₃ функционалне групе и последичних одговарајућих интеракција са метил групом бочног ланца Н3 Thr347, биоактивне конформације претходно описаних молекула потиснуте су ка доњем делу LBD-што је резултовало и формирањем очекиваних водоничних веза са Н3 Glu353 ($d_{\text{HВ}} = 2,623, 2,593$ и $2,699 \text{ \AA}$ за **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b**, респективно) и Н6 Arg394 ($d_{\text{HВ}} = 2,618, 2,595$ и $2,685 \text{ \AA}$ за **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b**, респективно), док су сличне интеракције са Н11 His524 биле успостављене преко PhNH₂ функционалне групе ($d_{\text{HВ}} = 2,678, 2,582$ и $2,701 \text{ \AA}$ за **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b**, респективно).

За разлику од до сада описаних једињења, **3DQ-1e** (Додатни материјал II: Слика ДМ298А, Табела 3.8, Додатни материјал II: Слика ДМ303А) био је ускраћен за електростатичке интеракције са Н3 Met381 због елиминације карбонилне групе лактонског прстена кумарина, што је резултовало 3,53 пута мањом вредности биолошке активности у односу на **3DQ-4a** (биолошка активност у односу на **Ral** била је 1,10 пута боља). Очекиване водоничне везе са Н3 Glu353 ($d_{\text{HВ}} = 2,533 \text{ \AA}$) и Н6 Arg394 ($d_{\text{HВ}} = 2,596 \text{ \AA}$), као и са Н11 His524 ($d_{\text{HВ}} = 2,657 \text{ \AA}$), успостављене су од стране фенолних група присутних у структури једињења. Ипак, услед редукције C3=C4 двоструке везе хромана у једноструку, прстен 1,2-дихидропиридазина у структури **3DQ-1e** био је електростатички привучен од стране Н11 His524, метил група 1-(1-(октахидро-1,8-нафтиридин-1(2H)-ил)пропан-2-илокси)пропан-2-она као *N*-супституента прстена 1,2-дихидропиридазина била је укључена у хидрофобне интеракције са Н3 Thr347, док је прстен декахидро-1,8-нафтиридина формирао је водоничну везу са Н3 Asp351 ($d_{\text{HВ}} = 3,217 \text{ \AA}$). Управо је поменута водонична веза била кључна за испољавање SERM фармакологије једињења **3DQ-1e** [73]. С друге стране, карбонилна група на положају C4 није успоставила интеракције са Н3 Thr347 и испоставило се да је била грешка са становишта рационалног дизајна.

Што се тиче преосталих антагониста ER α , само је **3DQ-1c** (Додатни материјал II: Слика ДМ298Б, Табела 3.8, Додатни материјал II: Слика ДМ303Б, биолошка

Докторска дисертација Незрине Куртановић

активност 3,73 пута мања од оне испољене од стране једињења **3DQ-4a**) био 1,10 пута потентнији од **Ral**. Са друге стране, **3DQ-2c** (Додатни материјал II: Слика ДМ298В, Табела 3.8, Додатни материјал II: Слика ДМ303В биолошка активност 3,94 пута мања од **3DQ-4a**), **3DQ-3a** (Додатни материјал II: Слика ДМ298Г, Табела 3.8, Додатни материјал II: Слика ДМ303Г, биолошка активност 4 пута мања од **3DQ-4a**) и **3DQ-1d** (Додатни материјал II: Слика ДМ298Д, Табела 3.8, Додатни материјал II: Слика ДМ303Д, биолошка активност 5,53 пута мања од **3DQ-4a**) и даље су били моћнији антагонисти од **4-ОНТ** (активност већа од 1,47 до 1,49 пута). Тако се постојање изохромен-1-оновог језгра у структурама **3DQ-1c** и **3DQ-2c**, услед неизбежног интрамолекуларног премештања лактонске карбонилне групе, рефлектовало на слабење потенцијалних електростатичких интеракција према Н3 Met381 и на смањење биолошке активности, иако су и **3DQ-1c** и **3DQ-2c** формирали јаке водоничне везе са Н3 Glu353 ($d_{\text{НВ}} = 2,557 \text{ \AA}$, $d_{\text{НВ}} = 2,584 \text{ \AA}$, респективно), Н6 Arg394 ($d_{\text{НВ}} = 2,574 \text{ \AA}$, $d_{\text{НВ}} = 2,593 \text{ \AA}$, респективно) и Н11 His524 ($d_{\text{НВ}} = 2,641 \text{ \AA}$, $d_{\text{НВ}} = 2,677 \text{ \AA}$, респективно) преко одговарајућих фенолних функционалних група, такође остваривши стерне интеракције са Н3 Asp351, Н12 Leu536 и Н11 Trp383 преко прстена 1,2-дихидроизокинолина (**3DQ-1c**) или пирролидин-2,5-диона (**3DQ-2c**). Нешто већа вредност биолошке активности једињења **3DQ-1c** у односу на **3DQ-2c** последица је интензивних хидрофобних интеракција између 1,2-дихидроизокинолина и Н12, које су надјачале водоничне везе између једне од карбонилних група пирролидин-2,5-диона и Н3 Asp351 ($d_{\text{НВ}} = 3,013 \text{ \AA}$).

Смањење биолошке активности једињења **3DQ-3a** (аналога једињења **3DQ-2a**) у односу на **3DQ-4a** (Додатни материјал II: Слика ДМ298Г, Табела 3.8, Додатни материјал II: Слика ДМ303Г, Табела 3.8, антагонист са биолошком активношћу 4 пута мањом од **3DQ-4a**, 2,92 пута мањом од **3DQ-2a** и 1,03 пута мањом од **Ral**) може се повезати са смањењем стерног притиска на метил групу бочног ланца Н3 Thr347: присуство 1-(пиперидин-1-илметокси)бутан-2-она (и последично одсуство *o*-CH₃ функционалне групе) изазвало је пад вредности биолошке активности упркос формирању водоничне везе између хетероцикличног азота и Н3 Asp351 ($d_{\text{НВ}} = 3,512 \text{ \AA}$).

Коначно, једињења **3DQ-1d** (Додатни материјал II: Слика ДМ298Д, Табела 3.8, Додатни материјал II: Слика ДМ303Д, активност 5,52 пута мања од **3DQ-4a**) и **3DQ-2d** (Додатни материјал II: Слика ДМ298Ђ, Табела 3.8, Додатни материјал II: Слика ДМ303Ђ, Табела 3.8, активност 5,95 пута мања од **3DQ-4a**), показали су нижу вредност биолошке активности од **Ral** (0,70 и 0,65 пута, респективно), док је антагонист **3DQ-1d**

Резултати и дискусија

био потентнији од **4-OHT** (1,07 пута већа вредност биолошког потенцијала). Вероватно због одсуства лактонске карбонилне функције и последичног одсуства интеракција са H3 Met381, **3DQ-1d** и **3DQ-2d** били су ротирани у равни за $\approx 45^\circ$ у односу на друга једињења. Сходно томе, *o*-CH₃/H3 Thr347 интеракције замењене су неповољнијим T-интеракцијама са H3 Trp383, истовремено повећавајући растојање према H3 Asp351 на више од 4 Å, где су прстенови 7,8-дихидро-1,7-нафтиридина (**3DQ-1d**) и 6,7-дихидро-5H-пироло[3,4-b]пиридина (**3DQ-2d**) остварили само електростатичке интеракције са циљаном аминокиселином.

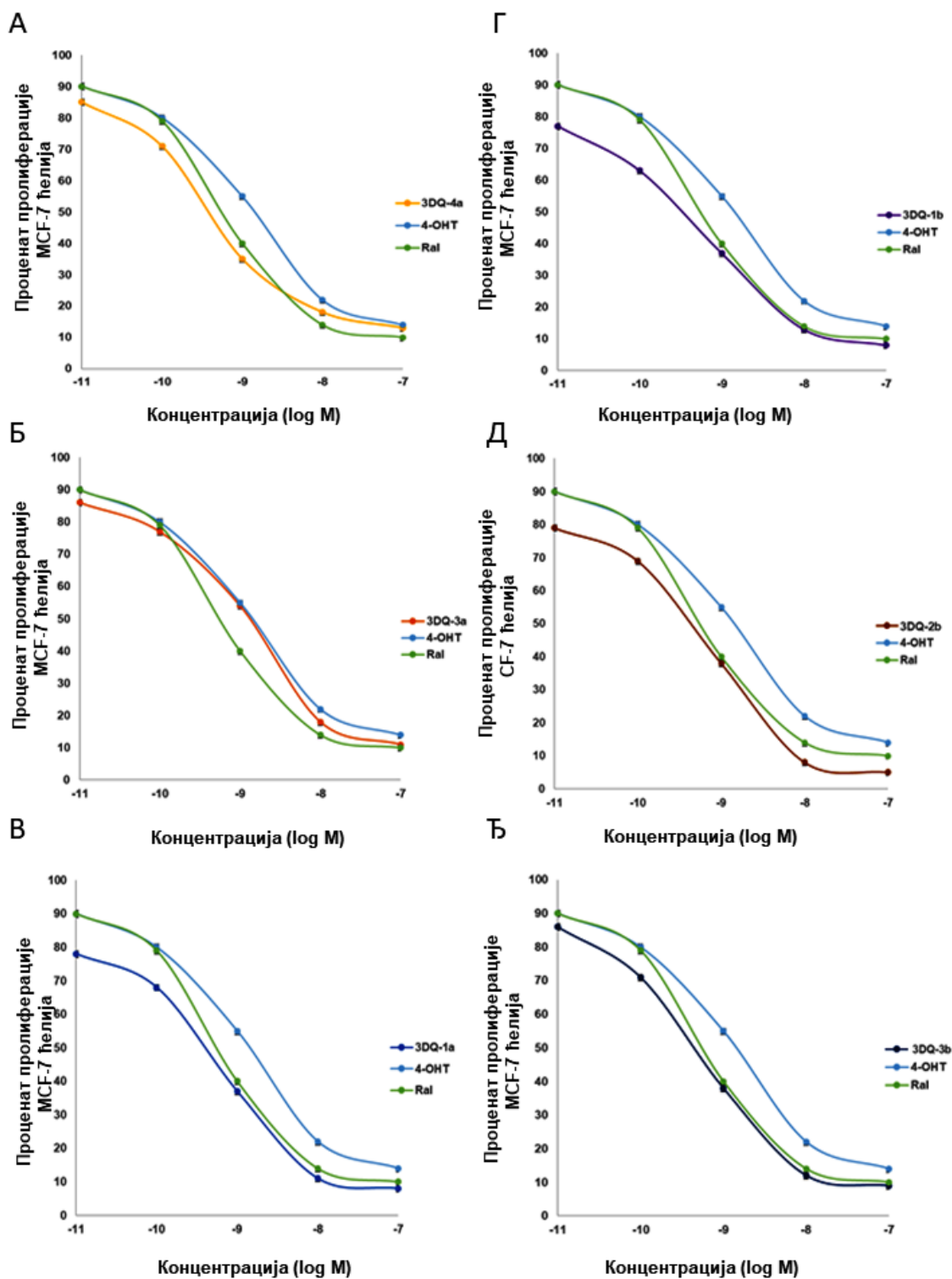
Што се тиче једињења **3DQ-2a***, **3DQ-1a***, **3DQ-1e*** и **3DQ-3a*** њихове одређене IC₅₀ вредности откриле су лош антагонистички профил (Додатни материјал II: Слика ДМ299, Табела 3.8). С друге стране, на основу вредности logRBA, сва једињења, осим **3DQ-1a***, **3DQ-2a***, **3DQ-3a*** и **3DQ-1e***, показала су индекс селективности од око 2. логаритамске јединице између ER α и ER β (Табела 3.8), највероватније због немогућности да остваре повољне интеракције са знатно мањим лиганд-везујућим доменом ER β [73].

Антипролиферативна активност синтетисаних једињења 3DQ-1a до 3DQ-1e против ER α (+) и ER α (-)-зависних ћелијских линија рака дојке

Синтетисана једињења даље су подвргнута процесу утврђивања њихове антипролиферативне активности против ER α (+) MCF-7 (Слика 3.10 и Додатни материјал II: Слика ДМ304, Табела 3.9), односно ER α (-) MDA-MB-231 (Додатни материјал II: Сlike ДМ305-ДМ306, Табела 3.9) ћелијских линија, као и на способност индукције смањења магнитуде физиолошког одговора ER α (енг. downregulation) на нивоу MCF-7 ћелија (Табела 3.9): одсуство деградације ER α одбацило је могућност да тестирана једињења испољавају SERD фармакологију, што је било у сагласности са њиховим предвиђеним биоактивним конформацијама, чиме је заправо индиректно потврђена SERM фармакологија. Такође, чиненица да није било индукције прогестеронског рецептора (PR) указало је да једињења нису испољила конкурентни антагонизам према PR.

Једињења **3DQ-4a** (Слика 3.10А, Табела 3.9) и **3DQ-2a** (Слика 3.10Б, Табела 3.9) била су најактивнији инхибитори раста MCF-7 ћелија са IC₅₀ вредностима од 250 и 320 pM, вредностима 3,56 пута и 2,78 нижим од антипролиферативне активности **Ral**. Једињење **3DQ-4a** показало је највећи индекс осетљивости (енг. selectivity index, SI)

између ER α (-) и ER α (+) ћелијских линија у износу од 367,04. С друге стране, SI једињења **3DQ-2a** износила је 281,47. Активност једињења **3DQ-1a** (Слика 3.10B, Табела 3.9, активност 2,18 пута већа од **Ral**) била је упоредива са **3DQ-4a** и **3DQ-2a**.



Слика 3.10. Антипролиферативна активност **3DQ-4a** (А); **3DQ-2a** (Б); **3DQ-1a** (В); **3DQ-1b** (Г); **3DQ-2b** (Д); **3DQ-3b** (Ѕ) у односу на MCF-7 ћелијске линије.

Резултати и дискусија

Табела 3.9. Антипролиферативна активност синтетисаних деривата **3DQ-1a** до **3DQ-1e** и индекс селективности у односу на хормон-зависне MCF-7 ћелијске линије канцера дојке и хормон-независне MDA-MB-231 ћелијске линије канцера дојке, антипролиферативна активност у односу на нормалне MRC-5 ћелијске линије хуманих фибробласта плућа, супресија одговора ER α на хормонски стимулус унутар MCF-7 ћелијских линија, односно антагонизам у односу на PR унутар MCF-7 ћелијских линија, као и антиканцерогена активност против Ishikawa ћелијских линија ендометријалног аденокарцинома.

Јед.	MCF-7 ^a (IC ₅₀ nM)	MDA-MB-231 ^b (IC ₅₀ nM)	SI ^b	MRC-5 ^г (IC ₅₀ nM)	MCF-7 DR ^д (IC ₅₀ nM)	PR MCF-7 ^ђ (IC ₅₀ nM)	Ishikawa ^е (IC ₅₀ nM)
3DQ-1a	0,41±0,12 ^{ж,‡,§}	83,67±0,37 ^{‡,§}	204,07 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,47±0,37 ^{г,‡,§}
3DQ-2a	0,32±0,11 ^{‡,§}	90,07±0,51 ^{‡,§}	281,47 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,39±0,13 ^{‡,§}
3DQ-3a	1,03±0,09 ^{‡,§}	41,75±0,46 ^{‡,§}	40,53 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,96±0,32 ^{‡,§}
3DQ-4a	0,25±0,06 ^{‡,§}	91,76±0,75 [‡]	367,04 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,34±0,12 ^{‡,§}
3DQ-1b	0,44±0,03 ^{‡,§}	76,98±0,49 ^{‡,§}	174,95 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,41±0,12 ^{‡,§}
3DQ-2b	0,45±0,11 ^{‡,§}	71,34±0,64 ^{‡,§}	158,53 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,48±0,23 ^{‡,§}
3DQ-3b	0,45±0,12 ^{‡,§}	75,72±0,45 ^{‡,§}	168,27 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,54±0,21 ^{‡,§}
3DQ-1c	0,80±0,03 ^{‡,§}	41,74±0,67 ^{‡,§}	52,18 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,76±0,21 ^{‡,§}
3DQ-2c	0,93±0,09 ^{‡,§}	41,45±0,76 ^{‡,§}	44,57 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,89±0,24 ^{‡,§}
3DQ-1d	1,25±0,15 ^{‡,§}	31,23±0,64 ^{‡,§}	24,98 ^{‡,§}	>100	>100	>100	1,41±0,32 ^{‡,§}
3DQ-2d	1,37±0,34 ^{‡,§}	31,56±0,49 ^{‡,§}	23,07 ^{‡,§}	>100	>100	>100	1,42±0,23 ^{‡,§}
3DQ-1e	0,73±0,06 ^{‡,§}	51,45±0,79 ^{‡,§}	68,60 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,77±0,43 ^{‡,§}
E₂^з	НД ^п	НД	НД	НД	НД	НД	НД
4-ОНТ.^н	1,20±0,34 [§]	36,76±0,46 [§]	30,63 [§]	>100	>100	>100	1,27±0,32 [§]
Ral.^ј	0,89±0,05 [‡]	92,35±0,97 [‡]	103,76 [‡]	>100	>100	>100	0,94±0,32 [‡]
Контрола^к	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД

^aКонцентрација која спречава раст 50% MCF-7 ћелијских линија; ^bКонцентрација која спречава раст 50% MDA-MB-231 ћелијских линија; ^вИндекс селективности (енг. selectivity index, SI) према ћелијским линијама: [IC₅₀(MDA-MB-231)]/[IC₅₀(MCF-7)] зарад дефинисања антипролиферативног ефекта било дизајнираних једињења или референтних једињења; ^гКонцентрација која спречава раст 50% MRC-5 ћелијских линија (ћелијских линија хуманих фибробласта плућа, као позитивне контроле); ^дСупресија одговора ER α на хормонски стимулус мерена унутар MCF-7 ћелијских линија; ^ђАнтагонизам прогестерон рецептора одређен је као биомаркер за антагонизам ER α унутар MCF-7 ћелијских линија; ^еКонцентрација која спречава раст 50% Ishikawa ћелијских линија; ^жРезултати су представљени као средња вредност±стандардна девијација; ^з17 β -естрадиол; ^н4-хидрокситамоксифен (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОНТ**); ^јРалоксифен (енг. **Raloxifene, Ral**); ^к0.9% NaCl; ^пНије дефинисано. *p < 0,05 када се пореди са контролном групом; †p < 0,05 када се пореди са **E₂**; ‡p < 0,05 када се пореди са **4-ОНТ**; §p < 0,05 када се пореди са **Ral**.

За разлику од претходно описаних, једињења **3DQ-1b** (Слика 3.10Г, Табела 3.9, активност 2,02 пута већа од **Ral**), **3DQ-2b** (Слика 3.10Д, Табела 3.9, активност 1,98 пута већа од **Ral**) и **3DQ-3b** (Слика 3.10Ђ, Табела 3.9, активност 1,98 пута већа од **Ral**) инхибирани су раст MCF-7 ћелијских линија са активношћу од око 450 pM, при чему је једињење **3DQ-1b** имало највећи SI. Антипролиферативне активности **3DQ-1e**

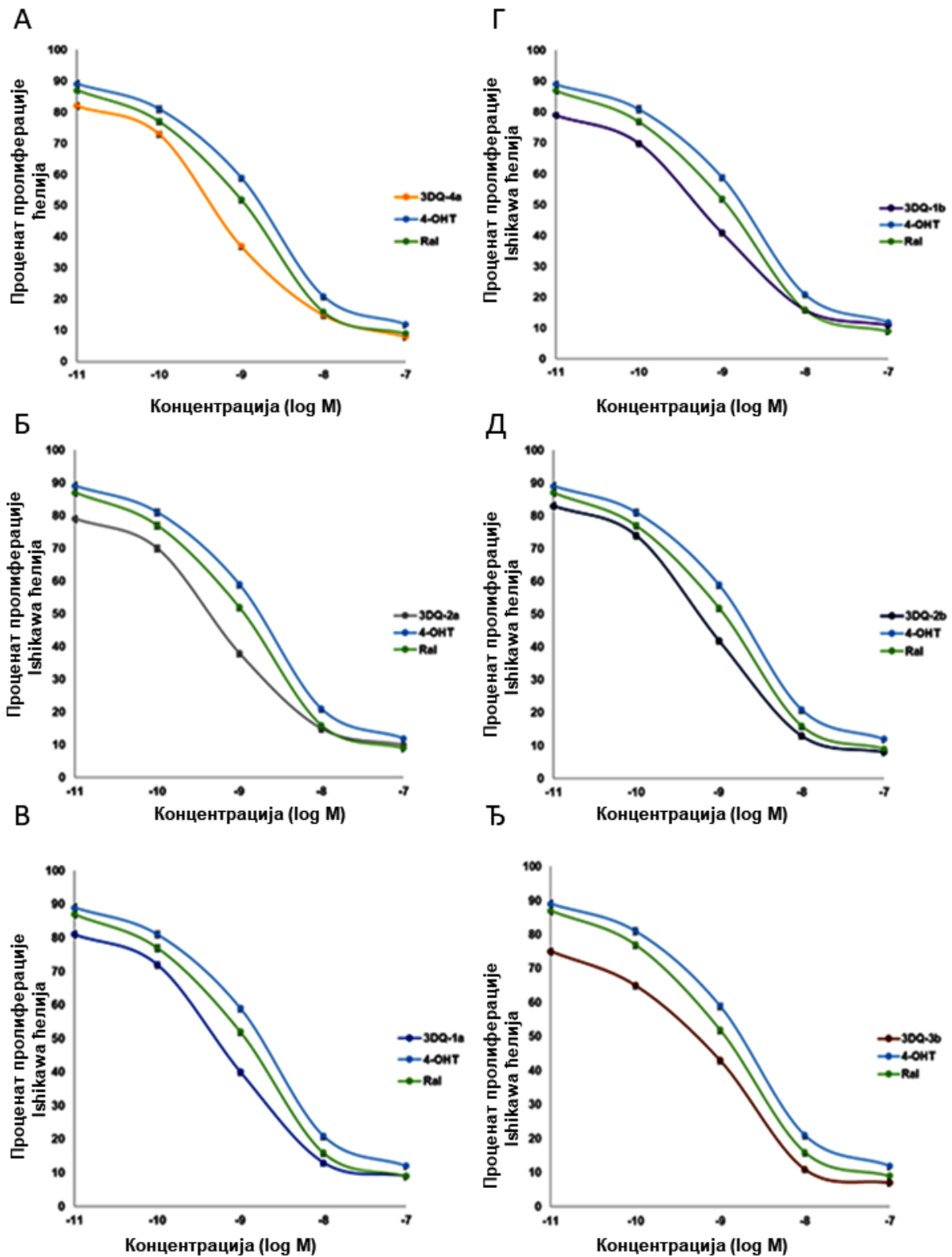
Докторска дисертација Незрине Куртановић

(Додатни материјал II: Слика ДМ304А, Табела 3.9) и **3DQ-1c** (Додатни материјал II: Слика ДМ304Б, Табела 3.9) против MCF-7 ћелија, биле су веће него она испољена од стране **Ral** (активност већа 1,22 и 1,11 пута, респективно), али су биле 2,92 и 2,28 пута, односно, 3,2 и 2,5 пута пута ниже него код **3DQ-4a** и **3DQ-2a**, респективно, такође окарактерисане и са нижим SI вредностима. Једињења **3DQ-2c** (Додатни материјал II: Слика ДМ304В, Табела 3.9) и **3DQ-3a** (Додатни материјал II: Слика ДМ304Г, Табела 3.9) имала су антипролиферативни потенцијал између **Ral** и **4-OHT**, док су једињења **3DQ-1d** (Додатни материјал II: Слика ДМ304Д, Табела 3.9) и **3DQ-2d** (Додатни материјал II: Слика ДМ304Ђ, Табела 3.9) сматрана неактивним због ниже антипролиферативне активности у односу на контроле. Пошто су сва једињења показала антипролиферативни потенцијал у односу на MCF-7 ћелијске линије (тј. ER α позитивне, PR позитивне и HER2 негативне), сви даљи експерименти спроведени су само на MCF-7 ћелијским линијама.

Антипролиферативна активност синтетисаних једињења 3DQ-1a до 3DQ-1e против ER α (+)-зависних канцера ендометријума

Дуготрајно лечење канцера дојке једињењима са SERM фармакологијом попут тамоксифена често је асоцирано са стимулацијом пролиферације ћелија ендометријума и са порастом инциденце ендометријалног канцера (енг. endometrial cancer, EC) [258]. Стога је било неопходно да се овде испитивана једињења са SERM фармакологијом подвргну евалуацији у смислу испољавања агонистичке активности унутар ћелија ендометријума. Једињења су администрирана на Ishikawa ћелијама ендометријалног аденокарцинома (енг. Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells) у процедури сличној оној током администрације на MCF-7 ћелијским линијама (Слика 3.11 и Додатни материјал II: Слика ДМ307Ђ, Табела 3.10), показавши значајну антипролиферацију и резултате упоредиве са активношћу против MCF-7 ћелијских линија, тако потврђујући афинитет ка антагонизму ER α у окружењу ендометријума, добру активност против хиперплазије ендометријума, у исто време индицирајући одсуство тенденције ка узроковању ендометријалног канцера. У том смислу су тестирана једињења са SERM фармакологијом показала фармакологију сличну **Ral**, за који је доказано да не стимулише раст ендометријума код жена у постменопаузи током продужене терапије (дуже од 3 године), што је доведено у везу са особином лека да не индукује експресију било ER α или ER β унутар ћелија ендометријума [258].

Резултати и дискусија



Слика 3.11. Антипролиферативна активност **3DQ-4a** (А); **3DQ-2a** (Б); **3DQ-1a** (В); **3DQ-1b** (Г); **3DQ-2b** (Д); **3DQ-3b** (Ѕ) у односу на Ishikawa ћелијске линије.

Утицај синтетисаних антагониста ER α 3DQ-1a до 3DQ-1e на процесе сигналне трансдукције унутар MCF-7 ћелијских линија

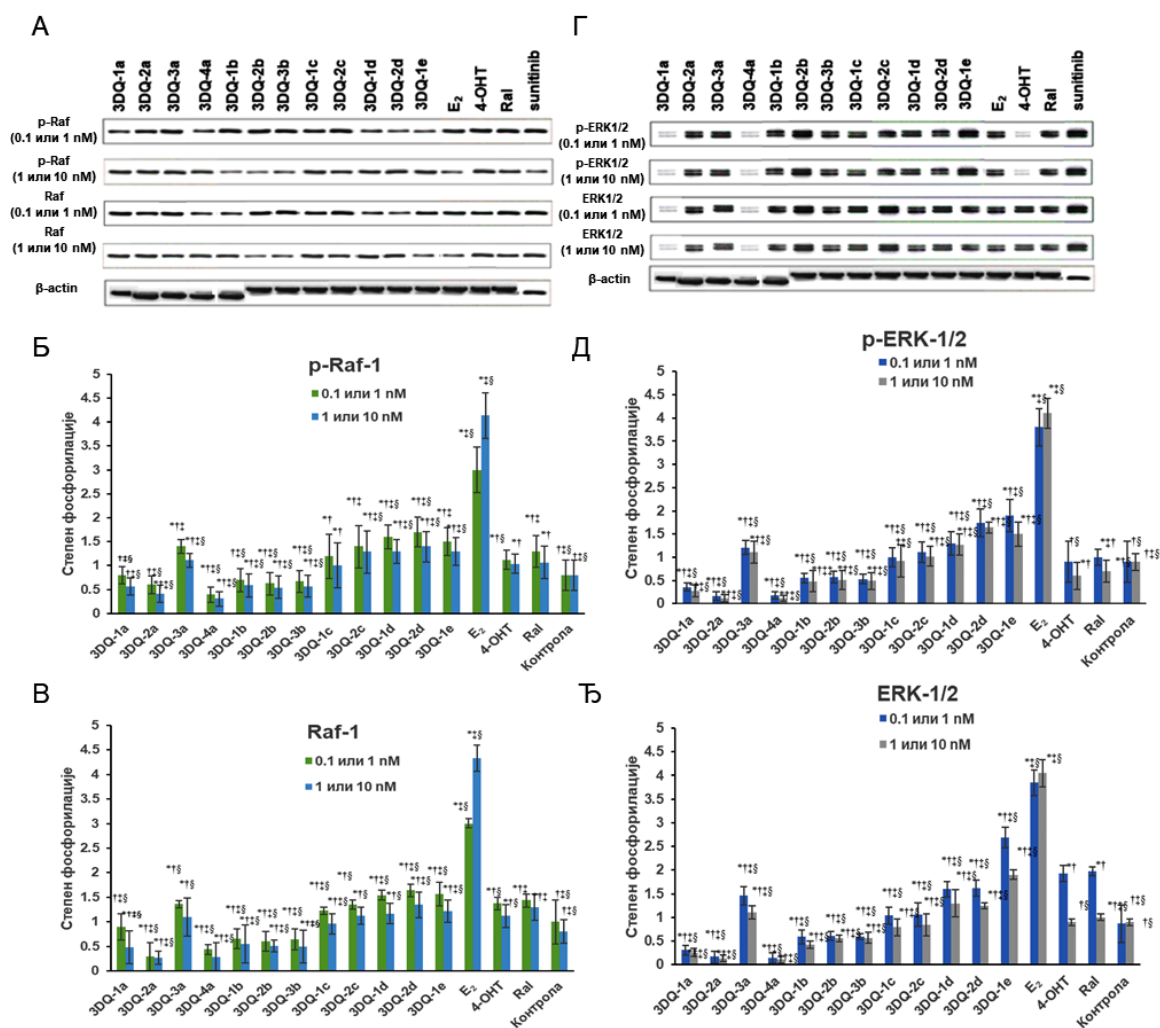
Једињења су даље испитивана на утицај током фосфорилацијом регулисане сигналне трансдукције унутар MCF-7 ћелијских линија (Слика 3.12) [258]. Антагонисти ER α кумаринског типа модификују Raf-1/MAPK/ERK сигналну каскаду која контролише пролиферацију и диференцијацију ћелија, а такође је добро повезана са резистенцијом на ендокрину терапију [258]. Према томе, блокада Raf-1/MAPK/ERK сигналне трансдукције треба да појача ефекат анти-хормонске терапије и да успори ендокрину резистенцију. Стога је експресија два ефектора, Raf-1 и ERK1/2, било у фосфорилисаном или у природном облику, одређивана након администрације испитиваних једињења у две граничне концентрације које окружују IC₅₀ вредности против MCF-7 ћелија (Табела 3.9): сва једињења, осим **3DQ-3a**, **3DQ-1d** и **3DQ-2d** администрирана су у концентрацијама од 0,1 и 1 nM током 24 сата; за означена једињења концентрације су биле 1 и 10 nM. Уопштено говорећи, пролиферација ћелија рака дојке подстакнута унакрсном комуникацијом између ER α и Raf-1/MAPK/ERK сигналне каскаде, била је ограничена применом овде испитиваних антагониста ER α кумаринског типа.

Сва једињења значајно су инхибирала активацију p-Raf-1 (Слике 3.12А и 5Б) и p-ERK1/2 (Слике 3.12Г и 3.12Д) у примењеним концентрацијама, док су укупни нивои Raf-1 (Слике 3.12А и 3.12В) и ERK1/2 (Слике 3.12Г и 3.12Ђ) остали непромењени. Најмању стопу фосфорилације унутар сваког од ефектора дозволило је једињење **3DQ-4a** (0,4 и 0,31 јединица против p-RAF-1, у нижој и вишој примењеној концентрацији, респективно, Слика 3.12Б, активност 3,25 до 3,42 већа у односу на **Ral**; 0,44 и 0,29 јединица против Raf-1, Слика 3.12В, активност 3,28 и 4,48 већа у односу на **Ral**; 0,18 и 0,12 јединица против p-ERK1/2, Слика 3.12Д, активност 5,56 и 5,58 већа у односу на **Ral**; 0,15 и 0,11 јединица против ERK1/2, Слика 3.12Ђ, активност 14,07 и 9,09 пута већа у односу на **Ral**) што је мање утицало на активацију MAPK пута (који се одвија као последица фосфорилације Raf-1) у односу на ћелијску апоптозу (исход ERK1 и ERK2 фосфорилације). Већи афинитет једињења **3DQ-4a** према индукцији апоптозе MCF-7 ћелијских линија одразио се на контролу ћелијског циклуса (видети даљу дискусију).

С друге стране, антагонист ER α **3DQ-2a** инхибрирао је фосфорилацију p-Raf-1 са нешто мањим интензитетом у односу на **3DQ-4a** (Слике 3.12Б и 3.12В, 0,6 и 0,41 јединица према p-Raf-1, Слика 3.12Б, активност 2,16 до 2,58 пута већа у односу на **Ral**),

Резултати и дискусија

али је испољио већи афинитет према фосфорилацији RAF-1 (0,3 и 0,27 јединица према Raf-1, Слика 3.12В, активност 4,80 до 4,81 пута већа у односу на **Ral**); инхибиција протеин киназа ERK1 и ERK2 након администрације **3DQ-2a** (Слике 3.12Д и 3.12Ђ, 0,16 и 0,12 јединица према p-ERK1/2, Слика 3.12Д, активност 6,25 и 5,83 пута већа у односу на **Ral**; 0,17 и 0,13 јединица према ERK1/2, Слика 3.12Ђ, активност 11,15 и 7,63 пута већа у односу на **Ral**) била је упоредива са оном испољеном од стране **3DQ-4a**.



Слика 3.12. Супресија одговора на стимулус Raf-1/ERK пута сигналне трансдукције унутар MCF-7 ћелијских линија након администрације испитиваних антагониста ER α **3DQ-1a** до **3DQ-1e** кумаринског типа (за сва разматрана једињења, осим за **3DQ-3a**, **3DQ-1d** и **3DQ-2d**, MCF-7 ћелије третиране су концентрацијама од 0,1 и 1 nM, покривајући опсег у коме су дефинисане IC₅₀ вредности; за означена једињења концентрације су биле 1 и 10 nM). Експресије p-Raf-1 и Raf-1 (А), или p-ERK1/2 и ERK1/2 (Г) испитиване су Western blot техником унутар MCF-7 ћелијских линија. Денситометријска анализа извршена је да би се утврдила стопа фосфорилације p-Raf-1 (Б), Raf-1 (В), p-ERK1/2 (Д) и ERK1/2 (Ђ). * p < 0,05 у поређењу са контролном групом; † p < 0,05 у поређењу са E₂; ‡ p < 0,05 у поређењу са 4-OHT; § p < 0,05 у поређењу са Ral.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

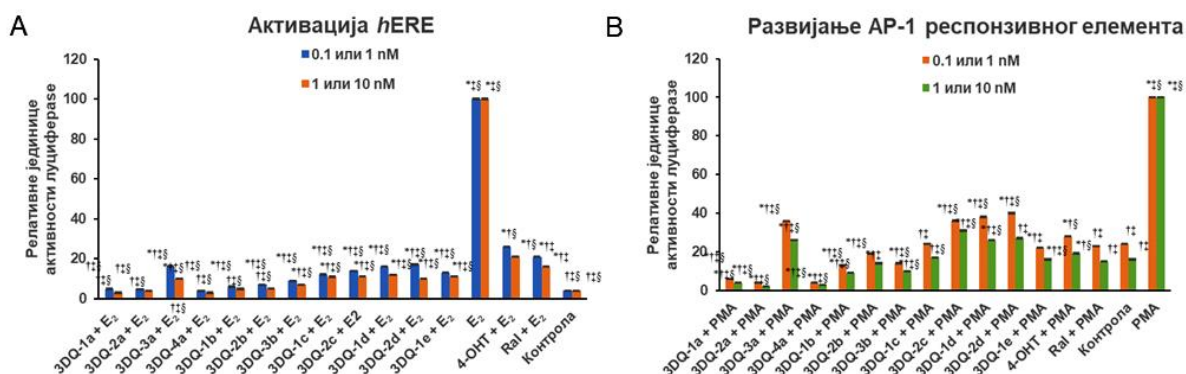
Једињења **3DQ-1a** (1,63 и 1,89 пута моћније у односу на **Ral** у смислу инхибиције p-Raf-1 сигнализације; 1,60- и 2,65 пута моћније у односу на **Ral** у смислу инхибиције Raf-1 сигнализације; 2,78 и 2,59 пута снажније у односу на **Ral** у погледу инхибиције p-ERK-1/2 сигнализације; 6,35 и 3,85 пута снажније у односу на **Ral** у виду инхибиције ERK-1/2 сигнализације), **3DQ-1b** (1,86 и 1,80 пута јаче у односу на **Ral** у погледу инхибиције p-Raf-1 сигнализације; 2,18 и 2,36 пута јаче у односу на **Ral** у погледу инхибиције Raf-1 сигнализације; 1,82 и 1,49 пута снажније у односу на **Ral** у виду инхибиције p-ERK-1/2 сигнализације; 3,34 и 2,38 пута снажније у односу на **Ral** када се говори о инхибицији сигнализације ERK-1/2), **3DQ-2b** (2,36 и 2,55 пута снажније у односу на **Ral** у погледу инхибиције сигнализације p-Raf-1; 1,60 и 2,65 пута јаче у односу на **Ral** у вези са инхибицијом Raf-1 сигнализације; 1,75 и 1,37 пута снажније у односу на **Ral** у погледу инхибиције p-ERK-1/2 сигнализације; 3,23 и 1,78 пута снажније у односу на **Ral** у погледу инхибиције сигнализације ERK-1/2) и **3DQ-3b** (1,94 пута и 1,89 пута снажније у односу на **Ral** у погледу инхибиције сигнализације p-Raf-1; 2,22 и 2,60 пута јаче у односу на **Ral** у погледу инхибиције сигнализације Raf-1; 1,89 и 1,43 пута снажније у односу на **Ral** у вези са инхибицијом p-ERK-1/2 сигнализације; 3,28 и 1,75 пута снажније у односу на **Ral** у вези са инхибицијом ERK-1/2 сигнализације), показала су упоредиву биолошку активност против фосфорилираних и нефосфорилираних протеина унутар Raf-1/MAPK/ERK сигналне трансдукције, задржавајући већи потенцијал у односу на **Ral**. Резултати су били у корелацији са антипролиферативном активношћу једињења против MCF-7 ћелија и њиховим утицајем на ћелијски циклус (видети даљу дискусију). Са друге стране, преостала једињења показала су сличну или чак и нижу биолошку активност од **Ral** током инхибиције Raf-1/MAPK/ERK сигналне трансдукције, након чега су одбачени као неактивни у даљим разматрањима (видети даљу дискусију).

Утицај испитиваних антагониста ERα 3DQ-1a до 3DQ-1e на геномски директни и геномски индиректни пут унутар MCF-7 ћелија

Даља пажња посвећена је утврђивању утицаја испитиваних једињења на активацију hERE или AP-1 промотера унутар геномског директног или индиректног пута у MCF-7 ћелијама, респективно (Слика 3.13). У том смислу, есеји базирани на активности луциферазе спроведени су на хуманим MCF-7 ћелијама које су најпре трансфектиране било ERE-TK-LUC или AP-1-LUC плазмидима, који су садржали

Резултати и дискусија

репортер ген луциферазе под ER α - односно AP-1-зависним промотерима, а затим ко-трансфектиране плазмидом β -галактозидазе.



Слика 3.13. (А) Антагонизам геномског директног пута развоја карцинома дојке са кумаринским антагонистима ER α **3DQ-1a** до **3DQ-1e** у окружењу MCF-7 ћелија које су трансфектоване ERE-TK-LUC плазмидом који садржи луциферазни репортер ген унутар хуманог елемента естрогенског одговора (*hERE*) и ко-трансфектоване плазмидом β -галактозидазе. MCF-7 ћелије третиране су концентрацијама од 0,1 и 1 nM за сва једињења, осим за **3DQ-3a**, **3DQ-1d** и **3DQ-2d** (1 и 10 nM). * $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; † $p < 0,05$ у поређењу са **E₂**; ‡ $p < 0,05$ у поређењу са **4-OHT + E₂**; § $p < 0,05$ у поређењу са **Ral + E₂**; (Б) Антагонизам геномског индиректног пута развоја карцинома дојке кумаринским антагонистима ER α **3DQ-1a** до **3DQ-1e** у окружењу MCF-7 ћелија које су трансфектоване AP-1-LUC плазмидом који садржи луциферазни репортер ген унутар AP-1 елемента одговора и ко-трансфектоване плазмидом β -галактозидазе. Форбол 12-миристанат 13-ацетат (енг. phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) коришћен је као индуктор AP-1. За сва једињења, осим за **3DQ-3a**, **3DQ-1d**, и **3DQ-2d**, MCF-7 ћелије су третиране концентрацијама од 0,1 и 1 nM, за обележена једињења концентрације су биле 1 и 10 nM. * $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; † $p < 0,05$ у поређењу са **PMA**; ‡ $p < 0,05$ у поређењу са **4-OHT + PMA**; § $p < 0,05$ у поређењу са **Ral + PMA**.

Тако, администрација **3DQ-4a** у нижој и вишој примењеној концентрацији утицала је да луцифераза испољи активност од само 4 и 3 релативне јединице након интеракције са ERE-TK-LUC плазмидом, што је била активност 4,20 и 5,33 пута мања од оне када је додат **Ral**, односно активност од само 4 и 2 релативне јединице у присуству AP-1-LUC плазида, што је било 3,83 и 3,74 пута мање него након администрације **Ral** (Слике 3.13А и 3.13Б), откривајући снажну тенденцију једињења да поништи **E₂**-зависну транскрипцију гена. Промотери *hERE* и AP-1 такође су успешно регулисани након администрације једињења **3DQ-2a** (5 и 3 релативне јединице активности луциферазе у окружењу ERE-TK-LUC, активност 4,20 и 5,33 пута мања у односу на ону након администрације **Ral**; 4 и 2 релативне јединице активности луциферазне у окружењу AP-1-LUC плазида, 5,75 и 7,50 пута мање у односу на ону

Докторска дисертација Незрине Куртановић

након администрације **Ral** (Слике 3.13А и 3.13Б) и **3DQ-1a** (5 и 3 релативне јединице активности луциферазе у окружењу ERE-TK-LUC плазида, активност 4,20 и 5,33 пута мања у односу на ону након администрације **Ral**; 6 и 4 релативне јединице активности луциферазе у AP-1-LUC окружењу плазида, активност 3,83 и 3,75 пута мања у односу на ону након администрације **Ral**) (Слике 3.13А и 3.13Б). С друге стране, једињења **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-2b** и даље су контролисала активност луциферазе у присуству оба плазида на разумном нивоу (5 до 9 и 5 до 7 релативних јединица активности луциферазе у окружењу ERE-TK-LUC плазида, активност 2,33 до 3,50 и 2,29 до 3,20 пута мања у односу на ону након администрације **Ral**; 13 до 19 и 9 до 14 релативних јединица активности луциферазе у окружењу AP-1-LUC плазида, активност 1,21 до 1,77 и 1,07 до 1,50 пута мања у односу на ону након администрације **Ral** (Слике 3.13А и 3.13Б). Сумирајући резултате, може се закључити да је након додавања ERE-TK-LUC или AP-1-LUC плазида, инхибирање активности луциферазе од стране једињења **3DQ-4a**, **3DQ-2a**, **3DQ-1a**, **3DQ-1b**, **3DQ-2b** или **3DQ-3b** потвђено, те да су једињења блокирала транскрипцију гена засновану на геномском директном и геномском индиректном путу.

Ефекти синтетисаних једињења 3DQ-1a до 3DQ-1e на цитотоксичност и ћелијски циклус MCF-7 ћелијских линија

До сада разматрани резултати антипролиферативне активности на MCF-7 ћелијске линије и са њима повезане вредности које указују на инхибицију Raf-1/MAPK/ERK сигналне трансдукције и блокаду транскрипције било на геномском директном или индиректном путу, указали су да је постоји потреба за даљу анализу ћелијског циклуса током апоптозе MCF-7 ћелија након администрације тестираних једињења (Табела 3.10, Слика 3.14, Додатни материјал II: Слика ДМ308-ДМ318). Анализе су извршене након администрације једињења у истим концентрацијама као код испитивања утицаја на ћелијску сигнализацију и на спречавање одвијања транскрипције гена директним и индиректним путем. Уопштено говорећи, након 24-часовног третмана, удео MCF-7 ћелија чији је раст заустављен у G₀/G₁ фази се повећао, док се удео ћелија чији је раст блокиран у S фази смањено, што је указало на то да су једињења махом активирала апоптозу у G₀/G₁ фази. Резултати су били у корелацији са претходним налазима да једињења са SERM фармакологијом блокирају напредовање ћелијског циклуса MCF-7 у G₀/G₁ фази [336].

Резултати и дискусија

Дакле, третман MCF-7 ћелијских линија испитиваним антипролиферативним агенсима зауставио је ћелијски циклус између G₀ фазе (тј. фазе недељења, односно пост митозе) и фазе G₁ (тј. репликације DNA), без обзира на примењену концентрацију, што је било компатибилно са претходно извршеном анализом регулације експресије гена. Администрација деривата кумарина и сличних једињења изроковала је блокаду раста MCF-7 ћелија у иреверзибилном (сенесцентном, односно процесу старења ћелије у коме је дељење престало али ћелија не умире, те диференцираном) стању G₀.

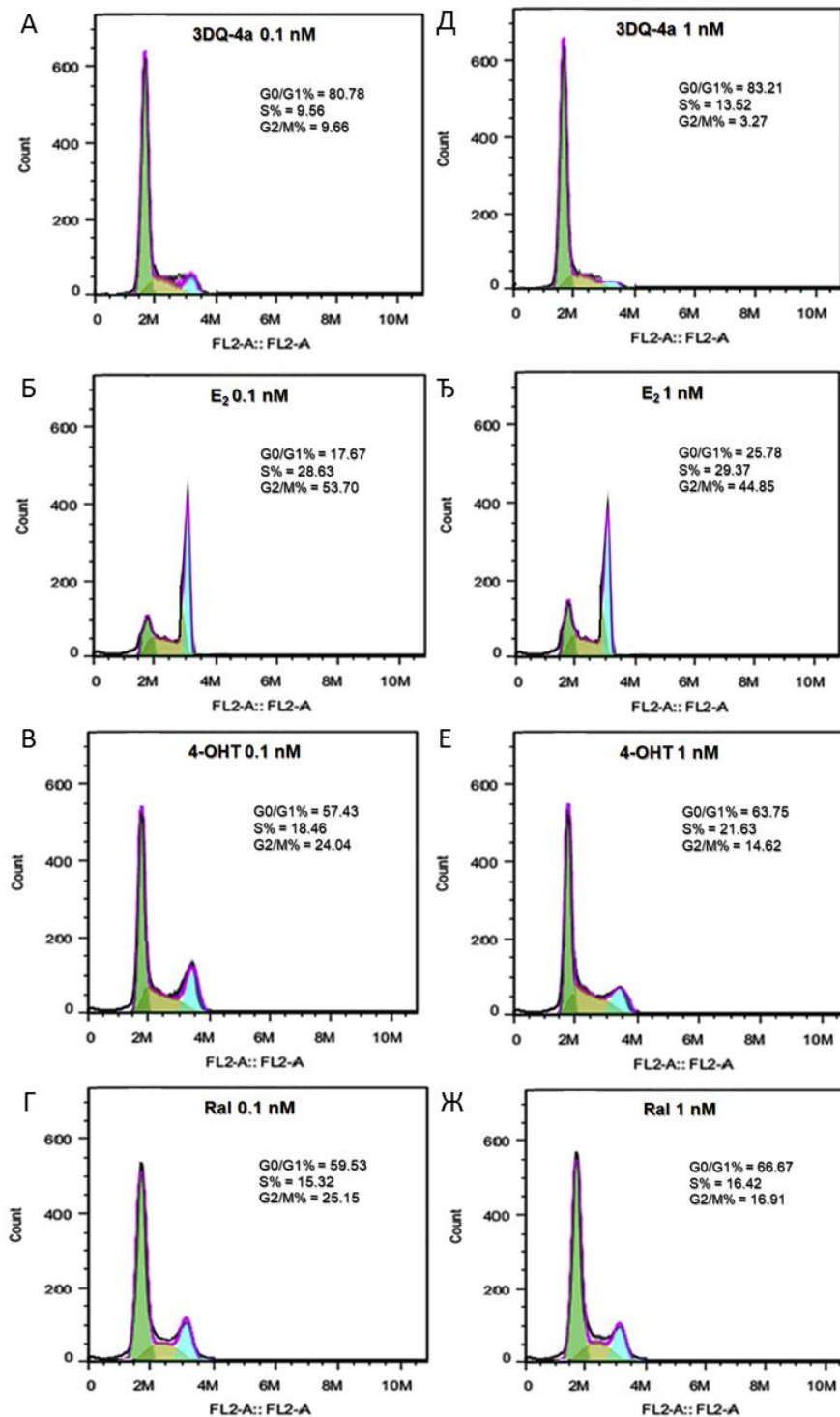
Табела 3.10. Ефекти синтетисаних једињења на ћелијски циклус MCF-7 ћелија.

Јед. Фаза	Ћелијски циклус (%)					
	G ₀ /G ₁ ^{а,б}		S ^в		G ₂ /M ^{г,д}	
Конц. (nM)	0,1 ^б (1 ^е)	1 (10)	0,1 (1)	1 (10)	0,1 (1)	1 (10)
3DQ-1a	76,93±0,41 ^{ж*,†}	77,32±0,74 ^{*,†}	12,34±0,42 ^{*,†}	17,44±0,53 ^{*,†,‡}	10,73±0,53 [†]	5,24±0,54 ^{*,†}
3DQ-2a	80,93±0,45 ^{*,†}	76,92±0,32 ^{*,†}	10,24±0,57 ^{*,†}	18,34±0,57 ^{*,†,‡}	8,83±0,47 ^{*,†,‡,§}	14,74±0,56 ^{*,†,§}
3DQ-3a^е	51,99±0,16 ^{*,†}	57,35±0,63 ^{г,*,†}	11,34±0,36 ^{г,*,†}	17,35±0,24 ^{г,*,†,‡}	36,67±0,94 ^{г,†,‡,§}	25,30±0,32 ^{г,*,†,‡,§}
3DQ-4a	80,78±0,56 ^{*,†}	83,21±0,16 ^{*,†}	9,56±0,36 ^{*,†,‡}	13,52±0,42 ^{*,†,‡}	9,66±0,46 ^{*,†}	3,27±0,36 ^{*,†}
3DQ-1b	71,90±0,36 ^{*,†}	76,66±0,74 ^{*,†}	6,42±0,68 ^{*,†}	8,64±0,63 ^{*,†,‡}	21,68±0,26 ^{†,‡,§}	14,70±0,35 ^{*,†}
3DQ-2b	72,93±0,46 ^{*,†}	72,95±0,33 ^{*,†}	14,86±0,35 ^{*,†}	16,57±0,52 ^{*,†,‡}	12,21±0,63 ^{*,†}	10,48±0,35 ^{*,†,§}
3DQ-3b	71,45±0,36 ^{*,†}	77,21±0,53 ^{*,†}	15,33±0,63 ^{*,†}	18,74±0,47 ^{*,†,‡}	13,22±0,36 ^{*,†}	4,05±0,53 ^{*,†}
3DQ-1c	51,96±0,16 ^{*,†}	52,86±0,53 ^{*,†}	14,32±0,36 ^{*,†}	15,43±0,25 ^{*,†,‡}	33,72±0,26 ^{†,‡,§}	31,71±0,46 ^{†,‡,§}
3DQ-2c	51,83±0,28 ^{*,†}	56,63±0,27 ^{*,†}	15,67±0,26 ^{*,†}	17,46±0,74 ^{*,†,‡}	32,50±0,57 ^{†,‡,§}	25,91±0,35 ^{*,†,‡,§}
3DQ-1d^е	47,83±0,41 ^{г,†}	44,65±0,57 ^{г,†}	19,32±0,18 ^{г,*}	22,53±0,35 ^{г,*,§}	32,85±0,36 ^{г,†,‡,§}	32,82±0,18 ^{г,†,‡,§}
3DQ-2d^е	39,87±0,46 ^{г,†}	44,78±0,42 ^{г,†}	19,45±0,68 ^{г,*}	23,73±0,22 ^{г,*,§}	40,68±0,46 ^{г,*,†,‡,§}	31,49±0,25 ^{г,†,‡,§}
3DQ-1e	55,65±0,44 ^{*,†}	57,61±0,63 ^{*,†}	17,35±0,35 ^{*,†}	19,52±0,63 ^{*,†}	27,00±0,25 ^{*,†}	22,87±0,46 ^{*,†,‡,§}
E₂^з	17,67±0,57 ^{*,†,‡,§}	25,78±0,35 ^{†,‡,§}	28,63±0,35 ^{†,‡,§}	29,37±0,46 [§]	53,70±0,57 ^{*,†,‡,§}	44,85±0,16 ^{*,†,‡,§}
4-ОТН.^и	57,47±0,63 ^{*,†}	63,75±0,74 ^{*,†}	18,46±0,33 ^{*,†}	21,63±0,25 ^{*,§}	24,07±0,53 ^{*,†}	14,62±0,15 ^{*,†}
Ral.^ј	59,53±0,83 ^{*,†}	66,67±0,36 ^{*,†}	15,32±0,74 ^{*,†}	16,42±0,46 ^{*,†}	25,15±0,35 ^{*,†}	16,91±0,46 ^{*,†}
Контрола^к	32,54±0,45 ^{†,‡,§}		34,75±0,53 ^{†,‡,§}		32,71±0,45 ^{†,‡,§}	

^аСтања мировања ћелије: G₀ - ћелија је напустила циклус и престала да се дели; ^бЋелијска интерфаза (тј. синтеза): G₁ - повећање величине ћелија (припрема за биосинтезу DNA); ^вЋелијска интерфаза (тј. синтеза): S - репликација DNA; ^гЋелијска интерфаза (тј. синтеза): G₂ - период између биосинтезе DNA и митозе, ћелија наставља да расте; ^дСтања подела ћелија: M - раст ћелија престаје, долази до поделе; ^жКонцентрација једињења у nM администрирана на MCF-7 ћелијским линијама; ^еКонцентрација **3DQ-3a**, **3DQ-1d** и **3DQ-2d** у nM администрирана на MCF-7 ћелијским линијама; ^жРезултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација. ^з17β-естрадиол; ^и**4-хидрокситамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen**, **4-ОТН**); ^ј**Ралоксифен** (енг. **Raloxifene**, **Ral**); ^к0,9% NaCl. *p < 0,05 у поређењу са контролном групом; †p < 0,05 у поређењу са E₂; ‡p < 0,05 у поређењу са **4-ОТН**; §p < 0,05 у поређењу са **Ral**.

Једињења **3DQ-4a** (Слика 3.14) и **3DQ-2a** (Додатни материјал II: Слика ДМ308) узроковала су заустављање ћелијског раста у G₀/G₁ фази у више од 80% случајева, без обзира на примењену концентрацију. С друге стране, **3DQ-1a**, **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b** (Додатни материјал II: Сlike ДМ309, ДМ310, ДМ311 и ДМ312, респективно)

блокирали су циклус MCF-7 ћелија у почетној фази између 71 и 77%, где је забележен највећи потенцијал заустављања ћелијског циклуса за једињење **3DQ-1a** (~77% у просеку, Додатни материјал II: Слика ДМ309).



Слика 3.14. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-4a** у концентрацији од 0,1 nM (A); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (B); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-4a** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (E); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Резултати и дискусија

Индукција апоптозе и заустављање ћелијског циклуса може бити кључни механизам којим су испитивани антипролиферативни агенси инхибирали пролиферацију MCF-7 ћелија. Ипак, застој у развоју у G₀/G₁ фази био је очекиван ако би се корелирао са изразитом моћи испитиваних једињења да изазову антипролиферацију, њиховом способношћу да смање интензитет сигналне трансдукције на нивоу Raf-1/MAPK/ERK пута, те да спрече транскрипцију која доводи до биосинтезе рака дојке било директним или индиректним геномским путем. Захваљујући испољеној фармакологији, неколико једињења, **3DQ-4a**, **3DQ-2a**, **3DQ-1a**, **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b** даље је подвргнуто *in vivo* скринингу.

In vivo скрининг једињења 3DQ-1a до 3DQ-1e против рака дојке

Будући да су најактивнија једињења брендирана као *in vitro* антипролиферативни агенси, финални корак евалуације био је дефинисање њиховог утицаја на туморогенезу млечних жлезда (Табела 3.11). Том кораку претходила је процена апликабилности једињења у смислу оралне абсорпције, дефинисањем оптималне растворљивости (Табела 3.11), након чега је извршена администрација једињења *per os* у две дозе, 5 и 50 mg/kg телесне тежине пацова (енг. body weight, bwt), респективно, на одраслим женкама Wistar пацова код којих је претходно пре-индукован рак дојке помоћу интраперитонеалног (енг. intraperitoneal, *i.p.*) третмана метил нитросоуреом (енг. methyl nitrosourea MNU, 50 mg/kg bwt). Утицај администрираних једињења на раст туморских ћелија праћен је кроз латентни период (тј. време протекло од тренутка излагања пацова MNU до откривања канцера дојке), оптерећење тумора (тј. број ћелија карцинома) и запремину тумора.

Већина активних једињења показала је протективне ефекте у односу на туморигенезу млечних жлезда. Тако су **3DQ-4a** и **3DQ-2a** пролонгирани латенцију тумора за 11 недеља након дозирања од 5 mg/kg bwt и 15-16 недеља након администрације 50 mg/kg bwt, одржавајући ниско оптерећење тумором и малу запремину истог, показујући се бољим супресорима рака дојке **Ral**. Нешто нижа антиканцерогена активност *in vivo* забележена је код **3DQ-1a**, док су **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b** одржавале латентност тумора између 10 и 13 недеља, што се може упоредити са активношћу **Ral**. Безбедност једињења током примене потврђена је каталитичким активностима ензима јетре и редокс статусом (Додатни материјал II: Табеле ДМ1 и ДМ2), где није откривен неповољан фармаколошки профил.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Након оралне администрације на пацовима, једињења **3DQ-4a**, **3DQ-2a**, **3DQ-1a**, **3DQ-1b**, **3DQ-2b** и **3DQ-3b** показали су добар фармакокинетички профил (Табела 3.11), бољи у односу на **5AK2** или **SS5020** [75], као и оптималну тенденцију за везивање за протеине плазме. Релативно ниски клиренси *in vivo* указали су на незнатно нарушавање функције хепатоцита, што је корелирало са резултатима ниске каталитичке активности ензима јетре и ензима редокс система након администрације водећих једињења. Са малим *in vivo* клиренсом, примећена је добра орална изложеност за сва једињења, заједно са разумним нивоима у плазми и добром биорасположивошћу.

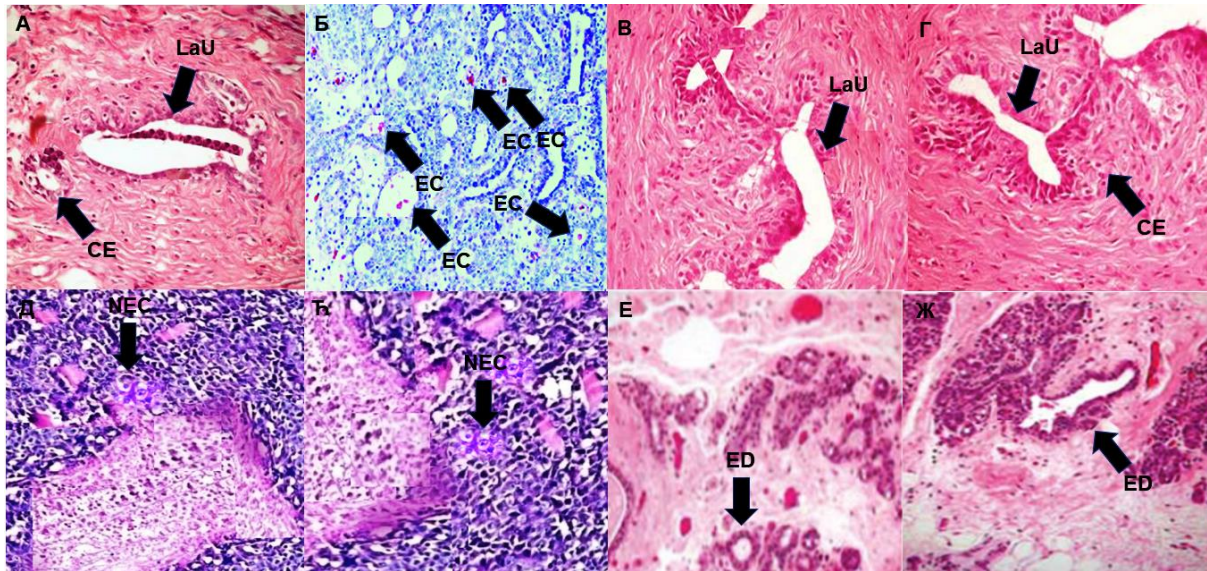
Табела 3.11. Ефекти синтетисаних једињења на туморигенези млечних жлезда и фармакокинетичке студије.

Јед.	Доза (mg/kg)	log D _{7,4} ^a	Латенција ^b тумора (недеља)	Оптерећење ^b тумором (недеља)	Запремина ^г тумора (mm ³)	РВР ^д (%)	CL ^ђ <i>in vivo</i>	БИО ^е
3DQ-1a	5	1,66	10 ^{*,†}	2,41±0,17 ^{е,*,†,‡,§, ж}	0,78±0,12 ^{*,†,‡,}	0,93	40	86
	50		13 ^{*,†}	1,96±0,36 ^{*,†,§,}	0,61±0,34 ^{*,†,§,}	1,12	49	90
3DQ-2a	5	1,42	11 ^{*,†,‡,}	2,04±0,06 ^{*,†,‡,}	0,46±0,17 ^{*,†,‡,}	1,05	39	94
	50		15 ^{*,†,§}	1,87±0,32 ^{*,†,§,}	0,41±0,34 ^{*,†,§,}	1,14	44	96
3DQ-4a	5	2,14	11 ^{*,†,‡,}	1,92±0,42 ^{*,†,‡,}	0,45±0,06 ^{*,†,‡,}	0,94	36	91
	50		16 ^{*,†,§}	0,94±0,42 ^{†,§,}	0,21±0,09 ^{*,†,§,}	0,97	41	96
3DQ-1b	5	1,86	10 ^{*,†}	2,47±0,23 ^{*,†,‡,}	0,80±0,32 ^{*,†,‡,}	1,12	54	88
	50		12 ^{*,†}	2,26±0,52 ^{*,†,‡,}	0,74±0,35 ^{*,†,§,}	1,42	61	91
3DQ-2b	5	1,75	9 ^{*,†}	2,33±0,53 ^{*,†,‡,}	0,83±0,31 ^{*,†,‡,}	1,28	57	90
	50		12 ^{*,†}	2,17±0,22 ^{*,†,‡,}	0,61±0,36 ^{*,†,§,}	1,54	60	97
3DQ-3b	5	1,78	10 ^{*,†}	2,28±0,71 ^{*,†,‡,}	0,92±0,35 ^{*,†,‡,}	1,17	63	91
	50		13 ^{*,†}	2,28±0,71 ^{*,†,§,}	0,92±0,5 ^{*,†,§,}	1,24	64	94
4-ОТН ^з	5	3,62	7 [*]	3,33±0,46 [†]	1,86±0,11 [†]	1,84	36	87
	50		10 [*]	3,26±0,43 ^{†,§}	1,34±0,35 [†]	2,51	41	94
Ral ^и	5	2,37	8 [*]	3,09±0,46 [†]	1,66±0,32 [†]	1,84	36	93
	50		13 [*]	2,87±0,34 [†]	1,42±0,35 [†]	1,91	41	96
MNU ^ј	50	НД ^п	5 [§]	4,51±0,17 ^{†,§, ,⊥}	4,47±0,36 ^{†,§, ,⊥}	НД	НД	НД
K ^к		НД	0 ^{†,‡,§, ,⊥}	0 ^{†,‡,§, ,⊥}	0 ^{†,‡,§, ,⊥}	НД	НД	НД

^aПросечна липофилност добијена из концентрационог опсега 5, 10, 20, 30, 40 и 50 mg/kg bwt добијена методом мешања ерленмајера (енг. shake-flask methodology); ^bВреме протекло од тренутка излагања пацова **MNU** до откривања канцера дојке); ^вБрој ћелија карцинома; ^гЗапремина узорка; ^дВезивање за протеине плазме (енг. plasma protein binding, РРВ) на 37°C; ^ђУнутрашњи клиренс (енг. Intrinsic clearance) *in vivo*; ^еБиорасположивост једињења; ^жРезултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација; ^з**4-хидрокситамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen**, **4-ОТН**); ^и**Ралоксифен** (енг. **Raloxifene**, **Ral**); ^јМетил нитрозоуреа (енг. methyl nitrosourea, **MNU**); ^к0.9% NaCl; ^пНије доступно. * p < 0,05 када се пореди са негативном контролом; † p < 0,05 када се пореди са **MNU** у концентрацији од 50 mg/kg bwt; ‡ p < 0,05 када се пореди са **4-ОТН** у концентрацији од 5 mg/kg bwt; § p < 0,05 када се пореди са **4-ОТН** у концентрацији од 50 mg/kg bwt; || p < 0,05 када се пореди са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg bwt; ⊥ p < 0,05 када се пореди са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg bwt.

Резултати и дискусија

На крају, безбедност једињења након администрације потврђена је анализирањем фотомикрографа канцера дојке индукованог од стране **MNU** (Слика 3.15 и Додатни материјал II: Сlike ДМ319-ДМ323).



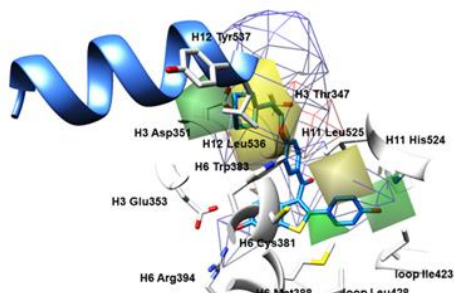
Слика 3.15. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-4a** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-4a** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОHT** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОHT** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.

Тако су фотомикрографи једињења третираних само са физиолошким раствором показали нормалне секције дојке које су садржале лобулоалвеоларну јединицу (енг. lobuloalveolar unit, LaU) и кубоидне епителијарне ћелије (енг. cuboidal epithelial cells, CE) (Слика 3.15А). Са друге стране, администрација **MNU** проузроковала је озбиљан дуктални карцином млечне жлезде праћен масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (енг. neoplastic epithelial cells (EC) (Слика 3.15Б). У поређењу са

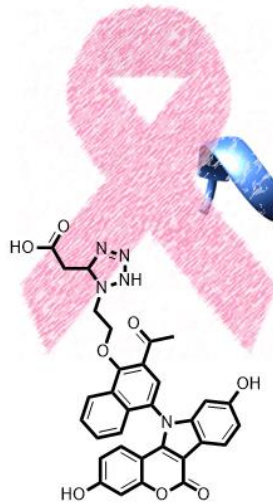
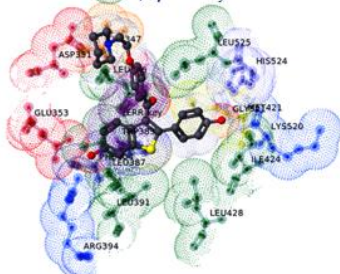
Докторска дисертација Незрине Куртановић

негативном контролом, губитак нормалне архитектуре млечне жлезде у присуству **MNU** узрокован је постојањем терминалне дуктуларно-лобуларне јединице која је формирала дискретне кластере са морфологијом у облику канала. Администрација тестираних једињења у обе концентрације није довела до додатних оштећења и сва су једињења у потпуности неутралисала морфолошке промене изазване са **MNU**, обзиром на чињеницу да је у свим узорцима констатовано постојање само лобулоалвеоларних јединица и кубоидних епителијарних ћелија (овде је су приказани фотомикрографи након администрације **3DQ-4a** (Слике 3.15В и 3.15Г, док су за остала једињења репрезентативни фотомикрографи представљени као Додатном материјал II: Слике ДМ319-ДМ323). Шта више, испитивана једињења била су знатно безбеднија за примену од **4-ОНТ**, чија је администрација довела до озбиљне некрозе (енг. necrosis, NEC) (Слике 3.15Д и 3.15Ђ). Са друге стране, **Ral** је показао високу ефикасност као антиканцерогени агенс против канцера дојке у обе примењене концентрације (Слике 3.15Е и 3.15Ж) јер је редуковао густину епителијума дојке и узроковао појаву мање диференцираних екстралобуларних канала (енг. extralobular ducts, ED).

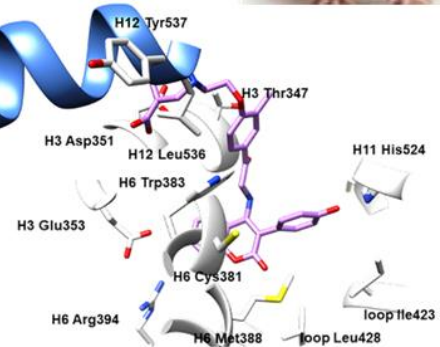
Резултати и дискусија



Оптимизовани и робусни 3-D
QSAR и COMBINER
модели упарени са SB и LB
протоколима поравнања.
примењиви у дизајну нових
SERMs против ERα
и канцера дојке



Синтеза нових SERMs
CBE-1 до
CBE-6



CBE-4

in vitro:

$IC_{50} ER\alpha = 110 \text{ pM};$

$IC_{50} MCF-7 = 170 \text{ pM}$

in vivo:

Латенција тумора = 11 - 16 недеља

Оптерећење тумора = 0,94 - 1,92 недеља

Запремина тумора = 0,21 - 0,45 mm^3

Дизајн иновативних антагониста естроген рецептора α базиран на Ру-СоMFA и Ру-СоmBinE 3-D QSAR студијама, синтеза новодизајнираних једињења и антиканцерогена активност против рака дојке *in vitro* и *in vivo*

Резултати и дискусија

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Генерисање Ру-СоМФА 3-D-QSAR модела и њихова интерпретација

Слично протоколу примењеном за генерисање 3-D QSAR модела помоћу алгоритама имплементираних у 3-D QSAutogrid/R алату, TR је коришћен за генерисање SB Ру-СоМФА модела користећи различите пробне атоме (Додатни материјал III: Табела ДМ2). Ру-СоМФА модели генерисани су помоћу портала www.3d-qsar.com, односно Ру-СоМФА апликације, којим се једноставно могу испоштовати класични кораци СоМФА методологије, све до финалне оптимизације и валидације робусних модела. Протокол се састоји од пажљивог бирања и поравнања молекула из тренинг сета и тест сета, израчунавања MIF, статистичке анализе, интерпретације резултата и графичке анализе. Једном када се ови кораци испуне, модел може бити коришћен за предвиђање активности нетестираних једињења или дизајн нових хемијских ентитета било SB или LB приступима.

Ипак, статистички задовољавајући Ру-СоМФА SB 3-D QSAR модели нису генерисани коришћењем свих молекула унутар TR, већ само користећи једињења са SERM и SERD фармакологијом (Табеле 2.1 и 2.2, укупно 16 једињења) која су „формирала” TR_{SERM/SERD}. Са друге стране, парцијални агонисти (енг. partial agonists, PA) „формирали” су *in situ* тест сет, TS_{PA} (покушаји да се генеришу Ру-СоМФА SB 3-D QSAR само помоћу парцијалних агониста нису резултовали статистички значајним моделима и поменути резултати нису приказани). Овакав резултат указао је на две ствари: (1) Ру-СоМФА методологија сензитивна је на једињења са SERM и SERD фармакологијом те се може применити у будућем дизајну ових једињења; (2) потребно је унапредити дата сет лиганада ER α новим кристалима који су публиковани након 2015/2016 године и спровести нове Ру-СоМФА SB 3-D QSAR студије у циљу генерисања статистички значајних модела са диверзитетом једињења унутар TR.

Да би се генерисали 3-D QSAR модели, Ру-СоМФА web апликација генерише за сваку пробу три модела са различитим комбинацијама MIF: само електростатичке интеракције (енг. electrostatic, ELE), само стерне интеракције (енг. steric, STE), те комбинација ELE и STE (енг. BOTH). За сваку пробу најпре су генерисани сирови модели помоћу основних подешавања, без систематских варијација у растојању између тачака просторне решетке (Додатни материјал III: Табела ДМ3). Затим је за сваку од проба генерисано 100 модела применом насумичне VPO анализе (Додатни материјал III: Табеле ДМ4-ДМ9), варијацијом свих параметара пред-третмана: растојања између

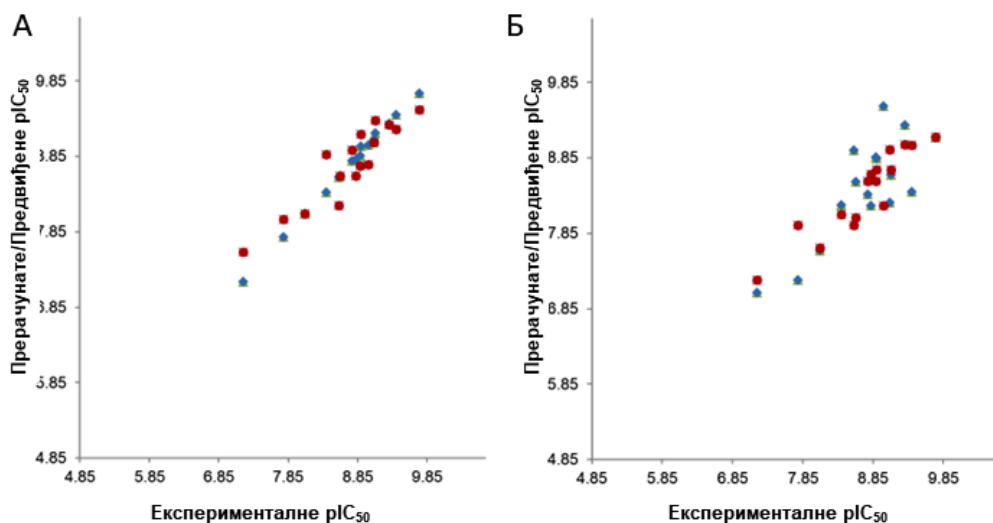
Резултати и дискусија

тачака просторне решетке (енг. grid spacing), простора додатог од краја просторне решетке не би ли се обухватиле све интеракције око лиганда (енг. grid extension), диелектричне констане (енг. dielectric constant), максималних и минималних вредности CutOff, те стандардне девијације (енг. minimum sigma). Финални 3-D QSAR модели (Табела 3.12, Сlike 3.16-3.18, Додатни материјал III: Сlike ДМ1-ДМ3), добијени су SA оптимизацијом.

Табела 3.12. Статистички параметри и коефицијенти генерисаних Ру-СоMFA модела добијених након оптимизације вредности варијабли применом методе симулираног хлађења.

Проба	OP ^a	EP ^b	r^{2b}	q^{2d}	r^{2h}	q^{2e}	Мин. δ^k	ϵ^3	CutOff ^m
			BOTH (PC ^r)	BOTH (PC)	BOTH (PC)	BOTH (PC)			
			LOO	LOO	LSO	LSO			
C.3	3,5	7	0,980 (7)	0,827 (4)	0,842 (7)	0,462 (7)	0,7	3,5	7
N.3	3,2	10	0,950 (4)	0,693 (4)	0,795 (4)	0,226 (4)	0,6	10	8
H	3,4	4	0,955 (6)	0,930 (6)	0,862 (6)	0,324 (6)	0,9	6	24

^aОптимално растојање између тачака просторне решетке. ^bЕкстензија просторне решетке. ^rКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем. ^dОптималан број главних компоненти/латентних варијабли. ^eКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем. ^hКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-some-out (LSO) приступа и Y-мешањем. ^eКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out (LSO) приступа и Y-мешањем. ^kОптимална вредности стандардне девијације (енг. minimum sigma). ³Оптимална вредност диелектричне констане (енг. dielectric constant). ^mОптималне вредности максималних и минималних CutOff.



Слика 3.16. Експерименталне наспрам прерачунатих (плави квадрати) и предвиђених (црвени кругови) pIC₅₀ вредности добијене након унакрсне валидације LOO приступом за модел генерисан из Н пробе на PC5 (А); LSO приступом за модел генерисан из Н пробе на PC5 (Б).

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Током процеса, робусност статистички најбољег модела (Додатни материјал III: Табеле ДМ10-ДМ11) интерно је валидирана применом LOO и LSO CV (Слика 3.16) односно помоћу Y-S.

Редефинисање разумевања интеракција унутар LBD на основу 3-D QSAR Py-CoMFA мапа

Сходно доброј пракси установљеној приликом анализе 3-D QSAR модела проистеклих из 3-D QSAutogrid/R методологије, интерпретација Py-CoMFA модела вршена је на нивоу R1, R2, и R3 унутар LBD.

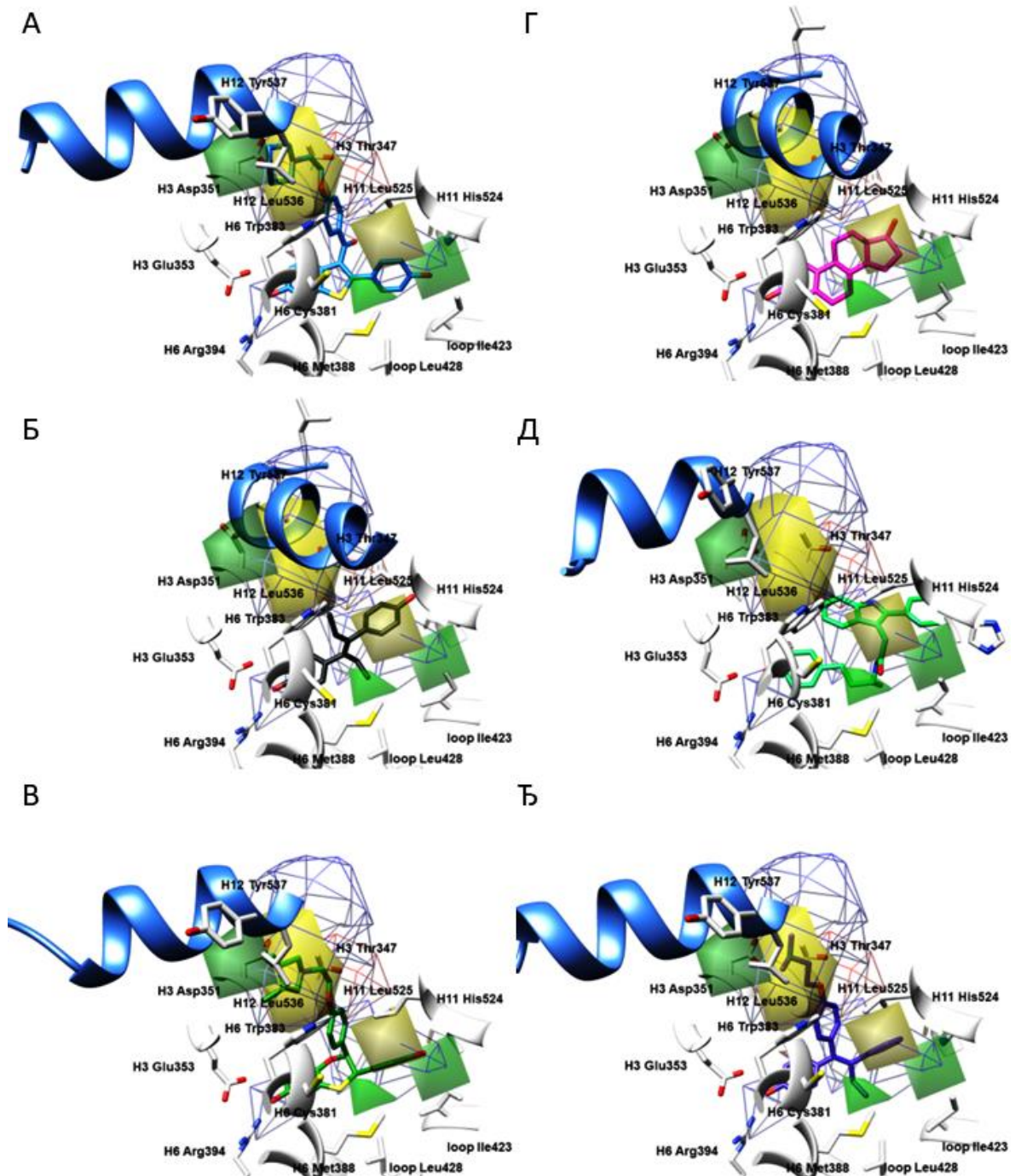
ERa LBD R1: Формирање водоничних веза и електростатичких интеракција

Интеракција **1. Ph-OH** свих једињења из тренинг сета, осим **1R5K** (Табела 2.1, Додатни материјал III: Слика ДМ2Д) са Н3 Glu353 и Н6 Arg394 била је окарактерисана **ПЛАВИМ**_{ААС} мапама које су потврдиле потребу са за формирањем HBs са акцентованим аминокиселима. Као што је претходно било антиципирано мапама проистеклим из 3-D QSAutogrid/R 3-D QSAR модела, модел генерисан из Н пробе са великом прецизношћу интерпретирао је тенденцију **Ral (1ERR)** односно **3ERD** да награде HB са Н3 Glu353 и Н6 Arg394 (Табела 2.1, Сlike 3.17А и 3.17Б), позиционирањем **ПЛАВИХ**_{ААС} мапа у односу на карбонилну групу бочног ланца Н3 Glu353, односно гуанидо функцију Н6 Arg394. Ипак, на овом нивоу, Py-CoMFA модел није извршио дискриминацију између парцијалних агониста и антагониста, обзиром да су идентичне мапе описале и HB формиране од стране **1ERE** (Табела 2.1 и Слика 3.17Д), како са циљаним аминокиселинама тако и са молекулом воде заробљеним у LBD након ко-кристализације. Дислоцирање **1. Ph-OH** у односу на Н3 Glu353 унутар **2IOK** (Табела 2.1 и Слика 3.17Д) и **2IOG** комплекса (Табела 2.1 и Слика 3.18В) и одсуство HBs, односно потреба да се исте формирају, наглашени су незнатним преклапањем **ПЛАВИХ**_{ААС} мапа са **1. Ph-OH** нотираних једињења. Модел је такође указао да би активност **1R5K** била повећана имплементацијом **1. Ph-OH** (Табела 2.1, Додатни материјал III: Слика ДМ2Д).

ERa LBD R2: Формирање водоничних веза и електростатичких интеракција.

Једињења која су остварила интеракције са R2, **1ERR**, **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **2R6Y**, **1XP9**, **1XPC**, **2R6W**, **1X7R**, **2QA8**, **2QA6**, **1X7E**, и **1GWQ** (Табеле 2.1 и 2.2), успоставила су интеракције са Н11 His524 преко **2. Ph-OH**.

Резултати и дискусија



Слика 3.17. Мапе стерних (позитивни зелени *STE PLS-коэффициенти* x средња вредност MIF, негативни жути *PLS-коэффициенти* x средња вредност MIF) и електростатичких (позитивни црвени *ELE PLS-коэффициенти* x средња вредност MIF, негативни плави *ELE PLS-коэффициенти* x средња вредност MIF) поља стварних доприноса (*AAC*) активности лиганда (L_{ACC}) добијени из модела Н пробе за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **21OK** (Д); **2BJ4** (Ѓ). Зелени и жути полихедрони указују на регионе где повећана и смањена волуминозност могу повећати активност. Црвени и плави полихедрони указују на регионе где наелектрисане функционалне групе могу повећати или смањити активност, респективно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Обзиром на чињеницу да су **ПЛАВЕ**_{AAC} мапе окарактерисале интеракцију **2. Ph-OH** са Н11 His524, отклоњене су све сумње да ли је потребно увести донора водоничне везе према Н11 His524 (Слике 3.17А и 3.17В, Додатни материјал III: Слике ДМ1А, ДМ1Б, ДМ1В, ДМ1Г, ДМ1Д, ДМ2А, ДМ2Б, Слика 3.18В, Додатни материјал III: Слике ДМ2В, ДМ3А и ДМ3Д, Слика 3.18Ђ, респективно).

ПЛАВЕ_{AAC} контуре такође су биле сензитивне на интеракцију 17β-OH групе D-прстена **1ERE** са Н11 His524 као аналога **2. Ph-OH**, чиме је потврђено да су Ру-СоМФА мапе дугог домета (Табле 2.1, Слика 3.17Г). Модел се надаље показао осетљивим и на присуство Y537S мутације услед које је дошло до одсуства НВ између 17β-OH групом **2B1Z** и Н11 His524 (Табела 2.2, Додатни материјал III: Слика ДМ3В), те разматрана 17β-OH група није била прекривена **ПЛАВИМ**_{AAC} контурама. Модел такође није описао ни интеракције **2. Ph-OH** из **1GWQ** (Табела 2.1, Слика 3.18Ђ), као последицу неповољног поравнања једињења услед недостатка функционалних група које окупирају R3, али је препознао фармакофорни потенцијал **2QA6** (Табела 2.2, Додатни материјал III: Слика ДМ3А).

Са друге стране, **ПЛАВИ**_{AAC} изоплети недвосмислено су указали да би супституција халогена унутар *m*-F супституисаног ароматичног прстена **5AK2** (Табела 2.2, Слика 3.18Б) са *p*-OH или *m*-OH/*m*-NH₂ резултовала формирањем НВ са Н11 His524 и повећању биоактивности једињења, обзиром да је C7-OH група **5AK2** остварила потребне интеракције са Н3 Glu353 и Н6 Arg394. Насупрот томе, недостатак **2. Ph-OH** фармакофорног мотива у структурама **1XQC** и **1UOM** (Табеле 1 и 2, Додатни материјал III: Слика ДМ3Б, Слика 3.18Д) зарад интеракција са Н11 His524, утицао је на смањење биоактивности ових једињења на вредности испод 8 pIC₅₀ јединица, на шта су указале и **ПЛАВЕ**_{AAC} мапе. Модел је надаље извршио дискриминацију између парцијалних агониста и антагониста јер **ПЛАВЕ**_{AAC} контуре нису препознале допринос **2. Ph-OH** из генистеина (**1X7R**, Табела 2.1, Слика 3.18Г; **2QA8**, Табела 2.2, Додатни материјал I: Слика ДМ2В).

ERα LBD R2: Хидрофобне интеракције

Врло слични резултати онима добијеним генерисањем 3-D QSAutogrid/R методологије, добијени су и након интерпретације стерних поља Ру-СоМФА модела позиционираних унутар R2. Тако, фрагменти 2-фенил-1-бензотиофена из 2-(4-хидроксифенил)бензо[*b*]тиофен-6-олског језгра једињења **1ERR**, **2R6Y** и **2R6W**, а

Резултати и дискусија

посебно атом сумпора унутар 2,3-дихидротиофена, остварили су, на основу позиционирања **ЗЕЛЕНИХ**_{ААС}, бенефитне стерне интеракције са Н6 Met388 и Н6 Leu391 (Табела 2.1, Слика 3.17А, Додатни материјал III: Сlike ДМ1В и ДМ2Б, респективно). Мутације Н6 С381S и Н6-С417S-Н7 унутар **2R6Y** и **2R6W** комплекса, нису имале велики утицај на активност лигананда ко-кристализованих у одговарајућим комплексима. Надаље, **2. Ph-OH** остатак унутар 2-(4-хидроксифенил)бензо[*b*]тиофен-6-олског језгра вршио је позитиван стерни притисак на Н6-Phe424-Phe425-Leu428-Н7. Са друге стране, интеракција 4-[(3S)-1,4-оксатин-3-ил]фенолне функционалне групе из **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **1XP9** и **1XPC** (Табела 2.1) са Н6 Met388 интерпретирана на основу поравнања **ЗЕЛЕНИХ**_{ААС}, још једном је потврдила да **1. Ph-OH** и **2. Ph-OH** фармакофорна особина морају бити међусобно повезане **С5(6)-хетероциклом** (Слика 3.19В, Додатни материјал III: Сlike ДМ1А, ДМ1Б, ДМ1Г и ДМ2А, респективно). Својеврсна потврда оваквих разматрања добијена је након анализе интеракција кумаринског језгра **5AK2** са Н6 Met388 (Слика 3.18Б).

Разматране Ру-СоMFA мапе интерпретирале су и биоизостерну замену атома сумпора (**1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **1XP9** и **1XPC**) са метиленском функционалном групом (**1YIM** и **1YIN**, Табела 2.1, Додатни материјал III: Сlike ДМ1Д и ДМ1Ђ), која је довела до незнатног смањења активности, нарочито у случају када је метиленски фрагмент додатно супституисан метил групом, при чему су мапе указале да би додатно повећање стерног притиска са биоизостерном променом од S ка CH₃-CH-функционалној групи у односу на Н6 Met388 било бенефитно по активност, што је било у супротности са сазнањима проистеклим из 3-D QSAutogrid/R модела. Сличан закључак могао се извести и након анализе ААС мапа позиционираних око **3ERD** (Табела 2.1, Слика 3.17Б) и **1L2I** (Табела 2.2, Слика 3.18А), односно парцијалних агониста. Тако, допринос једне од *trans*-етил група **3ERD** (Слика 3.17Б) са афинитетом према стерним интеракцијама са Н3 Ala350 и Н6 Leu384, Н6-Phe404-Н7 и Н6-Leu428-Н7, односно Н6 С381S и Н6-С417S-Н7, био је назначен **ЗЕЛЕНИМ**_{ААС} указујући да би повећање волуминозности повећало биопотенцијал, чиме би се можда и фармакологија једињења конвертовала у антагонистичку. Што се тиче **1L2I**, пројекције **ЗЕЛЕНИХ**_{ААС} (Слика 3.18А) суптилно су указале на стерни ефекат етил групе у односу на терминалну метил групу Н6 Met388 и бочни ланац аминокиселине Phe424 из структуре насумице увијања између хеликса Н6 и Н7, што није забележено код **1ERE**.

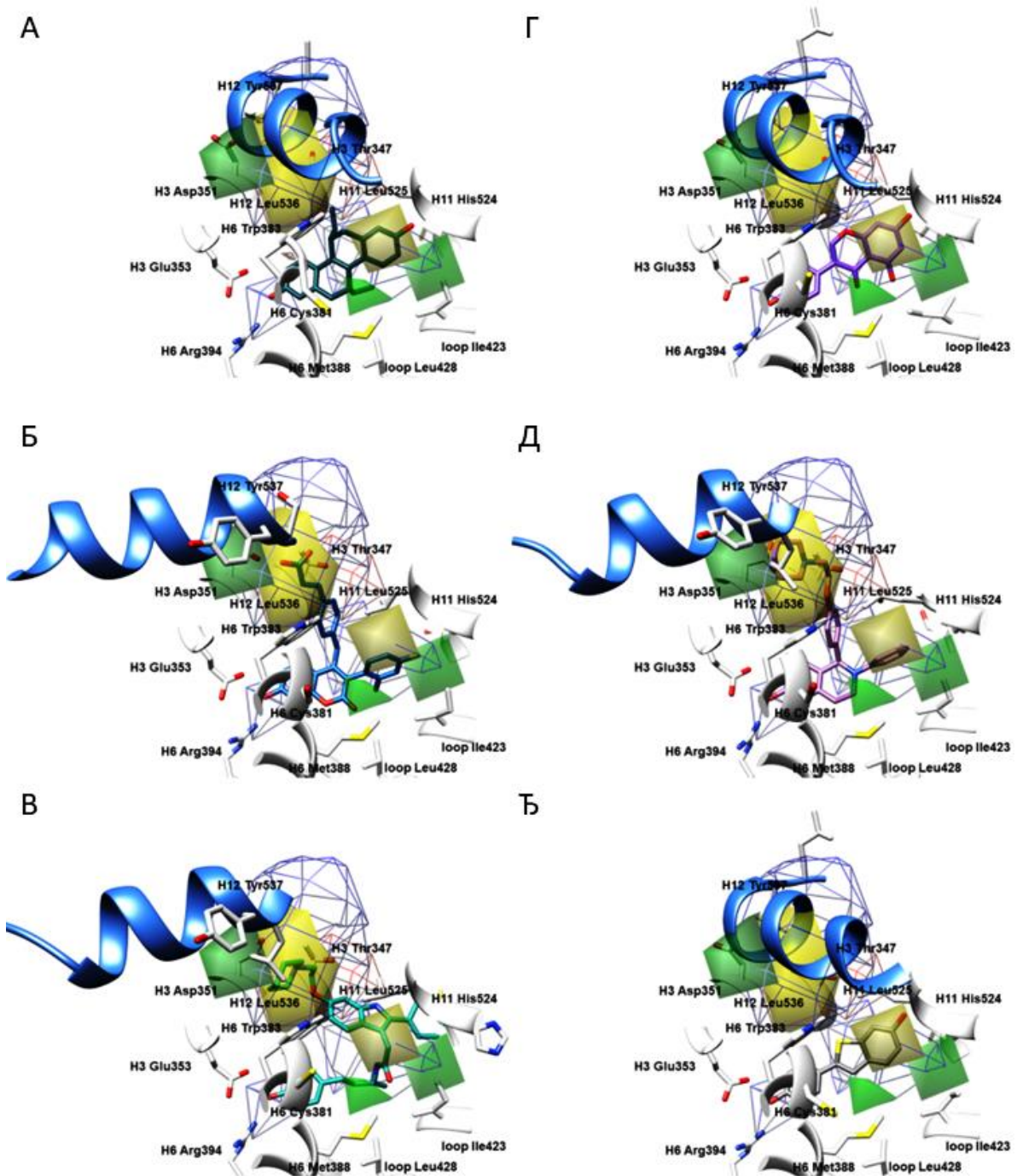
Докторска дисертација Незрине Куртановић

Доњи део региона R3 унутар лиганд-везивног домена ER α : Хидрофобне интеракције

Слично 3-D QSAutogrid/R 3-D QSAR моделу, Ру-СоМФА модел из Н пробе успео је да разлучи детерминанте неопходне за разликовање потпуних антагониста од парцијалних антагониста. Тако, **Ph** фармакофорни мотив, позициониран у средини LBD и инкорпоринан у фрагменте C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала (**1ERR**, **2R6Y** и **2R6W**, Табеле 2.1 и 2.2, Слика 3.17А, Додатни материјал III: Сlike ДМ1В и ДМ2Б, респективно), Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала (**1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **1XP9**, **1YIM**, **1YIN** и **1XPC**, Табеле 2.1 и 2.2, Слика 3.17В, Додатни материјал III: Сlike ДМ1А, ДМ1Б, ДМ1Г, ДМ1Д, ДМ1Ђ и ДМ2А, респективно), Ph-O-(CH₂)₂-N⁺R₁R₂ (**2BJ4**, Табела 2.1, Слика 3.17Ђ) или Ph-O-*trans*-CH=CH-COOH (**5AK2**, Табела 2.2, Слика 3.18Б), био је окружен пројекцијама **ЗЕЛЕНИХ**_{ААС} са Н12 Leu536 стране, описујући позитиван стерни допринос на ову аминокиселину, али је такође био окарактерисан и потпуним одсуством Ру-СоМФА мапа у односу на Н6 Trp383, што се може сматрати првим великим недостатком модела.

Ипак, **ЗЕЛЕНИ**_{ААС} потврдили су важност интеракције **Ph** са метил групом бочног ланца Н3 Thr347, која је условила је да се поменута аминокиселина подвргне индукованом прилагођавању према Н11 Leu25 и Н12 Leu536 и формирању Н3 Thr347-Н11 Leu525-Н12 Leu536 хидрофобне мреже неопходне за дислокацију Н12. Међутим, позиционирање **ЖУТИХ**_{ААС} између **Ph** и Leu525 парадоксално је указало да индиректан стерни допринос **Ph** на формирање Н3 Thr347-Н11 Leu525-Н12 Leu536 хидрофобне мреже мора бити смањен на нивоу формирања додатне Н3 Ala350-**Ph**-Н11 Leu525 мреже, што се може сматрати другим великим недостатком модела. Било како било, **ЗЕЛЕНИ**_{ААС} препознали су Н3 Thr347 као „окидачки механизам“ за индуковано прилагођавање Н12 након засићења рецептора са једињењима са SERM и SERD фармакологијом, што је било у складу са претходно интерпретираним моделом. Са друге стране, немогућност индуковања формирања Н3 Thr347-Н11 Leu525-Н12 Leu536 хидрофобне мреже од стране парцијалних агониста (**3ERD**, **1ERE**, Табеле 2.1 и 2.2) последица је недовољног позитивног стерног потенцијала етил групе **3ERD** или 18 α -СН₃ групе **1ERE** да стабилизује метил групу бочног ланца Н3 Thr347; супституција поменуте етил групе **3ERD** волуминознијим ароматичним остатком као код **2BJ4** (Табела 2.1, Слика 3.17Ђ), довела је до SERM фармакологије. Потпуно одсуство стерних интеракција са Н3 Thr347, као код **1X7R** и **2QA8** (Слика 3.18Г и Додатни материјал III: Слика ДМ2В), такође води ка парцијалном агонизму.

Резултати и дискусија



Слика 3.18. Мапе стерних (позитивни зелени STE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF, негативни жути *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF) и електростатичких (позитивни црвени ELE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF, негативни плави ELE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF) поља стварних доприноса (*AAC*) активности лиганда (L_{ACC}) добијени из модела Н пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Зелени и жути полихедрони указују на регионе где повећана и смањена волуминозност могу повећати активност. Црвени и плави полихедрони указују на регионе где наелектрисане функционалне групе могу повећати или смањити активност, респективно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс је представљен плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Доњи део региона R3 унутар лиганд-везивног домена ERα: Водоничне везе и електростатичке интеракције

Постојање ПЛАВИХ_{ААС} мапа указале су на то да би карбонилна функционална унутар C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикла једињења **1ERR**, **2R6W** и **2R6Y** у (Табеле 2.1 и 2.2, Слика 3.17А, Додатни материјал III: Сlike ДМ1В и ДМ2Б, респективно) као НВА требала бити биоизостерно супституисана са НВД не би ли постала додатни реакциони центар за грађење НВ са Н11 His524 и Н3 Thr347. Овакав резултат Ру-СоМФА анализе био је унапређење у односу на 3-D QSAR модел проистекао из 3-D QSAutogrid/R методологије, који је указао на електростатичке интеракције разматраног НВА са Н11 His524 и Н3 Thr347.

Додатно, етаноламински мост, инкорпориран у C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикле, Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикле, или сличне структурне обрасце, виђене унутар **1ERR**, **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **2R6Y**, **1XP9**, **1YIM**, **1YIN**, **1XPC** и **2R6W**, био је прекривен ПЛАВИМ_{ААС} мапама (Табеле 2.1 и 2.2, Сlike 3.17А и 3.17В, Додатни материјал III: Сlike ДМ1А, ДМ1Б, ДМ1В, ДМ1Г, ДМ1Д, ДМ1Ђ, ДМ2А и ДМ2Б, респективно), чиме је потврђено да се атом кисеоника (**Оxy**) етаноламинског моста понаша као НВА у односу на -ОН групу бочног ланца Н3 Thr347, што је такође било унапређење у односу на 3-D QSAR модел проистекао из 3-D QSAutogrid/R методологије, који је указао на електростатичке интеракције разматраног НВА са Н3 Thr347.

Горњи део региона R3 унутар лиганд-везивног домена ERα: Хидрофобне интеракције

Даља анализа Ру-СоМФА модела проистеклог из Н пробе била је усмерена ка финалној дискриминацији између SERMs и SERDs, односно ка анализи доприноса *N*-хетероцикала унутар C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала и Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала, као што су прстен пиперазина код **1ERR**, **1SJ0**, **1YIN**, **2R6W** и **1UOM** (Слика 3.17А, Додатни материјал III: Сlike ДМ1Б, ДМ1Ђ и ДМ2Б, Слика 3.18Д, респективно), прстен (3*R*,4*R*)-3,4-диметилпиролидина у структури **1XP1** (Слика 3.17В), прстен (3*S*,4*S*)-3,4-диметилпиролидин код **1XP6** (Додатни материјал III: Слика ДМ1А), прстен пиролидина виђен код једињења **2R6Y**, **1XP9**, **1YIM** и **1XPC** (Додатни материјал III: Слика ДМ1В, ДМ1Г, ДМ1Д и ДМ2А), прстен 2-фенил-1*H*-индола унутар **2IOK** и **2IOG** (Сlike 3.17Д и 3.18В), односно октахидро-1*H*-пиридо[1,2-а]пирозин као структурна карактеристика **1XQC** (Додатни материјал III: Слика ДМ3Б).

Резултати и дискусија

Стерни притисак који су вршили атоми атоми угљеника пипреазина (**1ERR**), (3*R*,4*R*)-3,4-диметилпиролидина (**1XP1**) и (3*S*,4*S*)-3,4-диметилпиролидин (**1XP6**), окарактерисан је позитивним **ЗЕЛЕНИМ**_{ААС} мапама чиме је указано да је потребно повећати волуминозност хетероцикала носилаца НВD према Н12 и LLEML, те да би повећање интензитета van der Waals-ових интеракција могло да доведе до лакшег индукованог прилагођавања Н12 антагонисту и последичног формирања НВ са Н3 Asp351. У исто време **ЖУТЕ**_{ААС} мапе указале су на потребу за смањењем волуминозности хетероцикала према Н3 Asp351. Овакав антагонизам стерних мапа Ру-СоМFA С.3 модела био је у сагласности са резултатима 3-D QSAutogrid/R 3-D QSAR студија.

Надаље, позиционирање **ЗЕЛЕНИХ**_{ААС} изоконтуре указало је да би метил супституенти у структури пиролидина, код **1XP1** и **1XP6** (Табела 2.1, Слика 3.17В и Додатни материјал III: Слика ДМ1А), **2R6W** (Табела 2, Додатни материјал III: Слика ДМ2Б), требали бити још волуминознији зарад стерних судара са Н12 Leu536 и Н12 Tyr537 и у сврху повећања биоактивности, што је било у супротности са резултатима 3-D QSAutogrid/R 3-D QSAR студија. С друге стране, позиционирање метил групе унутар етаноламинског моста у циљу формирања хиралног (*S*)-метил деривата, као у структури **1XP9**, или (*R*)-енантиомера као код **1XPC**, окарактерисано је као стерно неповољно, сходно позиционирању **ЖУТИХ**_{ААС} полиедара (Додатни материјал III: Сликe ДМ1Г и ДМ2А, респективно).

Горњи део региона R3 унутар лиганд-везивног домена ERα: Водоничне везе и електростатичке интеракције

Фармаколошки потенцијал SERM једињења, са позитивно наелектрисаним атомом азота унутар фрагмената C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала, Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала (Табеле 2.1 и 2.2) односно диметиламиноетанола (**2BJ4**, Табела 2.1), у виду грађења водоничних веза са Н3 Asp351 и последичне дислокације Н12, окарактерисан је паром **ПЛАВИХ**_{ААС} и **ЦРВЕНИХ**_{ААС} изоконтуре (Слика 3.17Ђ) које су окруживале терцијарни амин, чиме је потврђено да би биоизостерна супституција НВD са **НВА/НДВ** била бенефитна по SERM фармакологију и активност.

Међутим, форму **НВА/НДВ** као фармакофорне особине поседује и карбоксилна група (**5AK2**, **1R5K**), која као субституент фенилакрилне киселине након интеракције са Н3 Asp351 води до испољавања SERD фармакологије, већ описаном

Докторска дисертација Незрине Куртановић

дестабилизацијом ER α након дислокације H12. Модел, сходно позиционирању пара ПЛАВИХ_{AAS} и ЦРВЕНИХ_{AAS} изоконтуре, није у потпуности извршио дискриминацију између SERMs и SERDs али је указао на важност обају **НВА** и **НДВ** фармакофорних особина, односно **НВХ**, те да би таква фармакофора требала бити присутна у будућем дизајну, слично разматрањима проистеклим из анализе резултатима 3-D QSAutogrid/R 3-D QSAR студија.

Генерисање Py-ComBinE 3-D-QSAR модела и њихова интерпретација

Употребом Py-ComBinE апликације доступне на 3d-qsar.com порталу, TR је коришћен за генерисање робусних и предиктивних модела упоредне анализе молекуларних везивних енергија (енг. comparative molecular binding energy analysis, COMBINE) као правих SB 3-D QSAR модела. Овде ваља напоменути да статистички задовољавајући Py-ComBinE SB 3-D QSAR модели такође нису генерисани коришћењем свих молекула унутар TR, већ овога пута само користећи једињења са SERM фармакологијом (укупно 14 једињења) која су чинила TR_{SERM}. Овакав резултат указао је на две ствари: (1) Py-ComBinE методологија сензитивна је на једињења са SERM фармакологијом те се може применити у будућем дизајну ових једињења; (2) потребно је унапредити дата сет лиганда ER α новим кристалима који су публиковани након 2015/2016 године и спровести нове Py-ComBinE SB 3-D QSAR студије у циљу генерисања статистички значајних модела са диверзитетом једињења унутар TR.

Како је могуће израчунати четири типа лиганд/протеин интеракција унутар Py-ComBinE апликације, са претходно припремљеним сетом парова лиганд/рецептор, разматрано је 15 комбинација лиганд/аминокиселина енергетских интеракција: STE, ELE, DRY, НВ, STE+ELE, STE+DRY, STE+НВ, ELE+DRY, ELE+НВ, DRY+НВ, STE+ELE+DRY, STE+ELE+НВ, STE+DRY+НВ, ELE+DRY+НВ и STE+ELE+DRY+НВ. Комбинације које су довеле до модела са највишим статистичким коефицијентима оптимизоване су помоћу SA алгоритма имплементираних у Py-ComBinE апликацију.

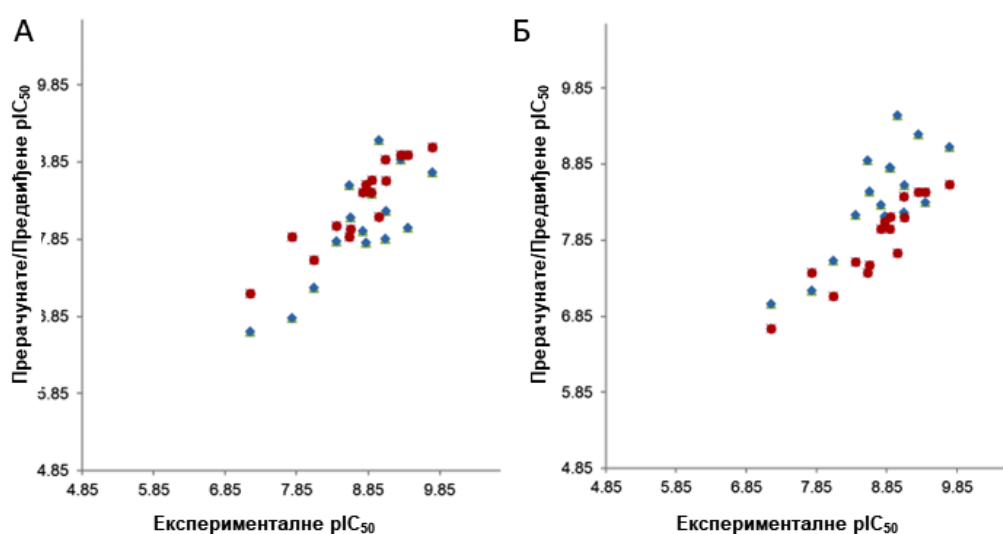
Модели оптимизовани након елиминације сувишних вредности енергија поља молекуларних интеракција SA алгоритмом квантификовани су оптималним високим вредностима статистички значајних коефицијената добијених комбинацијом различитих поља, при чему је највиша вредност коефицијента унакрсне корелације q^2 у вредности од 0,774 (Табела 3.13) забележена за STE.НВ комбинацију која је и коришћена за интерпретацију (Слике 3.18-3.22 и Додатни материјал III: Слике ДМ4-ДМ6).

Резултати и дискусија

Табела 3.13. Статистички параметри и коефицијенти генерисаних Ру-ComBinE модела добијених након оптимизације вредности варијабли применом методе симулираног хлађења.

Поља	PC ^a	r^2_{LOO} ^b	q^2_{LOO} ^B	r^2_{LSO} ^r	q^2_{LSO} ^д	$r^2_{YS LOO}$ ^ђ	$q^2_{YS LOO}$ ^е	$r^2_{LSO YS}$ ^ж	$q^2_{YS LSO}$ ^з
STE	5	0,956	0,553	0,894	0,452	0,261	-0,236	0,195	-0,326
ELE	2	0,319	-0,036	0,217	-0,059	0,165	-0,652	0,142	-0,251
DRY	3	0,783	0,376	0,635	0,268	0,262	-0,354	0,354	-0,632
HB	3	0,615	0,321	0,451	0,254	0,236	-0,362	0,418	-0,451
STE.ELE	4	0,940	0,278	0,812	0,126	0,128	-0,451	0,238	-0,252
STE.DRY	3	0,864	0,569	0,745	0,451	0,128	-0,285	0,154	-0,128
STE.HB	5	0,857	0,774	0,745	0,652	0,265	-0,452	0,259	-0,354
ELE.DRY	4	0,826	0,417	0,798	0,362	0,264	-0,451	0,418	-0,274
ELE.HB	5	0,907	0,234	0,854	0,126	0,149	-0,439	0,364	-0,169
DRY.HB	4	0,893	0,687	0,742	0,562	0,172	-0,365	0,284	-0,248
STE.ELE.DRY	4	0,889	0,475	0,795	0,387	0,326	-0,486	0,415	-0,298
STE.DRY.HB	5	0,962	0,657	0,842	0,354	0,128	-0,237	0,362	-0,274
STE.ELE.HB	4	0,944	0,482	0,850	0,333	0,127	-0,288	0,222	-0,234
ELE.DRY.HB	4	0,967	0,475	0,851	0,269	0,164	-0,475	0,239	-0,222
STE.ELE.DRY.HB	5	0,925	0,200	0,625	0,138	0,175	-0,428	0,128	-0,239

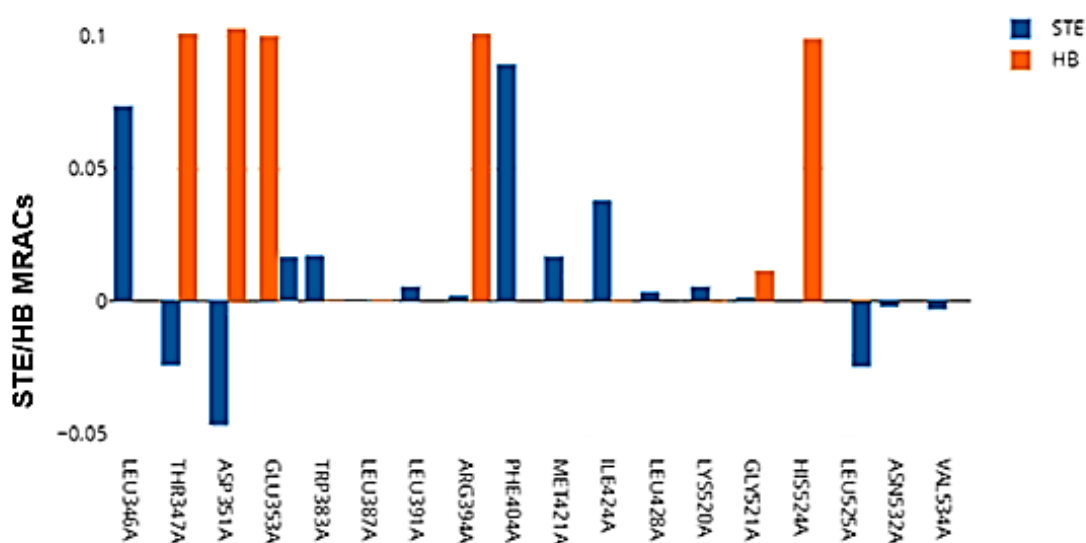
^aОптималан број главних компоненти/латентних варијабли. ^bКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-one-out методе. ^BКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out методе. ^rКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-some-out методе. ^дКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out методе. ^ђПросечна вредност конвенционалног квадратног коефицијента корелације добијена након leave-one-out приступа и Y-мешањем. ^еПросечни коефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out приступа и Y-мешањем. ^жПросечна вредност конвенционалног квадратног коефицијента корелације добијена након leave-some-out приступа и Y-мешањем. ^зПросечни коефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out приступа и Y-мешањем.



Слика 3.19. Експерименталне наспрам прерачунатих (плави квадрати) и предвиђених (црвени кругови) pIC_{50} вредности добијене након унакрсне валидације LOO приступом за модел генерисан из STE.HB поља на PC5 (А); LSO приступом за модел генерисан из STE.HB поља на PC5 (Б).

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Анализа Ру-ComBinE модела извршена је помоћу хистограма који су представљали позитиван и негативан допринос аминокиселина, односно графика молекул-аминокиселина доприноса активности (енг. molecule-residue activity contribution, MRAC), који представљају скаларни производ између вредности индивидуалних молекул-аминокиселина интеракција помножених са вредностима *PLS-кофицијената* (Слике 3.20). Ови графици корелирају молекуле TR са њиховим биолошким активности и помажу индивидуализацији аминокиселина које су више укључене у модулирање интеракције. Глобални значај интеракција може да се разуме слично горе разматраним 3-D QSAR моделима: позитивне вредности директно су корелиране са повољном интеракцијом; супротно томе, негативне вредности корелирају са смањеним биолошким афинитетима (Слика 3.20). Другим речима, позитивне вредности MRACs указују на аминокиселине које се налазе у непосредној близини молекула TR, док негативне вредности индицирају негативне доприносе кроз аминокиселине са којима је интеракција пенализована. Слично Ру-ComMFA анализи, Ру-ComBinE модели такође су визуелно испитани и помоћу графика просечног молекул-аминокиселина доприноса активности (енг. molecule-residue average activity contribution, MRAAC), добијених множењем просечних вредности интеракција молекул-аминокиселина (енг. average molecule-residues interactions, AMRIs) са вредностима *PLS-кофицијената* (COEFs), у сврху визуелне карактеризације аминокиселина рецептора које су највише биле укључене у модулирање биолошке активности (Слике 3.21 и 3.22).



Слика 3.20. Репрезентација позитивних и негативних доприноса аминокиселина (MRACs) унутар Ру-ComBinE модела проистеклог из комбинације STE.HB поља.

Резултати и дискусија

Рedefинисање разумевања интеракција унутар LBD на основу Py-ComBinE мапа

Сходно доброј пракси установљеној приликом анализе 3-D QSAR модела проистеклих из 3-D QSAutogrid/R и Py-CoMFA методологије, интерпретација Py-ComBinE модела вршена је на нивоу R1, R2, и R3 унутар LBD, али овога пута на нивоу индивидуалних аминокиселина и њихове директне интеракције са лигандима.

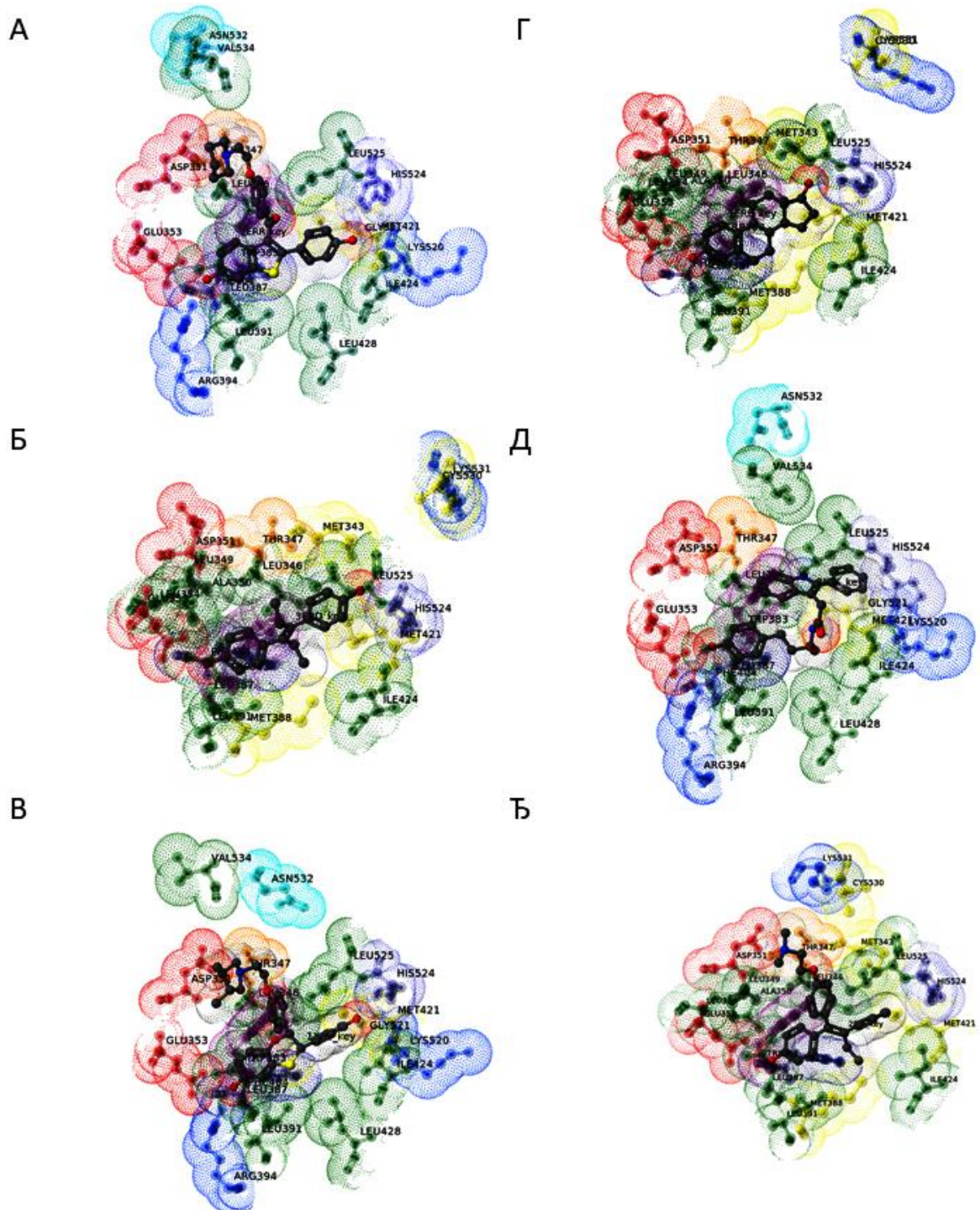
Структурни допринос H3 Glu353 и H6 Arg394 на активност модулатора ERα

Py-ComBinE STE.HB модел указао је на изузетну важност остваривања водоничних веза између лиганда ERα и аминокиселина H3 Glu353 (позитивна HB MRAC вредност од 0,11 pIC₅₀ јединица) и H6 Arg394 (позитивна HB MRACs вредност од 0,10 pIC₅₀ јединица) унутар R1 (Слике 3.20) унутар R1, наглашавајући да су управо водоничне везе које се формирају интеракцијом са нотираним аминокиселинама морају задржати у дизајну нових SERMs и SERDs (Слике 3.21-3.22). Резултати COMBINER студија били су у потпуности у сагласности са претходно анализираним 3-D QSAR моделима проистеклим из 3-D QSAutogrid/R и Py-CoMFA методологије. Са друге стране, ниже позитивне вредности стерних MRACs асоциране су са потребом да се **HBD** према H3 Glu353 (позитивна STE MRAC вредност од 0,012 pIC₅₀ јединица) и H6 Arg394 (позитивна STE MRACs вредност од 0,005 pIC₅₀ јединица) инкорпорира у виду **1. Ph-OH** (Слике 3.21-3.22), али да у исто време не треба да буде превише волуминозан, што је такође било у потпуној сагласности са претходно анализираним 3-D QSAR моделима проистеклим из 3-D QSAutogrid/R и Py-CoMFA методологије.

Структурни допринос H11 His524 на активност модулатора ERα

Изузетан утицај на активност једињења са SERM и SERD фармакологијом имала је и аминокиселина H11 His524, примарно асоцирана са позитивним вредностима MRAC (позитивне HB MRACs вредности од 0,09 pIC₅₀ јединица) (Слика 3.20) и MRAACs проистеклим из водоничних веза (Слике 3.21-3.22), чиме су решене све недоумице да ли је у структури лиганда потребно да постоји **HBD** који ће формирати HB са разматраном аминокиселином. Интересантно је да H11 His524 истовремено није асоцирана са вредностима стерних MRACs, чиме није специфицирано да ли **2. Ph-OH** треба да буде носач **HBD**, што се може сматрати недостатком модела, али не превеликим, обзиром да 3-D QSAutogrid/R и Py-CoMFA модели указују да имплицирају да HB треба да буде примарна интеракција којој

подлеже разматрана аминокиселина.



Слика 3.21. Репрезентација позитивних и негативних доприноса аминокиселина (MRAACs) унутар Ру-ComBinЕ модела проистеклог из комбинације STE.НВ поља за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **2IUK** (Д); **2BJ4** (Љ). STE и НВ MRAACs означени су обојеним транспарентним површинама преклопљеним преко структура аминокиселина.

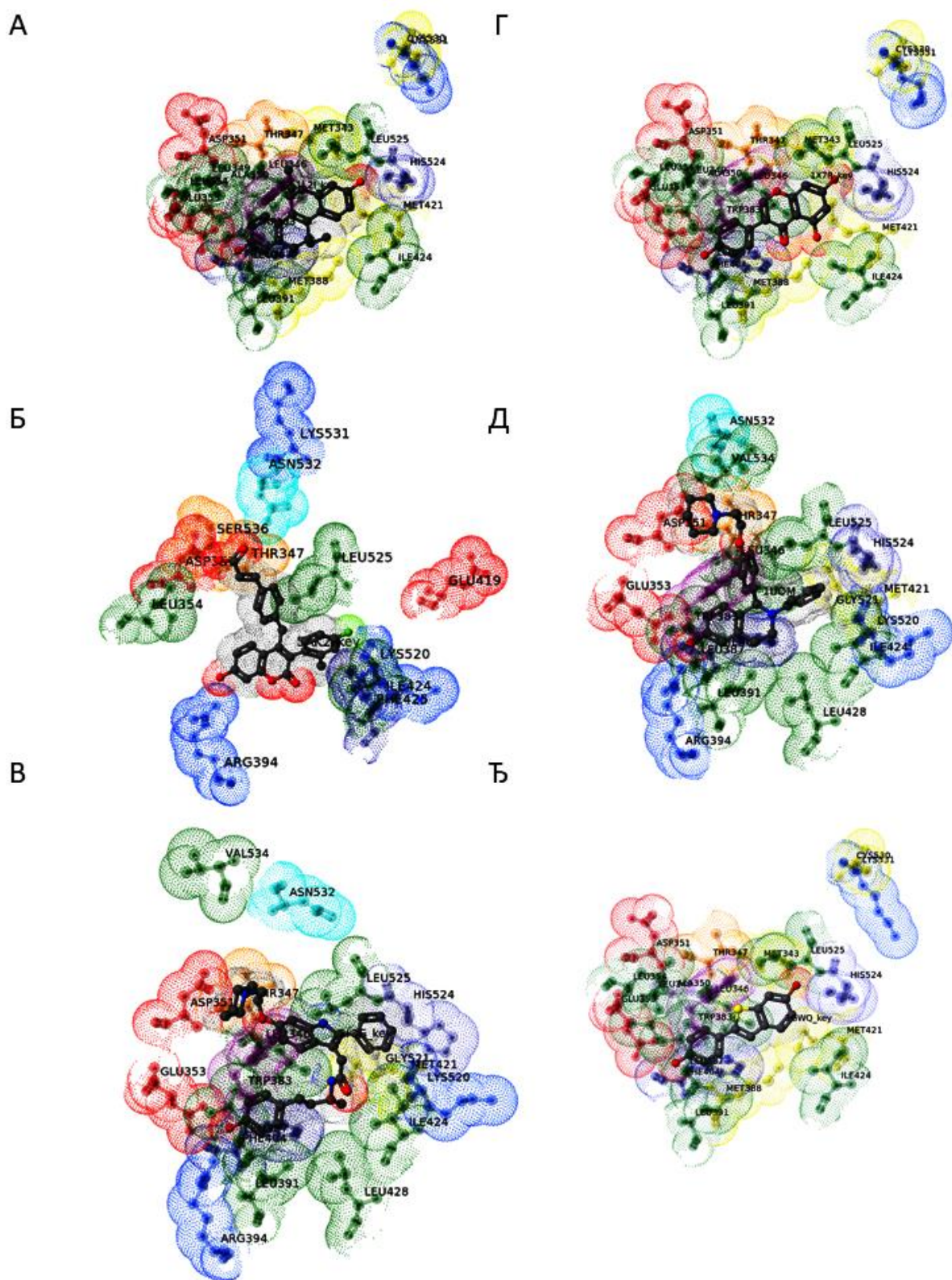
Резултати и дискусија

Структурни допринос H6 Leu391, Phe404-H7, H6 Met421, H6-Ile424-H7 и H6-Leu428-H7 на активност модулатора ER α

Py-ComBinE STE.HВ модел, очекивано, није описао стерни допринос свих аминокиселина из R2, али је нагласио значај H6 Leu391 (позитивне STE MRACs вредности од 0,005 pIC₅₀ јединица, Слика 3.20), H6 Met421 (позитивне STE MRACs вредности од 0,017 pIC₅₀ јединица, Слика 3.20), H6-Ile424-H7 (позитивне STE MRACs вредности од 0,04 pIC₅₀ јединице, Слика 3.20) и H6-Leu428-H7 (позитивне STE MRACs вредност од 0,003 pIC₅₀ јединице, Слика 3.20) током интеракције са **1. Ph-OH-C5(6)-хетероцикл-2. Ph-OH** конструкцијом лиганда (Слике 3.23-3.24). Такође, модел је указао и на изузетан допринос H6-Phe404-H7 (позитивне STE MRACs вредности од 0,09 pIC₅₀ јединица, Слика 3.22) и на значајан допринос H6-Leu428-H7 (позитивне MRACs вредности од 0,004 pIC₅₀ јединице, Слика 3.22) током интеракције са **C5(6)-хетероциклом** (Слике 3.21-3.22). Занимљиво је да Py-ComBinE STE.HВ модел није описао допринос H6 Met388 (Слике 3.20-3.22) која је нотирана као важна током анализе 3-D QSAR модела.

Структурни допринос H3 Leu346, H3 Thr347 и H3 Trp383 на активност модулатора ER α

Анализа Py-ComBinE STE.HВ модела на нивоу аминокиселина које формирају R3 и тиме имају директан утицај на фармакологију једињења са SERM и SERD фармакологијом, на експлицитан и недвосмислен начин потврдила је важност интеракција лиганда, прецизније њиховог **Ph** фармакофорног мотива са H3 Thr347, H3 Trp383 и H11 Leu525, односно са H3 Leu346 (позитивне STE MRACs вредности од 0,073 pIC₅₀ јединице, Слика 3.20), која је први пут нотирана COMBINER моделом као изузетно важна за интеракције са **Ph**. Наиме, асоцијација изразито позитивних стерних MRACs са H3 Leu346 (Слике 3.21-3.22) указала је на то да би стерни притисак **Ph** на аминокиселину приликом формирања H3 Thr347-H11 Leu525-H12 Leu536 хидрофобне мреже требало повећати (Слике 3.21-3.22). Са друге стране, стерни притисак **Ph** на H3 Thr347 (негативне STE MRACs вредности од -0,024 pIC₅₀ јединице, Слика 3.22), односно H11 Leu525 (негативне STE MRACs вредности од -0,020 pIC₅₀ јединица, Слика 3.22) приликом формирања H3 Thr347-H11 Leu525-H12 Leu536 хидрофобне мреже требало би смањити (Слике 3.21-3.22).



Слика 3.22. Репрезентација позитивних и негативних доприноса аминокиселина (MRAACs) унутар Ру-ComBinE модела проистеклог из комбинације STE.HB поља за 1L2I (А); 5AK2 (Б); 2IOG (В); 1X7R (Г); 1UOM (Д); 1GWQ (Ѕ). STE и HB MRAACs означени су обојеним транспарентним површинама преклопљеним преко структура аминокиселина.

Резултати и дискусија

На први поглед, овакав резултат био је у колизији са претходно описаним 3-D QSAR моделима, али је даља анализа изразито позитивних HB MRACs вредности од 0,07 pIC₅₀ јединица (Слика 3.20) асоцираних са H3 Thr347 указала да је назначена аминокиселина спремна да формира водоничне везе својом хидроксилном групом из бочног низа (Слике 3.21-3.22), те да структуру **Ph** треба унапредити супституцијом са неком функционалном групом која ће бити истовремено и акцептор водоничне везе (овде такође не треба занемарити ни утицај **Oxy** фармакофоре), али имати и капацитета да стерно ангажује изобутил групу бочног низа H3 Leu346.

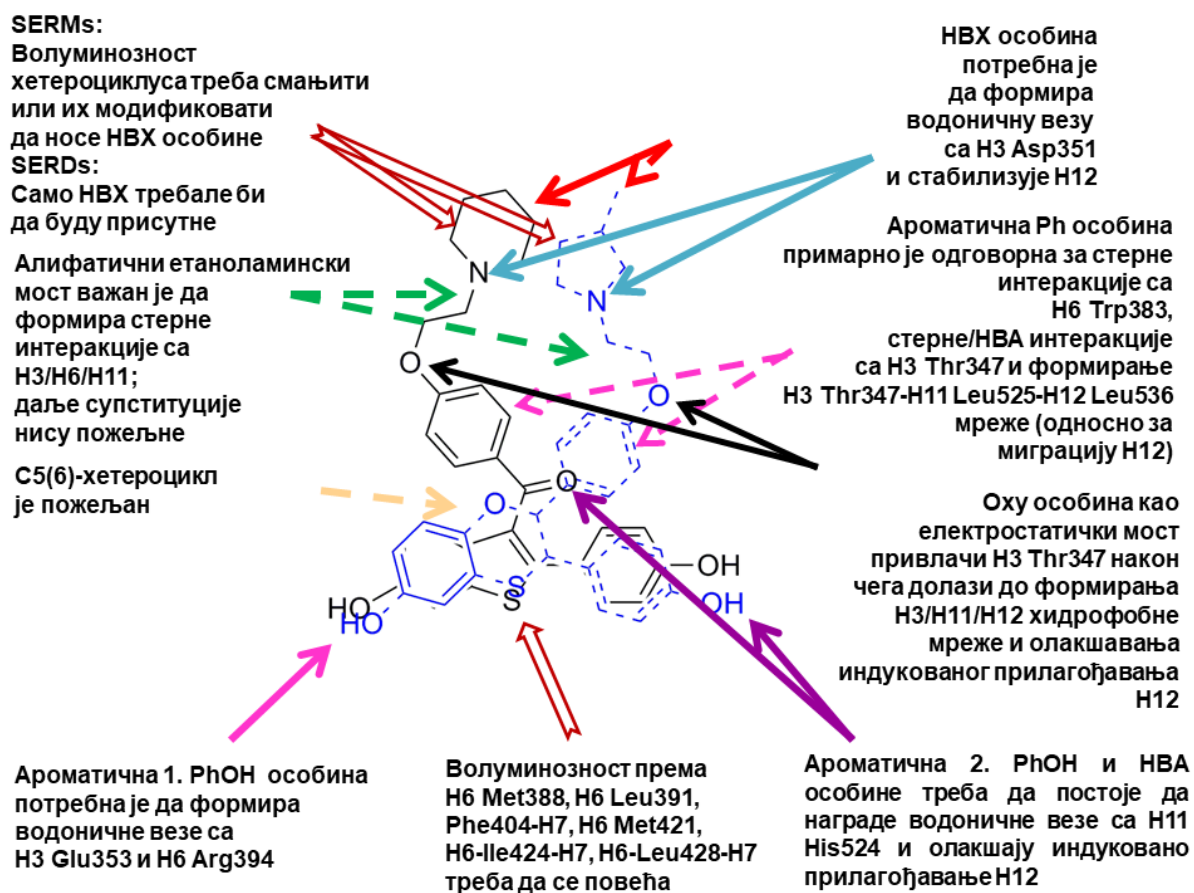
Са друге стране, индиректно наглашавана потреба путем 3-D QSAR модела проистеклих из 3-D QSAutogrid/R методологије да је потребно извршити додатни стерни притисак на H3 Trp383 у сврху повећања активности, потврђен је анализом позитивних вредности стерних MRAC са асоцираних са H3 Trp383 (позитивне MRACs вредности од 0,017 pIC₅₀ јединица, Слика 3.20). У том смислу, додатно повећање волуминозности на нивоу **Ph** са H3 Trp383 (Слике 3.21-3.22) стране LBD треба свакако да буде фокус у дизајну будућих једињења са SERM и SERD фармакологијом.

Структурни допринос H3 Asp351 на активност модулатора ERα

Финални допринос Py-ComBinE STE.HB модела био је у разумевању интеракција H3 Asp351 са лигандима ERα. Изразито негативне вредности стерних MRAAC асоциране са H3 Asp351 (негативне MRACs вредности од -0,047 pIC₅₀ јединица, Слика 3.20) указале су на то да стерни притисак према аминокиселини испољен од стране C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала и Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикала треба што више смањити (Слика 3.21-3.22), што је такође било у сагласности са претходно анализираним 3-D QSAR моделима проистеклим из 3-D QSAutogrid/R и Py-CoMFA методологије. На крају, потпуно очекивано изразито позитивне HB MRACs вредности од 0,08 pIC₅₀ јединица асоцираних са H3 Asp351 (Слика 3.20) потенцирале су на значају грађења водоничних веза са H3 Asp351 (Слика 3.21-3.22) и последичне дислокације H12 за SERM фармакологију, кроз допринос HBA и HDB фармакофорних особина, односно **HBX**, те да би таква фармакофора требала бити присутна у будућем дизајну, слично разматрањима проистеклим из анализе резултатима 3-D QSAutogrid/R и Py-CoMFA 3-D QSAR студија.

Анализа молекулских детерминанти антагониста $ER\alpha$ након анализе 3-D QSAR модела генерисаних $Py-CoMFA$ и $Py-ComBinE$ методологијама

Резултати добијени након интерпретације $Py-CoMFA$ и $Py-ComBinE$ 3-D QSAR мапа били су у великој мери компатибилни са резултатима проистеклим из 3-D QSAutogrid/R методологије (Слика 3.4). Међутим добијене су прецизније индикације што се тиче структурне оптимизације **Ph** и **Oxy** (Слика 3.23).



Слика 3.23. SAR модел антагониста $ER\alpha$ виђен кроз преклапање **1ERR** (пуне беле линије) и **1XP1** (испрекидане плаве линије). Обавезне интеракције назначене су пуним стрелицама, важне интеракције назначене су испрекиданим стрелицама, могућа супституција биоизостерима назначена је оивиченим стрелицама.

Процена способности различитих алгоритама и функција погодака за репродукцију кристалних структура парцијалних агониста и антагониста $ER\alpha$ користећи портал www.3d-qsar.com

Сходно доброј пракси, $Py-CoMFA$ и $Py-ComBinE$ апликације упарене су са $Py-Docking$, $Py-ConfSearch$ и $Py-Align$ апликацијама са циљем дефинисања правила за

Резултати и дискусија

предвиђање активности помоћу 3-D QSAR алата имплементираних у www.3d-qsar.com сервер. Тако су у оквиру Py-Docking апликације коришћени сви доступни алгоритми и функције погодака програма Smina и PLANTS, а репродукција кристалних структура лиганда ER α извршена је користећи ECRD, RCRD, ECCD и RCCD протоколе. Што се тиче Py-ConfSearch апликације, конформациона претрага вршена је помоћу програма Balloon и Openbabel, те помоћу Python библиотеке RDKit, док је поравнање помоћу апликације Py-Align вршено помоћу програма ShaEP и Python библиотеке RDKit. Наравно, LB поравнање процењивано је помоћу ECRA, RCRA, ECCA и RCCA протокола. Резултати SB AA и LB AA приказани су у Табелама 3.14-3.19, Сликама 3.24 и 3.25, као и Сликама ДМ7-ДМ14 у оквиру Додатног материјала III. Током извршења SB AA протокола програм Smina са функцијом погодака vinaro испољио је највећу прецизност приликом репродуковања експерименталних структура лиганда (Слика 3.24, Додатни материјал III: Сlike ДМ7-ДМ10) док је током извршења LB AA протокола некако очекивано најтачнији био програмски пар Balloon/ShaEP (Слика 3.25, Додатни материјал III: Сlike ДМ11-ДМ14).

Процена поравњања базираног на структури молекулске мете

За процену SB поравњања лиганди ER α подвргнути су претходно описаном протоколу за поновно и унакрсно доковање. Различити алгоритми и функције погодака, имплементирани у програмима Smina и PLANTS, коришћене су за репродукцију експерименталних биоактивних конформација лиганда ER α .

Израчунати проценти тачности доковања (DA) открили су да су сви алгоритми/функције погодака програма Smina и PLANTS успеле да репродукују експерименталне конформација лиганда пронађених у рецептору природног типа било у ECRD или RCRD фази, са тачношћу изнад 50% (Табела 3.14). Међутим, током експеримената унакрсног доковања (Табела 3.15) Smina: vinaro показала се као најтачнија током репродукције експерименталних конформација са прихватљивим DA од 80,55% и 77,77% за ECCD, односно RCCD, респективно. Ипак, током репродукције лиганда ко-кристализованих унутар рецептора мутираног типа (Табеле 3.16 и 3.17), само је Smina: vinaro задржала високу DA у RCCD фази од 68,75%, због чега је програм Smina са функцијом погодака vinaro (Слика 3.24, Додатни материјал III: Сlike ДМ7-ДМ10) коришћен за даље моделирање

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 3.14. Репродукција кристалних структура лигананда ER α природног типа на основу структуре молекулске мете током ECRD и RCRD фаза.

Јед. ЕК ^a	vina ^b	Smina vinardo ^b	AD4 ^г	plp ^д	PLANTS chemplr ^ђ	chemplr95 ^е
ECRD						
1ERE	2,461 ^ж	1,570	3,234	1,904	1,385	1,435
1ERR	1,784	1,625	2,431	1,794	1,440	1,984
1GWQ	3,241	1,206	4,245	3,603	2,021	2,434
1R5K	3,658	0,321	2,434	1,905	1,136	2,321
1SJ0	2,235	2,346	2,431	1,736	1,161	2,564
1X7E	2,542	1,622	2,453	3,205	2,437	1,234
1X7R	3,653	1,592	1,432	1,736	1,407	2,143
1XP1	1,432	0,585	2,453	2,478	1,400	1,223
1XP6	1,543	1,076	1,542	2,285	1,891	1,534
1XP9	1,423	3,641	1,431	1,729	4,456	1,432
1XPC	1,345	2,721	3,933	1,359	3,536	1,345
1XQC	1,475	0,423	2,542	2,001	1,238	1,333
1YIM	1,354	1,088	1,435	2,630	1,903	1,256
1YIN	1,657	0,584	2,435	2,129	1,399	1,764
2BJ4	1,341	1,377	1,534	1,003	2,192	1,325
2IOG	3,453	1,887	1,432	1,538	2,702	2,234
2IOK	2,564	0,347	2,453	1,104	1,162	2,324
3ERD	1,541	1,097	2,431	1,609	2,912	1,435
ТД% ^и	66,67	83,33	58,33	72,22	72,22	77,78
RCRD						
1ERE	1,362	1,557	3,353	1,507	1,664	1,566
1ERR	2,290	1,612	3,102	1,377	1,552	1,662
1GWU	1,406	1,193	2,873	1,678	1,573	1,225
1R5K	2,134	1,692	1,732	1,973	3,803	2,096
1SJ0	3,834	1,333	2,644	1,397	1,573	1,433
1X7E	2,853	0,609	1,077	1,552	1,812	2,383
1X7R	2,062	1,579	5,465	4,978	1,739	3,962
1XP1	2,093	1,428	2,455	1,052	1,053	1,567
1XP6	2,253	1,063	1,507	1,188	1,574	1,691
1XP9	2,435	2,628	2,324	3,212	1,964	1,461
1XPC	2,854	2,708	2,872	1,862	1,127	1,211
1XQC	2,586	2,595	3,368	1,397	1,573	1,136
1YIM	2,235	2,075	2,100	1,678	3,657	1,464
1YIN	2,668	2,429	2,751	1,107	3,191	1,317
2BJ4	2,848	1,364	3,519	3,520	3,553	1,150
2IOG	2,164	2,874	6,649	1,962	1,397	4,893
2IOK	2,418	1,666	4,428	3,147	3,007	4,896
3ERD	2,061	1,084	3,275	0,861	1,897	1,188
ТД%	52,77	80,55	36,11	72,22	72,22	77,78

^aЕкспериментална конформација. ^bКонформација добијена из Smina: vina.

^бКонформација добијена из Smina: vinardo. ^гКонформација добијена из Smina: AD4.

^дКонформација добијена из PLANTS: plp. ^ђКонформација добијена из PLANTS:

chemplr. ^еКонформација добијена паром PLANTS: chemplr95. ^жВредности корена

средњих квадрата одступања измерене између тешких атома експерименталне и

поновно поравнате конформације лиганда. ^зНије доступно. ^иТачност доковања.

Резултати и дискусија

Табела 3.15. Репродукција кристалних структура лиганата ER α природног типа на основу структуре молекулске мете током ECCD и RCCD фаза.

Јед. ЕК ^a	vina ^b	Smina vinardo ^b	AD4 ^r	plr ^d	PLANTS	
					chemplr ^h	chemplr95 ^e
ECCD						
1ERE	2,342 [*]	1,628	3,667	2,977	2,607	2,676
1ERR	2,631	1,917	3,956	2,266	2,896	1,965
1GWQ	1,258	2,544	2,583	2,893	1,523	3,592
1R5K	2,638	1,924	3,963	2,273	2,903	1,972
1SJ0	2,235	1,521	3,560	1,870	2,500	1,569
1X7E	2,236	1,522	3,561	1,871	2,501	2,570
1X7R	1,432	1,718	2,757	1,067	1,697	2,766
1XP1	1,454	1,740	2,779	1,089	1,719	2,788
1XP6	2,617	2,903	3,942	2,252	2,882	1,951
1XP9	2,324	2,610	3,649	1,959	2,589	1,658
1XPC	2,169	1,455	3,494	1,804	2,434	2,503
1XQC	1,432	2,718	2,757	1,067	1,697	2,766
1YIM	1,324	2,610	2,649	2,959	1,589	2,658
1YIN	2,231	2,517	3,556	1,866	2,496	2,565
2BJ4	1,326	0,612	2,651	2,961	1,591	2,666
2IOG	2,395	2,681	3,720	2,030	2,660	1,729
2IOK	2,232	1,518	3,557	1,867	2,497	1,566
3ERD	1,324	2,610	2,649	2,959	1,589	3,658
ТД%ⁿ	69,44	80,55	19,44	80,55	72,22	69,44
RCCD						
1ERE	1,985	1,691	3,692	2,125	1,764	1,685
1ERR	2,274	1,980	3,981	2,414	2,053	1,530
1GWU	3,901	2,607	2,608	1,041	1,680	3,793
1R5K	2,281	1,987	3,988	2,421	2,060	1,685
1SJ0	1,878	1,584	3,585	2,018	1,657	1,592
1X7E	1,879	1,585	3,586	2,019	1,658	1,687
1X7R	1,075	2,781	2,782	1,215	1,854	2,756
1XP1	1,097	2,803	2,804	1,237	1,876	2,593
1XP6	2,260	1,966	3,967	2,400	2,039	2,685
1XP9	1,967	1,673	3,674	2,107	1,746	2,984
1XPC	1,812	1,518	3,519	1,952	1,591	1,984
1XQC	1,075	2,781	2,782	1,215	2,854	2,305
1YIM	1,967	2,673	2,674	1,107	2,746	1,895
1YIN	1,874	1,580	3,581	2,014	1,653	2,631
2BJ4	0,969	2,675	2,676	1,109	3,748	1,875
2IOG	2,038	1,744	3,745	2,178	3,817	2,894
2IOK	1,875	1,581	3,582	2,015	2,654	2,587
3ERD	3,967	2,673	2,674	1,107	2,746	3,890
ТД%	66,67	77,77	19,44	72,77	69,44	66,67

^aЕкспериментална конформација. ^bКонформација добијена из Smina: vina.

^bКонформација добијена из Smina: vinardo. ^rКонформација добијена из Smina: AD4.

^dКонформација добијена из PLANTS:plr. ^hКонформација добијена из PLANTS:

chemplr. ^eКонформација добијена паром PLANTS: chemplr95. ^{*}Вредности корена

средњих квадрата одступања измерене између тешких атома експерименталне и

поновно поравнате конформације лиганда. ⁿНије доступно. ⁿТачност доковања.

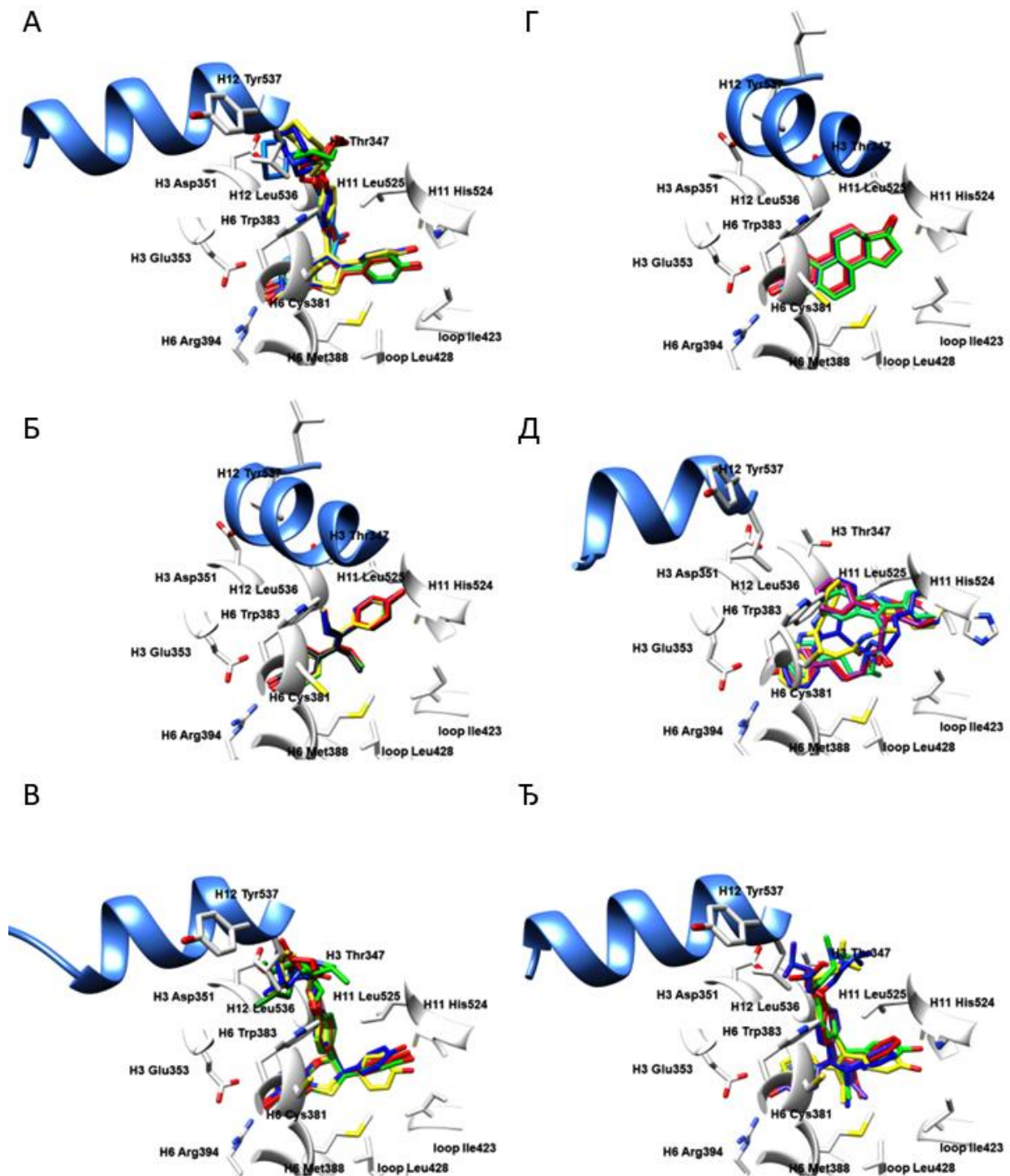
Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 3.16. Репродукција кристалних структура лигананда E α мутираног типа на основу структуре молекулске мете током ECRD, RCRD, ECCD и RCCD фаза.

Јед. ЕК ^a	vina ^b	Smina		PLANTS		
		vinardo ^b	AD4 ^г	plp ^д	chempl ^ђ	chempl95 ^е
ECRD						
1L2I	1,588 ^ж	1,264	2,362	1,362	1,539	1,262
1UOM	1,512	1,650	2,518	2,863	1,457	1,975
2B1Z	2,896	1,845	1,895	1,876	1,597	1,038
2QA6	1,874	1,515	3,362	2,324	2,697	1,561
2R6W	2,846	2,759	2,580	2,412	2,474	1,244
2R6Y	2,365	1,629	2,684	2,435	1,569	1,843
4TUZ	1,652	2,635	2,741	1,242	1,895	2,816
5AK2	1,691	1,894	2,784	1,508	2,625	2,640
ТД% ^и	81,25	87,50	50,00	75,00	81,25	87,50
RCRD						
1L2I	1,962	1,965	2,828	1,535	1,674	1,593
1UOM	1,915	2,365	3,413	2,744	1,984	1,985
2B1Z	2,965	1,985	4,386	2,432	1,743	1,532
2QA6	2,625	1,695	2,044	2,535	3,431	1,639
2R6W	2,594	2,654	4,456	2,432	2,895	1,357
2R6Y	2,598	2,262	3,144	1,435	1,486	1,981
4TUZ	1,659	1,985	4,185	1,553	1,904	2,936
5AK2	1,598	2,647	6,091	2,463	3,425	2,845
ТД%	75,00	75,00	12,50	68,75	62,50	87,50
ECRD						
1L2I	2,639	1,268	3,125	1,653	2,362	2,436
1UOM	3,658	2,657	4,983	2,973	2,482	2,361
2B1Z	2,597	2,448	2,826	2,461	1,985	1,981
2QA6	2,517	1,987	4,918	2,963	2,624	1,874
2R6W	1,584	2,594	3,983	2,684	2,568	1,693
2R6Y	2,778	2,551	4,599	2,436	1,879	2,254
4TUZ	2,695	1,695	2,771	1,773	2,625	2,851
5AK2	2,478	1,625	5,345	2,784	2,632	2,985
ТД%	50,00	75,00	12,50	62,50	62,50	68,75
RCRD						
1L2I	2,695	1,987	3,780	1,908	2,984	2,666
1UOM	2,657	2,785	5,893	2,563	2,653	2,591
2B1Z	2,854	2,569	5,208	2,953	2,625	2,485
2QA6	2,697	1,624	4,976	2,452	2,984	1,962
2R6W	3,487	2,965	3,537	3,564	2,325	1,984
2R6Y	2,598	2,897	4,842	2,986	1,969	2,953
4TUZ	2,884	2,627	2,044	1,953	2,983	3,325
5AK2	2,748	1,639	2,231	2,990	2,355	2,435
ТД%	43,75	68,75	12,50	56,25	56,25	56,25

^aЕкспериментална конформација. ^bКонформација добијена из Smina: vina. ^вКонформација добијена из Smina: vinardo. ^гКонформација добијена из Smina: AD4. ^дКонформација добијена из PLANTS: plp. ^ђКонформација добијена из PLANTS: chemplp. ^еКонформација добијена паром PLANTS: chemplp95. ^жВредности корена средњих квадрата одступања измерене између тешких атома експерименталне и поновно поравнате конформације лиганда. ^зНије доступно. ^иТачност доковања.

Резултати и дискусија



Слика 3.24. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Smina: **1ERR** (A) ЕС плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **3ERD** (Б), ЕС црна, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1XP1** (В), ЕС светло зелена, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1ERE** (Г), ЕС љубичаста, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **21OK** (Д), ЕС светло зелена, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; и **2BJ4** (Ђ) ЕС љубичаста, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Процена поравњања базираног на структури лиганада

Слично протоколима за SB поравнање, поступак LB поравњања спроведен је са лигандима екстрахованим из ER α природног или мутираног типа. Конформациона анализа вршена је помоћу програма Balloon, Openbabel или Python библиотеке RDKit, док је сâм поступак поравњања изведен је помоћу програма ShaEP (samo shaep.onlyshare конформација) и Python библиотеке RDKit, док су насумичне конформације лиганада генерисане програма користећи све могуће врсте поравњања доступне у апликацији Py-Align. Критеријум процента тачности поравњања (AA) био је у распону између 0 (без поравњања) и 1 (максималне перформансе поравњања).

Узимајући у обзир способност поравњања обе врсте лиганада (Табеле 3.17-3.19, Слика 3.25, Додатни материјал III: Сlike ДМ11-ДМ14), Balloon/ShaEP програмски пар био је најтачнији у свим фазама и коришћен је за накнадно поравнање LB молекула унутар тест сетова и дизајнираних једињења и даље молекулско моделирање.

Процена способности предвиђања биоактивности 3-D QSAR модела генерисаних из N пробе и STE.HB поља

Сходно доброј пракси, најбољи Py-CoMFA и Py-ComBinE модели даље су процењени у смислу предиктивне активности на нивоу TS_{CRY} и TS_{MOD1}-TS_{MOD3}, Табела 3.21, Додатни материјал III: Табеле ДМ12-ДМ25, респективно). Из процене способности различитих алгоритама да репродукују SB и LB биоактивне конформације ко-кристализованих лиганада ER α проистекла су правила за генерисање биоактивних конформација помоћу којих би биопоза било ког претходно нетестираног једињења могла бити генерисана и учитана у Py-CoMFA и Py-ComBinE моделе са циљем предвиђања биоактивности.

Биоактивне конформације једињења унутар TS_{CRY} и TS_{MOD1}-TS_{MOD3} добијене су након моделирања на нивоу рецептора помоћу програма Smina: vinarдо, или на након упоређивања са осталим ко-кристализованим лигандима користећи Balloon/ShaEP. Најбољи Py-CoMFA и Py-ComBinE модели, заједно са протоколима за генерисање биоактивних конформација, показали су добру предиктивну моћ (видети текст даље), која би свакако могла бити унапређена након генерисања нових модела након колекционирања нових кристалних структура.

Резултати и дискусија

Табела 3.17. Репродукција кристалних структура лиганата ER α природног типа на основу структуре самих лиганата током ECRA и RCRA фаза.

Јед. ЕК ^a	Balloon/ ShaEP ^b	Balloon/ RDKit ^b	Openbabel/ ShaEP ^c	Openbabel/ RDKit ^d	RDKit/ ShaEP ^b	RDKit/ RDKit ^e
ECRA						
1ERE	0,532 ^{*k}	0,639	0,741	0,639	1,979	0,961
1ERR	0,624	0,632	0,369	0,547	0,324	0,597
1GWQ	0,784	0,585	0,569	0,238	0,435	0,745
1R5K	0,639	0,894	0,741	0,851	1,245	0,632
1SJ0	0,548	0,592	0,562	0,265	0,435	0,754
1X7E	0,597	0,781	0,526	0,963	0,956	0,874
1X7R	0,636	0,895	0,741	0,254	1,354	1,364
1XP1	0,781	0,238	0,369	0,878	1,652	2,548
1XP6	0,596	0,235	0,457	0,639	0,696	1,484
1XP9	0,782	0,856	0,187	0,537	1,475	1,471
1XPC	0,892	0,569	0,532	0,481	0,595	1,694
1XQC	0,795	0,481	0,369	0,421	0,536	0,597
1YIM	0,559	0,369	0,841	0,874	0,666	0,561
1YIN	0,596	0,484	0,639	0,539	0,784	0,749
2BJ4	0,953	0,895	0,512	0,258	0,146	1,659
2IOG	0,594	0,236	0,841	0,536	0,587	0,639
2IOK	0,369	0,539	0,963	0,481	0,339	0,748
3ERD	0,953	0,538	0,517	0,159	0,748	0,874
ТП%ⁿ	100	100	100	100	83,33	72,22
RCRA						
1ERE	0,769	0,876	0,978	0,876	2,216	1,198
1ERR	0,861	0,869	0,606	0,784	0,561	0,834
1GWU	1,021	0,822	0,806	0,475	0,672	0,982
1R5K	0,876	1,131	0,978	1,088	1,482	0,869
1SJ0	0,785	0,829	0,799	0,502	0,672	0,991
1X7E	0,834	1,018	0,763	1,200	1,193	1,111
1X7R	0,873	1,132	0,978	0,491	1,591	1,601
1XP1	1,018	0,475	0,606	1,115	1,889	2,785
1XP6	0,833	0,472	0,694	0,876	0,933	1,721
1XP9	1,019	1,093	0,424	0,774	1,712	1,708
1XPC	1,129	0,806	0,769	0,718	0,832	1,931
1XQC	1,032	0,718	0,606	0,658	0,773	0,834
1YIM	0,796	0,606	1,078	1,111	0,903	0,798
1YIN	0,833	0,721	0,876	0,776	1,021	0,986
2BJ4	1,190	1,132	0,749	0,495	0,383	1,896
2IOG	0,831	0,473	1,078	0,773	0,824	0,876
2IOK	0,606	0,776	1,200	0,718	0,576	0,985
3ERD	1,190	0,775	0,754	0,396	0,985	1,111
ТП%	66,67	72,22	83,33	77,77	61,11	50,00

^aЕкспериментална конформација. ^bКонформација добијена из Balloon/ShapeP.

^bКонформација добијена из Balloon/RDKit. ^cКонформација добијена из

Openbabel/ShapeP. ^dКонформација добијена из Openbabel/RDKit. ^eКонформација

добијена из RDKit/ShapeP. ^fКонформација добијена из RDKit/RDKit. ^{*k}Тачност

поравнања измерена између тешких атома конформације експерименталног и

поравњаног лиганда. ⁿНије доступно. ⁿТачност поравнања.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 3.18. Репродукција кристалних структура лиганата ER α природног типа на основу структуре самих лиганата током ЕССА и РССА фаза.

Јед. ЕК ^a	Balloon/ ShaEP ^b	Balloon/ RDKit ^b	Openbabel/ ShaEP ^c	Openbabel/ RDKit ^d	RDKit/ ShaEP ^b	RDKit/ RDKit ^e
ЕССА						
1ERE	0,895 ^{*k}	1,002	1,104	1,002	2,342	1,324
1ERR	0,987	0,995	0,732	0,910	0,687	0,960
1GWQ	1,147	0,948	0,932	0,601	0,798	1,108
1R5K	1,002	1,257	1,104	1,214	1,608	0,995
1SJ0	0,911	0,955	0,925	0,628	0,798	1,117
1X7E	0,960	1,144	0,889	1,326	1,319	1,237
1X7R	0,999	1,258	1,104	0,617	1,717	1,727
1XP1	1,144	0,601	0,732	1,241	2,015	2,911
1XP6	0,959	0,598	0,820	1,002	1,059	1,847
1XP9	0,145	1,219	0,550	0,900	1,838	1,834
1XPC	0,255	0,932	0,895	0,844	0,958	2,057
1XQC	0,158	0,844	0,732	0,784	0,899	0,960
1YIM	0,922	0,732	1,204	1,237	1,029	0,924
1YIN	0,959	0,847	1,002	0,902	1,147	1,112
2BJ4	1,316	1,258	0,875	0,621	0,509	2,022
2IOG	0,957	0,599	1,204	0,899	0,95	1,002
2IOK	0,732	0,902	1,326	0,844	0,702	1,111
3ERD	1,316	0,901	0,880	0,522	1,111	1,237
ТП%ⁿ	72,22	66,67	61,11	66,67	44,44	22,22
РССА						
1ERE	0,953	1,060	1,162	1,060	2,400	1,382
1ERR	0,045	1,053	0,790	0,968	0,745	1,018
1GWU	1,205	1,006	0,990	0,659	0,856	1,166
1R5K	0,060	1,315	1,162	1,272	1,666	1,053
1SJ0	0,969	1,013	0,983	0,686	0,856	1,175
1X7E	0,018	1,202	0,947	1,384	1,377	1,295
1X7R	0,657	1,316	1,162	0,675	1,775	1,785
1XP1	0,202	0,659	0,790	1,299	2,073	2,969
1XP6	0,617	0,656	0,878	1,060	1,117	1,905
1XP9	0,403	1,277	0,608	0,958	1,896	1,892
1XPC	0,313	0,990	0,953	0,902	1,016	2,115
1XQC	1,216	0,902	0,790	0,842	0,957	1,018
1YIM	0,980	0,790	1,262	1,295	1,087	0,982
1YIN	1,017	0,905	1,060	0,960	1,205	1,170
2BJ4	1,374	1,316	0,933	0,679	0,567	2,080
2IOG	1,015	0,657	1,262	0,957	1,008	1,060
2IOK	0,790	0,960	1,384	0,902	0,760	1,169
3ERD	1,374	0,959	0,938	0,580	1,169	1,295
ТП%	66,67	50,00	66,67	66,67	33,33	5,55

^aЕкспериментална конформација. ^bКонформација добијена из Balloon/ShapeP.

^bКонформација добијена из Balloon/RDKit. ^cКонформација добијена из

Openbabel/ShapeP. ^dКонформација добијена из Openbabel/RDKit. ^eКонформација

добијена из RDKit/ShapeP. ^fКонформација добијена из RDKit/RDKit. ^{*k}Тачност

поравнања измерена између тешких атома конформације експерименталног и

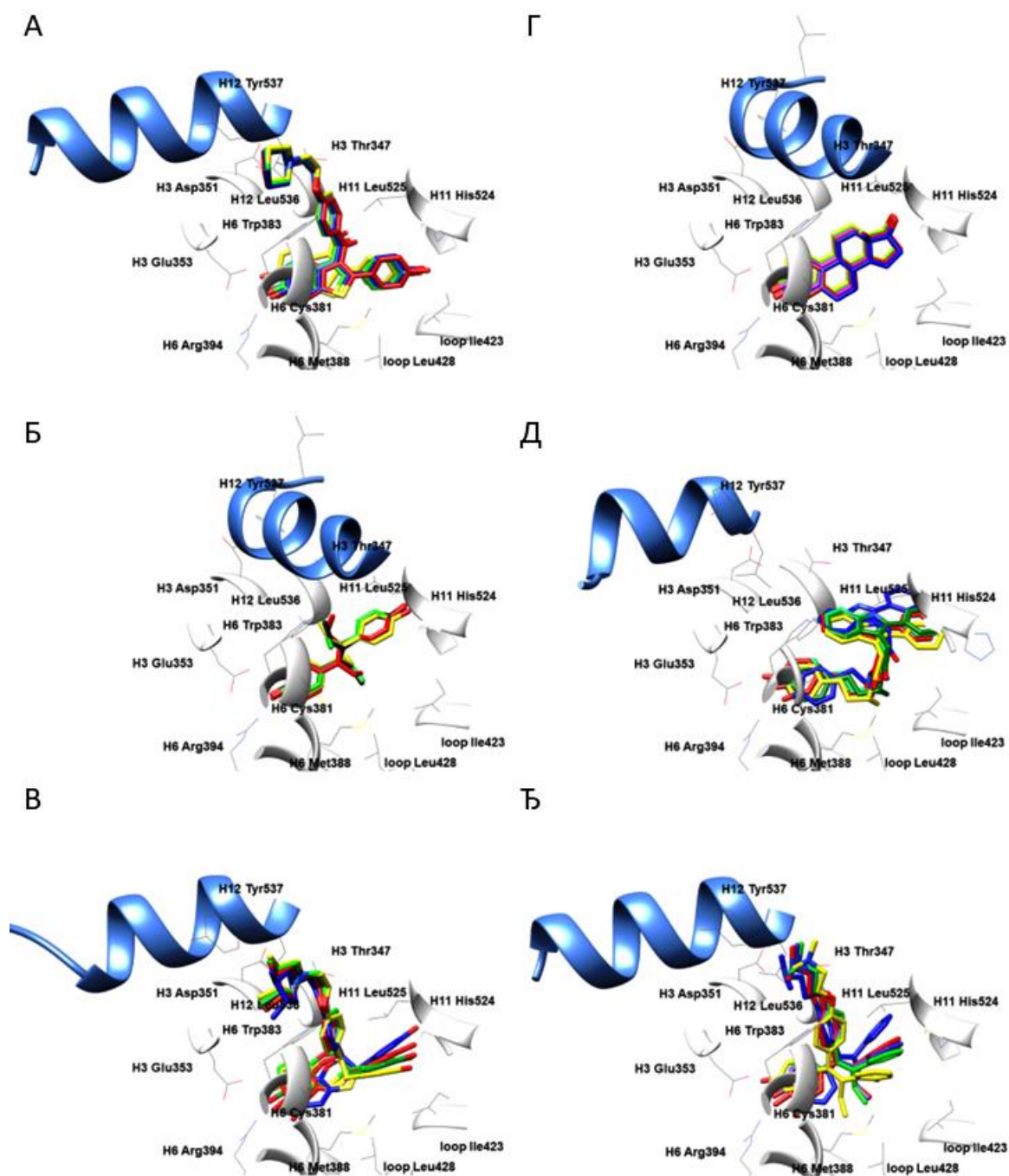
поравњаног лиганда. ⁿНије доступно. ⁿТачност поравнања.

Резултати и дискусија

Табела 3.19. Репродукција кристалних структура лиганата EР α мутираног типа на основу структуре самих лиганата ECRA, RCRA, ECCA и RCCA фаза.

Јед. ЕК ^a	Balloon/ ShaEP ^b	Balloon/ RDKit ^b	Openbabel/ ShaEP ^r	Openbabel/ RDKit ^d	RDKit/ ShaEP ^b	RDKit/ RDKit ^e
ECRA						
1L2I	0,712	0,529	0,819	0,636	0,584	0,401
1UOM	0,666	0,495	0,773	0,602	0,538	0,367
2B1Z	0,752	0,539	0,859	0,646	0,624	0,411
2QA6	0,675	0,609	0,782	0,716	0,547	0,481
2R6W	0,663	0,518	0,770	0,625	0,535	0,390
2R6Y	0,623	0,490	0,730	0,597	0,495	0,362
4TUZ	0,752	0,534	0,859	0,641	0,624	0,406
5AK2	0,72	0,447	0,827	0,554	0,592	0,319
ТП%^u	100	100	100	100	100	100
RCRA						
1L2I	0,949	0,766	0,056	0,873	0,821	0,638
1UOM	0,903	0,732	0,010	0,839	0,775	0,604
2B1Z	0,989	0,776	0,096	0,883	0,861	0,648
2QA6	0,912	0,846	0,019	0,953	0,784	0,718
2R6W	0,900	0,755	1,007	0,862	0,772	0,627
2R6Y	0,860	0,727	0,967	0,834	0,732	0,599
4TUZ	0,989	0,771	1,096	0,878	0,861	0,643
5AK2	0,957	0,684	1,064	0,791	0,829	0,556
ТП%	100	100	62,50	100	100	100
ECRA						
1L2I	0,026	1,843	0,133	0,950	1,898	1,715
1UOM	0,980	0,809	1,087	0,916	1,852	1,681
2B1Z	0,666	1,853	0,173	0,960	0,938	0,725
2QA6	0,989	1,923	1,096	1,030	0,861	0,795
2R6W	0,977	0,832	1,084	1,939	0,849	1,704
2R6Y	0,937	1,804	1,044	0,911	1,809	1,676
4TUZ	1,066	0,848	0,773	1,955	1,938	0,720
5AK2	1,034	0,761	0,741	1,868	0,906	0,633
ТП%	75,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
RCRA						
1L2I	0,630	0,947	0,237	0,554	0,902	0,819
1UOM	1,084	0,913	0,191	1,020	0,956	0,785
2B1Z	0,770	1,957	1,277	0,664	1,042	1,829
2QA6	0,993	1,027	1,200	0,534	0,965	1,899
2R6W	0,981	0,936	1,188	0,543	1,953	0,808
2R6Y	0,841	0,908	1,148	1,015	0,913	0,780
4TUZ	0,870	1,952	0,277	1,059	1,042	1,824
5AK2	1,138	1,865	0,245	1,972	1,010	1,737
ТП%	75,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00

^aЕкспериментална конформација. ^bКонформација добијена из Balloon/ShaeP. ^rКонформација добијена из Balloon/RDKit. ^dКонформација добијена из Openbabel/ShaeP. ^eКонформација добијена из Openbabel/RDKit. ^uКонформација добијена из RDKit/ShaeP. ^vКонформација добијена из RDKit/RDKit. ^wТачност поравнања измерена између тешких атома конформације експерименталног и поравнаног лиганда. ^xНије доступно. ^yТачност поравнања.



Слика 3.25. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α виртуелно поравњаних у активном центру ER α , помоћу програмског пара Balloon/ShaEP: **1ERR** (A), EC плава, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **3ERD** (Б), EC црна, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **1XP1** (B), EC светло зелена, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **1ERE** (Г), EC љубичаста, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **2IOK** (Д), EC светло зелена, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; и **2BJ4** (Ђ) EC љубичаста, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Резултати и дискусија

Процена способности предвиђања биоактивности 3-D QSAR модела генерисаног из *N* пробе

Активности молекула унутар T_{CRY} предвиђене су помоћу Py-CoMFA модела са ниским ААЕР од 1,32 и 1,46 за LOO и LSO SA оптимизоване 3-D QSAR моделе, респективно (Табела 3.20). Предвиђена q^2_{pred} вредност за експерименталне конформације износила је 0,37. ААЕР вредности SB поравњаних једињења из T_{CRY} биле су 0,73, окарактерисане са $q^2_{\text{pred.}} = 0,53$. Ове вредности указале су добру предиктивну моћ модела.

Табела 3.20. Примена 3-D QSAR модела проистеклог из *N* пробе на SB/LB предвиђање активности једињења унутар T_{CRY} .

Унос	pK_i	ЕС пред. pK_i^a		ААЕР [†]	SB пред. pK_i^a		ААЕР [†]	LB пред. pK_i^a		ААЕР [†]
		LOO ^б	LSO ^в		LOO ^б	LSO ^в		LOO ^б	LSO ^б	
Py-CoMFA										
3ERT	9,60	8,78	8,72	0,85	8,72	9,00	0,74	9,55	9,18	0,23
3UU7	8,79	7,69	7,68	1,11	8,94	8,83	0,10	9,08	8,11	0,49
3UUA	8,79	7,61	7,60	1,19	9,16	9,06	0,32	8,74	8,09	0,37
3UUC	5,70	5,70	5,46	0,12	5,45	6,79	0,67	6,14	5,29	0,43
4DMA	5,60	8,62	7,96	2,69	8,17	8,39	2,68	8,40	7,62	2,41
4MG6	6,00	4,66	4,04	1,65	5,25	4,51	1,12	4,86	4,29	1,43
4MG8	10,00	8,8	8,84	1,18	9,18	9,54	0,64	9,85	9,29	0,43
4MG9	6,00	6,85	6,79	0,82	6,6	6,65	0,63	6,88	5,63	0,63
4MGA	6,00	7,65	7,26	1,46	7,50	7,67	1,59	7,68	7,18	1,43
4MGC	7,00	7,35	6,97	0,19	7,67	7,54	0,61	7,60	6,61	0,50
4MGD	6,00	9,49	9,31	3,40	9,28	10,17	3,73	8,68	8,48	2,58
4TUZ	10,00	9,50	8,95	0,78	9,15	9,39	0,73	9,86	9,24	0,45
4ZN9	9,60	9,32	9,19	0,35	8,87	9,18	0,58	9,43	9,29	0,24
Py-ComBinE										
3ERT	9,60	8,74	8,72	0,87	8,76	8,65	0,90	8,99	8,99	0,61
3UU7	8,79	7,65	7,68	1,13	8,98	8,48	0,25	8,52	7,92	0,57
3UUA	8,79	7,57	7,60	1,21	9,20	8,71	0,25	8,18	7,90	0,75
3UUC	5,70	5,66	5,46	0,14	5,49	6,44	0,47	5,58	5,10	0,36
4DMA	5,60	8,58	7,96	2,67	8,21	8,04	2,52	7,84	7,43	2,03
4MG6	6,00	4,62	4,04	1,67	5,29	4,16	1,28	4,30	4,10	1,80
4MG8	10,00	8,76	8,84	1,20	9,22	9,19	0,80	9,29	9,10	0,81
4MG9	6,00	6,81	6,79	0,80	6,64	6,30	0,47	6,32	5,44	0,44
4MGA	6,00	7,61	7,26	1,43	7,54	7,32	1,43	7,12	6,99	1,05
4MGC	7,00	7,31	6,97	0,17	7,71	7,19	0,45	7,04	6,42	0,31
4MGD	6,00	9,45	9,31	3,38	9,32	9,82	3,57	8,12	8,29	2,20
4TUZ	10,00	9,46	8,95	0,80	9,19	9,04	0,89	9,30	9,05	0,83
4ZN9	9,60	9,28	9,19	0,37	8,91	8,83	0,73	8,87	9,10	0,62

^аПредвиђања добијена SA моделима оптимизованих са LOO и LSO унакрсном валидацијом. ^бLOO унакрсна валидација. ^вLSO унакрсна валидација са 5-random-groups-out. [†]ААЕР, просечна апсолутна грешка предвиђања LOO и LSO унакрсних валидација.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Надаље, просечне предвиђене вредности активности једињења из осталих тест сетова такође су указале на добру предиктивну моћ модела. Тако, активности TS_{MOD1} биле су предвиђене са ААЕР од 2,06, док су активности TS_{MOD2} и TS_{MOD3} биле окарактерисане са ААЕР вредностима од 1,62 и 2,21, респективно. На основу изложене анализе и процењене способности предикције активности, LB и SB Py-CoMFA модел из Н пробе представља оптималан вредан алат за предвиђање активности и дизајна нових лиганата ER α , који се свакако може унапредити.

Процена способности предвиђања биоактивности 3-D QSAR модела генерисаног из STE.HB поља

Активности молекула унутар TC_{CRY} предвиђене су помоћу Py-ComBinE модела са ниским ААЕР од 1,47 и 1,66 за LOO и LSO SA оптимизоване 3-D QSAR моделе, респективно (Табела 3.20). Предвиђена q^2_{pred} вредност за експерименталне конформације износила је 0,26. ААЕР вредности SB поравњаних једињења из TC_{CRY} биле су 0,61, окарактерисане са $q^2_{pred} = 0,47$. Ове вредности указале су добру предиктивну моћ модела.

Надаље, просечне предвиђене вредности активности једињења из осталих тест сетова такође су указале на добру предиктивну моћ модела. Тако, активности TS_{MOD1} биле су предвиђене са ААЕР од 1,87, док су активности TS_{MOD2} и TS_{MOD3} биле окарактерисане са ААЕР вредностима од 1,73 и 2,15, респективно. На основу изложене анализе и процењене способности предикције активности, LB и SB Py-ComBinE модел из STE.HB поља представља оптималан вредан алат за предвиђање активности и дизајна нових лиганата ER α , који се свакако може унапредити.

Правила за рационални дизајн нових антагониста ER α на основу 3-D QSAR модела проистеклих из Py-CoMFA и Py-ComBinE методологија

На основу детаљне анализе 3-D QSAR Py-CoMFA и Py-ComBinE модела изложене у претходном делу текста и процене способности предвиђања биолошке активности модела, извршен је рационални дизајн иновативних антагониста ER α (Табела 3.21, у даљем тексту са префиксом CBE). Дизајн је поново био фокусиран на структурну оптимизацију једињења пронађеног у комплексу са ознаком 5AK2 [75] и дизајну нових хемијских ентитета са SERM фармакологијом. Тако, нова једињења са SERM фармакологијом дизајнирана су поштујући претходно описане хипотезе SAR

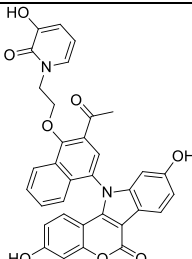
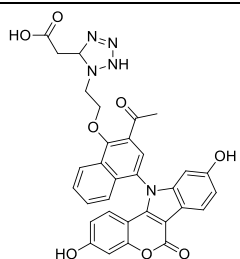
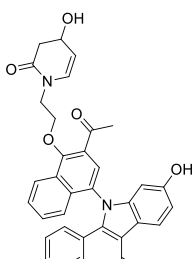
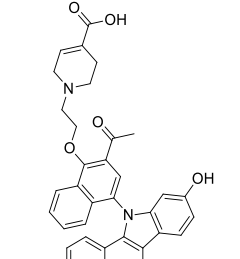
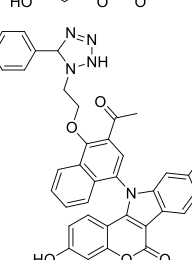
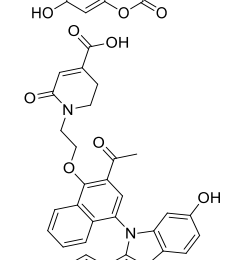
Резултати и дискусија

модела (Слика 3.26), структурном оптимизацијом језгра кумарина, након чега су одређена приоритетна једињења за хемијску синтезу и биолошку евалуацију у смислу предвиђања биолошке активности помоћу Py-CoMFA/Py-ComBinE-Smina: vinardo-Balloon/ShaEP протокола (Табела 3.21). Следећи поступци примењивани су у дизајну:

1. Основно језгро било је 3,9-дихидроксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-он које је испуњавало све структурне карактеристике **1. PhOH-C6-Хетероцикл-2. PhOH** архитектуре у смисли погодности да формира водоничне везе са НЗ Glu353, Н6 Arg394 и Н11 His524;
2. Секундарни амин 3,9-дихидроксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-она супституисан је са 1-(1,4-дихидроксинафтален-2-ил)етаноном, као екстензијом **Ph**, у смислу остваривања интеракција са НЗ Thr347 и Н6 Trp383;
3. **Оху** особина инкорпорирана је у виду 2-аминоетанола, након супституције 1-(1,4-дихидроксинафтален-2-ил)етанола;
4. Примарни амин 2-аминоетанола даље је надограђен различитим хетероцикулусима попут 3-хидроксипиридин-2(1*H*)-она (**СВЕ-1**), 4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1*H*)-она (**СВЕ-2**), 5-фенил-2,5-дихидро-1*H*-тетразола (**СВЕ-3**), 2-(2,5-дихидро-1*H*-тетразол-5-ил)сирћетне киселине (**СВЕ-4**), 1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилне киселине (**СВЕ-5**) и 6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилне киселине (**СВЕ-6**), све са циљем имплементације **НВХ** фармакофорних особина према НЗ Asp351.
5. Претходно описани протокол резултовао је у рационалном дизајну 6 једињења (Табела 3.21, **СВЕ-1** до **СВЕ-6**), која су потом подвргнута Py-CoMFA/Py-ComBinE-Smina: vinardo-Balloon/ShaEP протоколу предвиђања активности. Свих шест једињења након дефинисања биоактивних конформација помоћу SB/LB стратегије консензуса и предвиђања активности, синтетисано је и подвргнуто биохемијској евалуацији, о чему се детаљно говори у даљем тексту ове докторске дисертације.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 3.21. Структуре дизајнираних погодака и њихове предвиђене антагонистичке активности у односу на ER α .

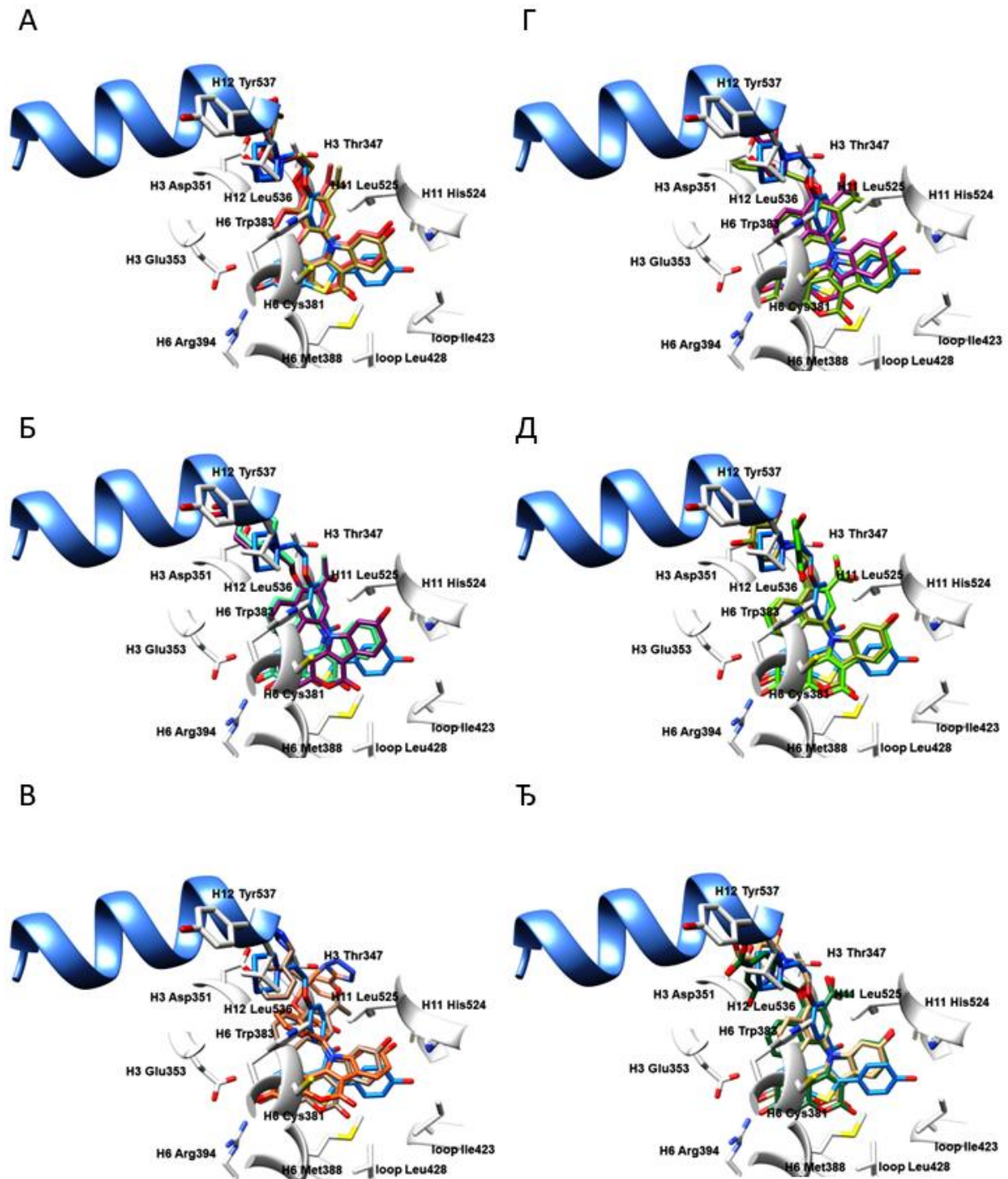
#	Структура лиганда	SB пред. ^a IC ₅₀ (nM) Py-CoMFA Py-ComBinE	LB пред. ^b IC ₅₀ (nM) Py-CoMFA Py-ComBinE	#	Структура лиганда	SB пред. IC ₅₀ (nM) Py-CoMFA Py-ComBinE	LB пред. IC ₅₀ (nM) Py-CoMFA Py-ComBinE
CBE-1		0,26 0,29	0,36 0,41	CBE-4		0,09 0,13	0,19 0,16
CBE-2		0,29 0,34	0,36 0,41	CBE-5		0,17 0,11	0,23 0,13
CBE-3		0,21 0,26	0,26 0,31	CBE-6		0,29 0,41	0,36 0,54

^aПредвиђене SB активности дизајнираних једињења добијене помоћу најбољих Py-CoMFA и Py-ComBinE 3-D QSAR модела; ^bПредвиђене LB активности дизајнираних једињења добијене помоћу најбољих Py-CoMFA и Py-ComBinE 3-D QSAR модела.

Поступци хемијске синтезе једињења CBE-1 до CBE-6

У главном делу текста детаљно су дискутовани синтетички протоколи који су резултовали синтезом једињења CBE-1 до CBE-6 велике чистоће. Ради прегледности текста, сами синтетички протоколи као и спектрални подаци у виду ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹⁵N NMR, и ¹⁷O NMR спектра и њихова дискусија приказани су у оквиру Додатног материјала III (Слике ДМ15-ДМ110). HPLC спектри којим је потврђена чистоћа једињења у износу од преко 95% приложени су као Додатни материјал III: Слике ДМ111-ДМ116).

Резултати и дискусија

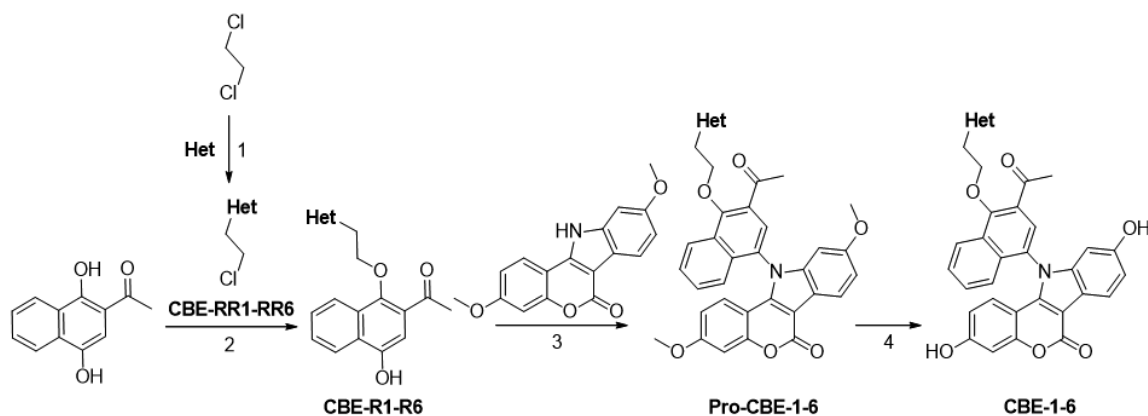


Слика 3.26. Преклапање између дизајнираних једињења **СВЕ-4** (А), **СВЕ-5** (Б), **СВЕ-3** (В), **СВЕ-1** (Г), **СВЕ-2** (Д), **СВЕ-6** (Ђ) **1ERE**, **ЕС** плава, унутар $ER\alpha$ активног центра. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, **H12** хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са **SERM** односно **SERD** фармакологијом.

Синтеза једињења **CBE-1** до **CBE-6**

Припрема једињења **CBE-1** до **CBE-6** започела је реакцијом алкиловања 1,2-дихлороетана са 3-хидроксипиридин-2(1*H*)-оном, 4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1*H*)-оном, 5-фенил-2,5-дихидро-1*H*-тетразолом, 2-(2,5-дихидро-1*H*-тетразол-5-ил)сирћетном киселином, 1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилном киселином или 6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилном киселином, рефлуковањем у медијуму калијум карбоната, калијум јодида и ацетона, како би се добили реактанти **CBE-RR1** (88% приноса), **CBE-RR2** (89% приноса), **CBE-RR3** (87% приноса), **CBE-RR4** (91% приноса), **CBE-RR5** (88% приноса) и **CBE-RR6** (87% приноса), респективно (Шема 3.9) [395].

Шема 3.9. Синтеза једињења **CBE-1** до **CBE-R6**



CBE-RR1; CBE-R1; Pro-CBE-1; CBE-1; Het: 3-хидроксипиридин-2(1*H*)-он
CBE-RR2; CBE-R2; Pro-CBE-2; CBE-2; Het: 4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1*H*)-он
CBE-RR3; CBE-R3; Pro-CBE-3; CBE-3; Het: 5-фенил-2,5-дихидро-1*H*-тетразол
CBE-RR4; CBE-R4; Pro-CBE-4; CBE-4; Het: 2-(2,5-дихидро-1*H*-тетразол-5-ил)сирћетна киселина
CBE-RR5; CBE-R5; Pro-CBE-5; CBE-5; Het: 1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина
CBE-RR6; CBE-R6; Pro-CBE-6; CBE-6; Het: 6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина

^aРеагенси и услови: (1) **Het**: 3-хидроксипиридин-2(1*H*)-он, 4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1*H*)-он, 5-фенил-2,5-дихидро-1*H*-тетразол, 2-(2,5-дихидро-1*H*-тетразол-5-ил)сирћетна киселина, 1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина или 6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилна киселина, K₂CO₃, KI, ацетон, рефлукс, 72 h; (2) DMF, безводни K₂CO₃, 100°C; (3) 3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(1*H*)-он, K₂CO₃, KI, ацетон, рефлукс, 72 h; (4) BBr₃, CH₂Cl₂, 0°C, 3h, рефлукс.

Даље купловање реактаната **CBE-RR1** до **CBE-RR6** са 1-(1,4-дихидроксинафтален-2-ил)етеноном, у диметилформамиду и безводном калијум карбонату, под рефлуksom и безводним условима [396], резултовало је синтезом реактаната **CBE-RR1** (86% приноса), **CBE-RR2** (82% приноса), **CBE-RR3** (86%

Резултати и дискусија

приноса), **СВЕ-RR4** (79% приноса), **СВЕ-RR5** (81% приноса) и **СВЕ-RR6** (79% приноса). Кондензација сваког од реактаната **СВЕ-R1** до **СВЕ-R6** са 3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-оном, такође рефлуктовањем у медијуму калијум карбоната, калијум јодида и ацетона, резултовала је про-једињењима **Pro-СВЕ-1** (принос од 84%), **Pro-СВЕ-2** (принос од 87%), **Pro-СВЕ-3** (принос од 85%), **Pro-СВЕ-4** (принос од 81%), **Pro-СВЕ-5** (принос од 87%) и **Pro-СВЕ-R6** (принос од 83%). Деривати **СВЕ-1** (принос од 90%), **СВЕ-2** (принос од 89%), **СВЕ-3** (принос од 86%), **СВЕ-4** (принос од 87%), **СВЕ-5** (принос од 89%) и **СВЕ-R6** (принос од 89%) добијени су деметилацијом једињења **Pro-СВЕ-1** до **Pro-СВЕ-R6**, респективно, коришћењем борон-трибромида (2 еквивалента. по метокси функцији) у сувом дихлорметану на 0°C [389]. Финални продукти пречишћени су хроматографијом на колони силика гела (Et₂O:EtOAc = 75:25 v/v као елуент) [389].

Интерпретација спектралних података за једињења СВЕ-1 до СВЕ-6

Синтеза једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** започета је реакцијом алкиловања 1,2-дихлороетана са 3-хидроксипиридин-2(1*H*)-оном, 4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1*H*)-оном, 5-фенил-2,5-дихидро-1*H*-тетразолом, 2-(2,5-дихидро-1*H*-тетразол-5-ил)сирћетном киселином, 1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилном киселином или 6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилном киселином, не би ли дошло до синтезе **СВЕ-RR1**, **СВЕ-RR2**, **СВЕ-RR3**, **СВЕ-RR4**, **СВЕ-RR5** и **СВЕ-RR6**, тим редоследом. Тако, метиленска функционална група супституисана азотом из хетероциклуса емитовала је као ¹H NMR синглет мањег интензитета на 3,37, 3,37, 3,18, 3,07, 2,53 и 3,06 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ15, ДМ19, ДМ23, ДМ27, ДМ31 и ДМ35, респективно), односно као ¹³C NMR синглет на 47,65, 47,05, 55,17, 53,04, 55,91 и 48,17 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ16, ДМ20, ДМ24, ДМ28, ДМ32 и ДМ36, респективно) унутар одговарајућих спектра за **СВЕ-RR1**, **СВЕ-RR2**, **СВЕ-RR3**, **СВЕ-RR4**, **СВЕ-RR5** и **СВЕ-RR6**, респективно. Преостала метиленска функционална група 1,2-дихлороетана супституисана халогеном емитовала је као нешто интензивнији ¹H NMR мултиплет на 3,70, 3,74, 3,50, 3,66, 3,60 и 3,76 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ15, ДМ19, ДМ23, ДМ27, ДМ31 и ДМ35, респективно), односно као ¹³C NMR синглет високог интензитета на 42,85, 42,85, 38,43, 38,43, 40,27 и 41,63 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ16, ДМ20, ДМ24, ДМ28, ДМ32 и ДМ36, респективно). Наравно, формирање С-N везе потврђено је и

Докторска дисертација Незрине Куртановић

одговарајућим ^{15}N NMR спектрима, односно оштрим синглетима на -227,80, -227,80, -271,30, -271,30, -331,10 и -263,70 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ17, ДМ21, ДМ25, ДМ29, ДМ33 и ДМ37, респективно).

Детаљнија анализа приложених спектра указала је и на постојање специфичних функционалних група за свако од синтетисаних једињења понаособ. Тако је у структури једињења **СВЕ-RR1** потврђено присуство хидроксилне групе на положају С3 3-хидроксипиридин-2(1*H*)-она кроз одговарајући ^1H NMR синглет мањег интензитета на 10,92 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ15), односно ^{13}C NMR синглет на 155,75 ppm за *O*-супституисани sp^2 хибридовани угљеник пиридинског прстена (Додатни материјал III: Слика ДМ16). Са друге стране, карбонилна група на положају С2 констатована је као ^{13}C NMR синглет на 160,50 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ16) те у виду ^{17}O NMR синглета на 306,00 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ18). Атоми угљеничног скелета пиридинског прстена пронашени су на очекиваним хемијским померањима унутар ^1H NMR и ^{13}C NMR спектра (Додатни материјал III: Сlike ДМ15 и ДМ16).

Промена положаја хидроксилне групе на С3 на С4 у прстену 4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1*H*)-она (**СВЕ-RR2**) била је у сагласности и са променом хемијског померања на коме је регистрована иста, ^1H NMR синглет мањег интензитета на 5,84 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ19). Такође, обзиром да је разматрана функционална група супституент sp^3 хибридованог угљеника дихидропиридинског прстена, чворни угљеник препознат је као ^1H NMR синглет на 4,58 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ19), односно као ^{13}C NMR синглет на 66,93 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ20). Очекивано, карбонилна група на положају С2 дихидропиридина виђена је као ^{13}C NMR синглет на 169,72 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ20), односно те ^{17}O NMR синглетом на 371,00 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ22). Разлог хемијског померања карбонила свакако је и постојање С3=С4 двоструке везе са емисијом ^1H NMR синглета на 6,66 и 5,26 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ19), односно ^{13}C NMR синглета на 128,34 и 111,52 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ20).

Дубља анализа снимљених спектра указала је и на јасне разлике у сигнаlima за алкиловане и неалкиловане атоме азота: унутар једињења **СВЕ-RR3** и **СВЕ-RR4**: несупституисани секундарни атоми азота 5-фенил-2,5-дихидро-1*H*-тетразола и 2-(2,5-

Резултати и дискусија

дихидро-1*H*-тетразол-5-ил)сирћетне киселине, респективно, идентификовани су као ^1H NMR синглети на 5,71 и 7,63 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ23 и ДМ27), те као ^{15}N NMR мултиплети на -29,60 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ25 и ДМ29). Други атом азота који је препознат унутар поменутог мултиплета био је имин конституент $\text{N}=\text{N}$ везе, суседан секундарном амину. Постојање четвртог атома азота, односно другог чиниоца $\text{N}=\text{N}$ потврђено је на основу ^1H NMR синглета приписаног - $\text{CH}-\text{N}=\text{N}$ - фрагменту на 4,96 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ23). Коначно, фенил остатак 5-фенил-2,5-дихидро-1*H*-тетразола (**СВЕ-RR3**) емитовао је на очекиваним ^1H NMR и ^{13}C NMR хемијским померањима (Додатни материјал III: Сlike ДМ23 и ДМ24). Са друге стране, - $\text{CH}-\text{N}=\text{N}$ - фрагмент једињења **СВЕ-RR4** емитовао је као ^1H NMR синглет на 4,61 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ27), док је метиленска група као мост између тетразола и остатка карбоксилне групе била евидентна као ^1H NMR синглет ниског интензитета на 2,86 ppm, односно као ^{13}C NMR синглет на 36,59 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ28). Наравно, карбоксилна група одашиљала је карактеристичне сигнале: ^1H NMR синглет и ^{17}O NMR мултиплет на 10,35 и 253,80 ppm, респективно, приписани су хидроксилној групи (Додатни материјал III: Сlike ДМ27 и ДМ30), док су ^{13}C NMR синглет и ^{17}O NMR мултиплет на 170,48 и 253,80 ppm, респективно, приписани карбонилној групи (Додатни материјал III: Сlike ДМ28 и ДМ30).

Сасвим очекивано, хемијска померања карбоксилне групе унутар 1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилне киселине као функционалне групе једињења **СВЕ-RR4** разликовала су се од оних за **СВЕ-RR5**. Тако је поменута функција окарактерисана потпуним одсуством сигнала за хидроксилну групу унутар ^1H NMR спектра, већ је њено присуство потврђено само оштрим ^{17}O NMR синглетом на 253,90 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ34). Са друге стране, карбонилна група констатована је на основу ^{13}C NMR синглета на 168,78 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ32) те ^{17}O NMR синглета на 373,20 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ34). Оксидовани тетрахиdropиридински прстен емитовао је на очекиваним хемијским померањима унутар ^1H NMR и ^{13}C NMR спектра (Додатни материјал III: Сlike ДМ31 и ДМ32).

Имплементација карбониле групе на положај 6 (**СВЕ-RR6**) претходно описаног фармакофорног мотива изненађујуће је довела до појаве ^1H NMR синглета за хидроксилну групу унутар карбоксилног остатка на 13,02 ppm (Додатни материјал III:

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Слика ДМ35), док је сам 6-оксо фрагмент описан кроз ^{13}C NMR синглет на 159,80 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ36) и ^{17}O NMR синглет на 306,00 ppm (Додатни материјал III: Слика ДМ38).

Купловање **СВЕ-RR1, СВЕ-RR2, СВЕ-RR3, СВЕ-RR4, СВЕ-RR5** и **СВЕ-RR6** са 1-(1,4-дихидроксинафтален-2-ил)етеноном било је очигледно након промене хемијског померања сигнала приписаних метиленским групама директно провезаним са атомима хлора ка вишем пољу унутар одговарајућих ^1H NMR спектра (мултиплети на 4,08, 4,17, 4,03, 4,12, 4,10 и 4,22 ppm за **СВЕ-R1, СВЕ-R2, СВЕ-R3, СВЕ-R4, СВЕ-R5** и **СВЕ-R6**, Додатни материјал III: Сlike ДМ39, ДМ43, ДМ47, ДМ51, ДМ55 и ДМ59, респективно) и ^{13}C NMR спектра (синглети на 68,36, 68,36, 65,61, 65,71, 69,24 и 67,89 ppm за **СВЕ-R1, СВЕ-R2, СВЕ-R3, СВЕ-R4, СВЕ-R5** и **СВЕ-R6**, Додатни материјал III: Сlike Сlike ДМ40, ДМ44, ДМ48, ДМ52, ДМ56 и ДМ60, респективно). Алкиловање одговарајуће хидроксилне групе 1-(1,4-дихидроксинафтален-2-ил)етеноном потврђено је и појавом ^{17}O NMR синглета на 78,00 ppm у спектрима свих кондензата (Додатни материјал III: Сlike ДМ42, ДМ46, ДМ50, ДМ54, ДМ58, ДМ62, респективно), док је присуство слободне *p*-хидроксилне групе 1-(1,4-дихидроксинафтален-2-ил)етенона потврђено ^1H NMR синглетима на 4,84, 5,76, 4,53, 5,33, 5,81 и 9,67 ppm (Додатни материјал III: Додатни материјал III: Сlike ДМ39, ДМ43, ДМ47, ДМ51, ДМ55 и ДМ59, респективно), односно ^{17}O NMR синглетима на 95,00 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ42, ДМ46, ДМ50, ДМ54, ДМ58 и ДМ62, респективно). Слободни ацетил фрагмент као фармакофорни мотив 1-(1,4-дихидроксинафтален-2-ил)етенона препознат је на основу ^1H NMR мултиплета за метил групу на 2,51, 2,57, 2,52, 2,59, 2,57 и 2,41 ppm (Додатни материјал III: Додатни материјал III: Сlike ДМ39, ДМ43, ДМ47, ДМ51, ДМ55 и ДМ59, респективно), те ^{13}C NMR синглета на 28,28 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ40, ДМ44, ДМ48, ДМ52, ДМ56 и ДМ60, респективно), којима су се метил групе једињења разликовале од метил група растварача, односно ^{13}C NMR и ^{17}O NMR синглета за карбонил групу на 201,33 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ40, ДМ44, ДМ48, ДМ52, ДМ56 и ДМ60, респективно) и 488,00 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ42, ДМ46, ДМ50, ДМ54, ДМ58 и ДМ62, респективно). Ароматична конструкција 1-(1,4-дихидроксинафтален-2-ил)етенона препозната је на основу карактеристичних сигнала унутар ^1H NMR (Додатни материјал III: Додатни материјал III: Сlike ДМ39, ДМ43, ДМ47, ДМ51,

Резултати и дискусија

ДМ55 и ДМ59, респективно) и ^{13}C NMR спектара (Додатни материјал III: Сlike ДМ40, ДМ44, ДМ48, ДМ52, ДМ56 и ДМ60, респективно).

Надаље, кондензација **СВЕ-R1**, **СВЕ-R2**, **СВЕ-R3**, **СВЕ-R4**, **СВЕ-R5** и **СВЕ-R6** са 3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-оном потврђена је потпуним одсуством *p*-хидроксилне групе 1-(1,4-дихидрокси-нафтален-2-ил)етенона те формирањем C-N везе у структури **Pro-СВЕ-1**, **Pro-СВЕ-2**, **Pro-СВЕ-3**, **Pro-СВЕ-4**, **Pro-СВЕ-5** и **Pro-СВЕ-R6**, препознате помоћу ^{13}C NMR синглета на 131,78 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ64, ДМ68, ДМ72, ДМ76, ДМ80 и ДМ84, респективно), односно ^{15}N NMR синглета на 249,90 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ65, ДМ69, ДМ73, ДМ77, ДМ81 и ДМ85, респективно). Метил групама заштићени хидроксилни остаци на положајима C3 и C9 3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-она препознати су на основу ^1H NMR мултиплета на 3,80, 3,78, 3,80, 3,80, 3,73 и 3,80 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ63, ДМ65, ДМ71, ДМ75, ДМ79 и ДМ83, респективно), те на основу ^{13}C NMR мултиплета на 65,04 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ64, ДМ68, ДМ72, ДМ76, ДМ80 и ДМ84, респективно). Ароматични остаци и хетероциклуси унутар 3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-оном пронађени су на очекиваним хемијским померањима, док је лактонски систем кумарина нотиран карбонилном групом (^{13}C NMR синглет на 161,84 ppm, Додатни материјал III: Сlike ДМ64, ДМ68, ДМ72, ДМ76, ДМ80 и ДМ84, респективно, ^{17}O NMR синглет на 334,00 ppm, Додатни материјал III: Сlike ДМ66, ДМ70, ДМ74, ДМ78, ДМ82 и ДМ86, респективно) и лактонским кисеоником (^{17}O NMR синглет на 172,00 ppm, Додатни материјал III: Сlike ДМ66, ДМ70, ДМ74, ДМ78, ДМ82 и ДМ86, респективно).

Деметиловање хидроксилних група на положајима C3 и C9 3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-она једињења **Pro-СВЕ-1**, **Pro-СВЕ-2**, **Pro-СВЕ-3**, **Pro-СВЕ-4**, **Pro-СВЕ-5** и **Pro-СВЕ-R6** резултовало је синтезом циљаних деривата **СВЕ-1**, **СВЕ-2**, **СВЕ-3**, **СВЕ-4**, **СВЕ-5** и **СВЕ-R6**. Тако, слободна хидроксилна група на положају C3 уочена је као ^1H NMR синглет на хемијском померању од 5,32, 5,27, 5,36, 7,95 и 5,36 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ87, ДМ91, ДМ95, ДМ99, ДМ103 и ДМ107, респективно), односно као ^{17}O NMR синглет на 93,30 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ90, ДМ94, ДМ98, ДМ102, ДМ106 и ДМ110, респективно), док је одговарајућа хидроксилна група на положају C9 нотирана као ^1H NMR синглет на хемијском померању од 10,07, 9,56, 5,00, 5,07 и 5,07 (Додатни материјал III: Сlike ДМ87, ДМ91, ДМ95, ДМ99, ДМ103 и ДМ107, респективно), те као

Докторска дисертација Незрине Куртановић

^{17}O NMR синглет на 88,00 ppm (Додатни материјал III: Сlike ДМ90, ДМ94, ДМ98, ДМ102, ДМ106 и ДМ110, респективно).

Антагонистичке активности синтетисаних једињења СВЕ-1 до СВЕ-6, релативни афинитети везивања према $\text{ER}\alpha$ и $\text{ER}\beta$ и анализа биоактивних конформација

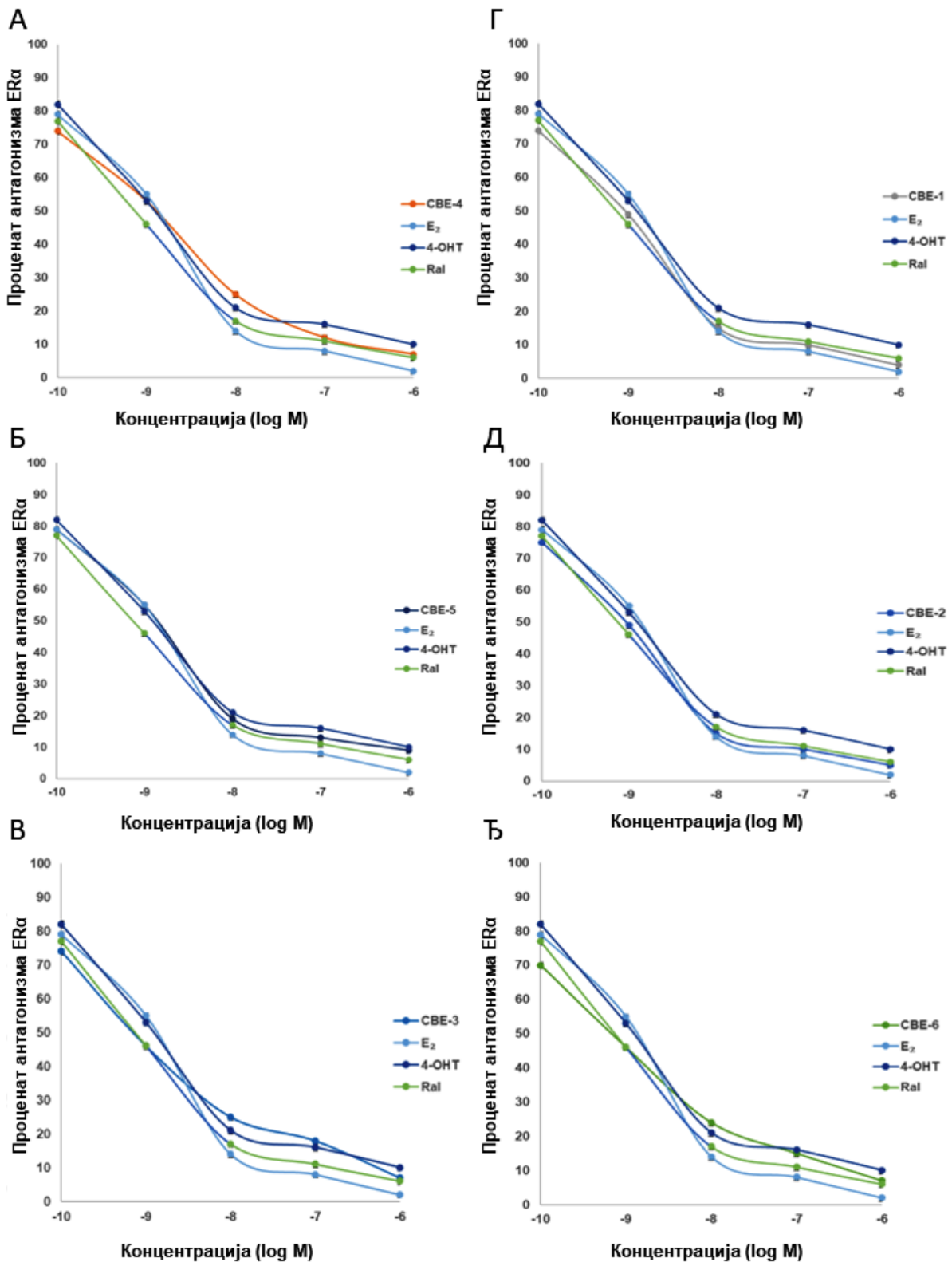
Вредности антагонистичке активности (односно IC_{50} вредности) новосинтетисаних једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6**, заједно са њиховим RBA и константама антагонизма, одређене су у односу на $\text{ER}\alpha$ или $\text{ER}\beta$ (Слика 3.27, Табела 3.22, Додатни материјал II: Сlike ДМ117).

Експериментално одређене IC_{50} вредности за једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** у односу на $\text{ER}\alpha$ биле у високој корелацији са предвиђеним помоћу Ru-CoMFA и COMBINEr 3-D QSAR модела: SB AAEP вредност Ru-CoMFA 3-D QSAR била је свега 0,13 IC_{50} јединица, док је одговарајућа LB AAEP била 0,41 IC_{50} јединица; SB AAEP вредност COMBINEr 3-D QSAR модела износила је свега 0,21 IC_{50} јединицу, док LB AAEP била 0,36 IC_{50} јединица. Најниже AEP одређене су за једињења **СВЕ-4** и **СВЕ-5** (0,23/0,32 и 0,12/0,02, односно 0,02 и 0,07 IC_{50} јединица на SB/LB нивоу, респективно), за која је експериментално пронађено да су најактивнија водећа једињења у студији (видети даљу дискусију), чиме је потврђен висок ниво предиктивне способности генерисаних Ru-CoMFA и COMBINEr 3-D QSAR модела. Сва једињења била су активнији антагонисти $\text{ER}\alpha$ од **Ral**, са активношћу у μM опсегу.

Сасвим очекивано, биоактивне конформације свих дизајнираних једињења биле су последица позиционирања језгра 3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-она, које је било упоредиво са основним језгром **5AK2** [75]: унутар најбољих докованих конформација, C3-OH група 3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-она формирала је водоничне везе са H3 Glu353 ($d_{\text{HВ}} = 2,642$ до $2,774 \text{ \AA}$) и H6 Arg394 ($d_{\text{HВ}} = 2,841$ до $2,934 \text{ \AA}$), карбонилна група лактонског прстена остварила је електростатичке интеракције са H6 Met388 , док је C9-OH основног језгра такође успоставила водоничну везу са H11 His524 ($d_{\text{HВ}} = 2,645$ до $2,717 \text{ \AA}$).

Суперпонирање основних језгара једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** резултовало је генерално конзервираним биоактивним конформацијама самих једињења, где је разлика у биоактивности била последица просторних конформација хетероцикличних функционалих група са способношћу да испровоцирају индуковано прилагођавање H12 ка отвореној конформацији.

Резултати и дискусија



Слика 3.27. Антагонизам естроген рецептора α у присуству **СВЕ-4** (А); **СВЕ-5** (Б); **СВЕ-3** (В); **СВЕ-1** (Г); **СВЕ-2** (Д); **СВЕ-6** (Ђ).

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 3.22. Антагонистичке активности синтетисаних једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-12**, релативни афинитети везивања према ER α и ER β , и одговарајуће антагонистичке константе.

Јед.	ER α ^a (IC ₅₀ nM)	ER β ^b (IC ₅₀ nM)	logRBA ^B ER α	logRBA ^Г ER β	K _a ER α ^d (nM)	K _a ER β ^h (nM)
СВЕ-1	0,23±0,11 ^{e†,‡,§}	204,32±0,32 ^{†,‡,§}	2,59	-0,36	0,05 ^{†,‡,§}	114,79 ^{†,‡,§}
СВЕ-2	0,31±0,14 ^{†,‡,§}	213,32±0,33 ^{†,‡,§}	2,46	-0,38	0,07 ^{†,‡,§}	119,84 ^{†,‡,§}
СВЕ-3	0,19±0,09 ^{†,‡,§}	198,32±0,32 ^{†,‡,§}	2,67	-0,35	0,04 ^{†,‡,§}	111,42 ^{†,‡,§}
СВЕ-4	0,11±0,04 ^{†,‡,§}	224,43±0,32 ^{†,‡,§}	2,91	-0,40	0,02 ^{†,‡,§}	126,08 ^{†,‡,§}
СВЕ-5	0,15±0,06 ^{†,‡,§}	186,32±0,32 ^{†,‡,§}	2,77	-0,32	0,03 ^{†,‡,§}	104,67 ^{†,‡,§}
СВЕ-6	0,36±0,22 ^{†,‡,§}	236,32±0,32 ^{†,‡,§}	2,39	-0,42	0,08 ^{†,‡,§}	132,76 ^{†,‡,§}
E₂[*]	0,89±0,27	0,89±0,27 ^{‡,§}	2,00	2,00 ^{‡,§}	0,20	0,50
4-ОНТ.³	1,12±0,06 [§]	3,61±0,64 [†]	1,90	1,39 [†]	0,25 [§]	2,03 [†]
Ral.^h	0,74±0,08 [‡]	74,30±0,42 [†]	2,08	0,08	0,17	41,24 [†]
Контрола^ј	НД ^к	НД	НД	НД	НД	НД

^aКонцентрација која антагонира 50% сигналне активности ER α ; ^bКонцентрација која антагонира 50% сигналне активности ER β ; ^BЛогаритамска вредност процента релативног афинитета везивања према ER α ; ^ГЛогаритамска вредност процента релативног афинитета везивања према ER β (^Bвредности и ^Гвредности релативног афинитета везивања (енг. relative binding affinity, RBA) израчунате су у односу на естрадиол са афинитетом од 100%, logRBA вредности веће од 0 указују на велики афинитет везивања, logRBA вредности између -2 и 0 указују на умерен интензитет везивања, logRBA вредности испод -2 указују на слаб интензитет везивања); ^дИзрачунате константе антагонизма (инхибиције) у односу на ER α ; ^hИзрачунате константе антагонизма (инхибиције) у односу на ER β ; ^eРезултати су представљени као средња вредност±стандардна девијација; ^{*}**17 β -естрадиол**; ³**4-хидрокситамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОНТ**); ^h**Ралоксифен** (енг. **Raloxifene, Ral**); ^јБез лиганда (0,9% NaCl). ^кНије доступно. [†]p < 0,05 у поређењу са контролном групом; [‡]p < 0,05 у поређењу са **4-ОНТ**; [§]p < 0,05 у поређењу са **Ral**.

Но, пре саме анализе доприноса хетероцикла, ваља поменути да је и супституција основног једра имала значајан утицај на биоактивност. Тако је анализа фармакодинамичког профила 1-(1,4-дихидрокси нафтален-2-ил)етанона као структурног сегмента једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** показала је да је антиципација фармакофорног доприноса истог била потпуно оправдана, те да се инкорпорација описаног фармакофорног мотива свакако може сматрати искорак у односу на рационални дизајн једињења унутар **3DQ** серије и тријумфом рационалног дизајна на нивоу водећих једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6**. Наиме, супституцијом примарног амина 3,9-диметоксихромено[4,3-*b*]индол-6(11*H*)-она поменути фрагмент постигнуто је да *o*-Ac група 1-(1,4-дихидрокси нафтален-2-ил)етанона формира водоничне везе са хидроксилом групом бочног ланца Н3 Thr347 ($d_{\text{HВ}}$ = 2,841 до 2,913 Å), помоћу карбонилног остатка ацетил групе, односно еклипсне стерне интеракције са метил групом бочног ланца Н3 Thr347, преко метил групе ацетата, олакшавајући тако

Резултати и дискусија

формирање хидрофобне мреже Н3 Thr347-Н11 Leu525-Н12 Leu536, те неопходну дислокацију Н12. Инкорпорација *o*-Ac групе као фрагмента, односно активирање Н3 Leu346 и Н3 Thr347 свакако је значајно унапређење фармакологије деривата **СВЕ-1** до **СВЕ-6** у односу на **3DQ** серију и резултовало је генералним повећањем биолошке активности једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6**. Додатни структурни фактор који је повећао активност једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** био је интеракција другог ароматичног остатка 1-(1,4-дихидрокси нафтален-2-ил)етанона, као својеврсне екстензије **Ph**, са Н6 Trp383 и Н11 Leu525, а све као последица додатног стерног притиска на Н6 Trp383 и Н11 Leu525. Надаље, имплементација *p*-O-CH₂-CH₂- моста као носиоца хетероцикличних функционалих група једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6**, очекивано је резултовала електростатичким интеракцијама између чворног атома кисеоника и хидроксилне групе бочног ланца Н3 Thr347, односно стерним интеракцијама између метиленских угљеника и изобутил групе Н12 Leu536. На крају, детаљна анализа биоизостерних ефеката хетероциклуса **СВЕ-1** до **СВЕ-6** довела је до диференцирања једињења сходно биоактивности.

У сагласности са предикцијом Py-CoMFA/Pu-ComBinE модела, најактивнији антагонист ER α био је **СВЕ-4** (Слика 3.27А, Табела 3.22, Слика 3.28А), са активношћу 6,73 пута већом од **Ral**. Просторно поравнање остатка 2-(2,5-дихидро-1*H*-тетразол-5-ил)сирћетне киселине указало је на то да је **СВЕ-4** антагонист ER α са SERM фармакологијом, обзиром на чињеницу да је хетероциклично језгро овог биоизостера било позиционирано паралелно са пиридинским језгром **Ral**, те да је секундарни амин био донор водоничне везе за Н3 Asp351 ($d_{\text{HВ}} = 3,393 \text{ \AA}$), истовремено вршећи стерни притисак на изобутил групу Н12 Leu536. Секундарни амини тетразола електростатички су привукли Н3 Asp351 ка фармакофорном мотиву и допринели генералној стабилизацији биоактивне конформације **СВЕ-4**. Последично, дошло је до формирања додатне водоничне везе између хидроксилне групе унутар карбоксилне функције сирћетне киселине и Н3 Asp351 ($d_{\text{HВ}} = 3,135 \text{ \AA}$), чиме је активност **СВЕ-4** подигнута на највиши ниво. Описане интеракције резултовале су индукованим прилагођавањем Н12 ка отвореној конформацији.

Незнатно мање активан, за само 0,05 nM, био је антагонист **СВЕ-5** (Слика 3.27Б, Табела 3.22, Слика 3.28Б, активност 4,625 пута већа од **Ral**-а), између осталог и захваљујући доприносу 1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилне киселине као хетероцикличног фармакофорног мотива. Наиме, иако је у целости био просторно дислоциран у односу на 2-(2,5-дихидро-1*H*-тетразол-5-ил)сирћетну киселину, описани

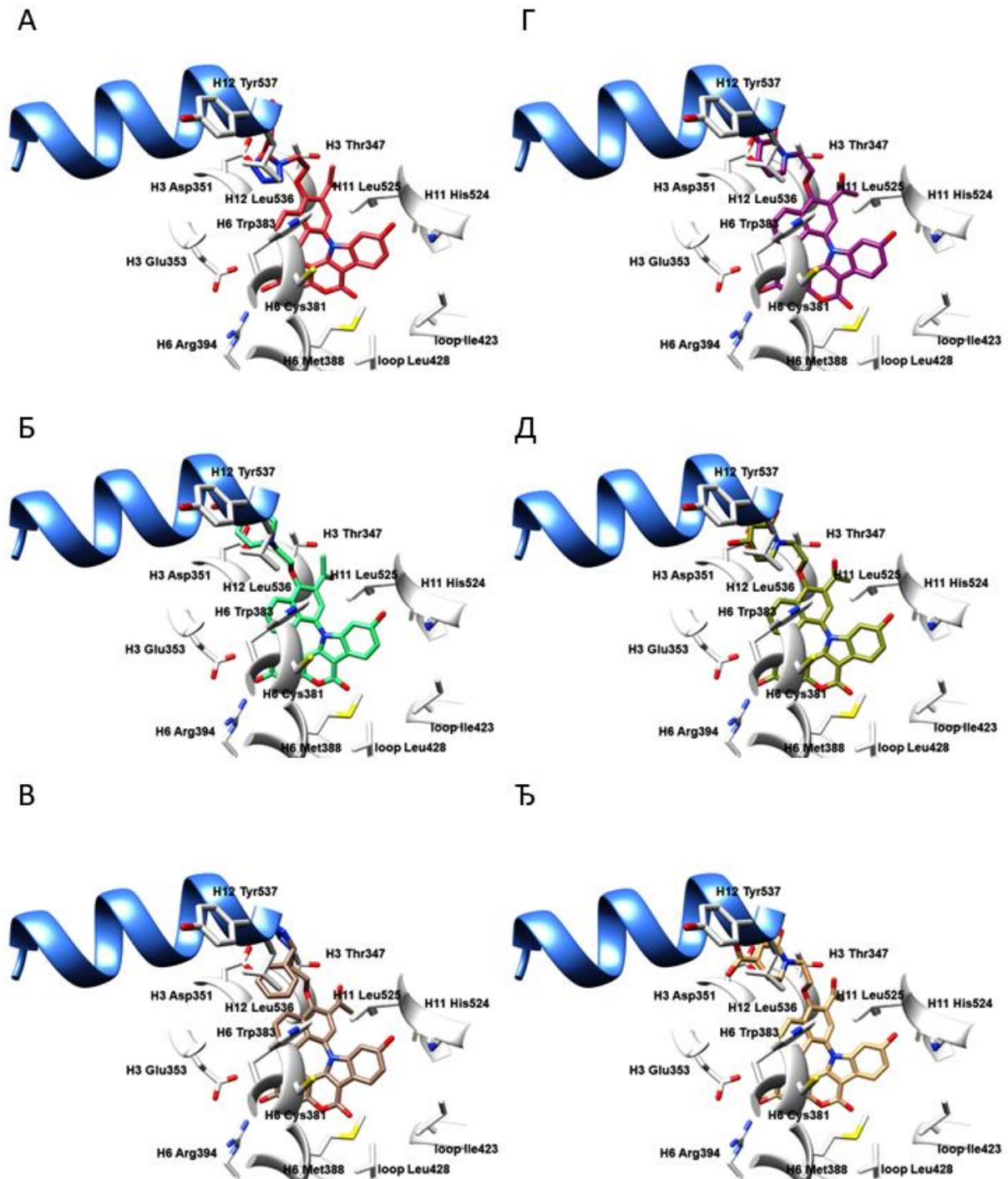
Докторска дисертација Незрине Куртановић

биоизостер поставио се паралелно у односу на карбоксилну групу бочног низа Н3 Asp351 захваљујући стерним интеракцијама са изобутил групом Н12 Leu536, градећи јаку водоничну везу са аминокиселинским остатком ($d_{\text{НВ}} = 2,076 \text{ \AA}$) помоћу хидроксилне групе унутар С4-карбоксилата као донора. Чини се да је лимитирање атома азота унутар пиридинског језгра на електростатичке интеракције са Н3 Asp351 допринело незнатно мањој активности **СВЕ-5** и односу на **СВЕ-4**. Ипак, услед индукованог прилагођавања Н12 ка отвореној конформацији, **СВЕ-5** је такође испољило SERM фармакологију.

Супституција карбоксилне групе изразито хидрофобним ароматичним језгром (**СВЕ-3**, Слика 3.27В, Табела 3.22, Слика 3.28В, антагонист 1,64 пута моћнији од **Ral**) била је бенефитна у смислу активности али је ипак довела до незнатног смањења биопотенцијала (0,03 nM мања IC₅₀ вредност у односу на **СВЕ-5**). Наиме, инкорпорација 5-фенил-2,5-дихидро-1*H*-тетразола унутар R3 ER α оријентисала је **С5-Ph** порцију ка екслипсним хидрофобним интеракцијама са изобутил групом Н12 Leu536, односно хидрофобним интеракцијама Т-облика са индолским језгром Н6 Trp383. Описано поравнање **С5-Ph** позитивно се одразило на интеракцију дихидро-1*H*-тетразола са Н3 Asp351 чији је секундарни амин на позицији N2 наградио јаку водоничну везу са Н3 Asp351 ($d_{\text{НВ}} = 2,510 \text{ \AA}$) и сходно томе допринео испољавању SERM фармакологије једињења **СВЕ-3**.

СВЕ-1 (Слика 3.27Г, Табела 3.22, Слика 3.28Г, антагонист 3,22 пута моћнији од **Ral**), **СВЕ-2** (Слика 3.27Д, Табела 3.22, Слика 3.28Д, антагонист 2,39 пута моћнији од **Ral**) и **СВЕ-6** (Слика 3.27Ђ, Табела 3.22, Слика 3.28Ђ, антагонист 1,61 пута моћнији од **Ral**) показала су различити афинитет према антагонирању ER α са трендом опадања активности, све као последица различитости биоизостера у виду 3-хидроксипиридин-2(1*H*)-она, 4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1*H*)-она и 6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилне киселине који су индуковали прилагођавање Н12 ка отвореној конформацији. Тако, биопотенцијал **СВЕ-1** свакако треба бити приписан и интеракцијама хидроксилне групе на положају С3 3-хидроксипиридин-2(1*H*)-она са Н3 Asp351 ($d_{\text{НВ}} = 3,259 \text{ \AA}$), где је формирана водонична веза допринела испољавању SERM фармакологије једињења. Описана интеракција била је последица поравнања самог хетероцикла таквог да је просторни распоред био сличан пиридинском језгру **Ral**. Наравно, карбонилна група на положају С2 3-хидроксипиридин-2(1*H*)-она допринела је електростатичким привлачењем са Н3 Asp351

Резултати и дискусија



Слика 3.28. Биоактивне конформације **СВЕ-4** (А); **СВЕ-5** (Б); **СВЕ-3** (В); **СВЕ-1** (Г); **СВЕ-2** (Д); **СВЕ-6** (Ђ) унутар активног центра ER α . Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Са друге стране, миграција хидроксилене групе са положаја C2 3-хидрокси-2(1H)-пиридин-4-карбоксилне **СВЕ-1** на положај C4 4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1H)-она **СВЕ-2**, или положај C4 6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилне

Докторска дисертација Незрине Куртановић

киселине **СВЕ-6**, имала је за последицу пад у активности **СВЕ-2** и **СВЕ-6** за 0,09 и 0,13 nM у односу са **СВЕ-1**, респективно, обзиром на чињеницу да су C4-OH групе унутар разматраних хетероциклуса биле лимитирана на електростатичке интеракције са H3 Asp351. Остале функционалне групе унутар 4-хидрокси-3,4-дихидропиридин-2(1H)-она и 6-оксо-1,2,3,6-тетрахидропиридин-4-карбоксилне киселине имале су сличан фармакофорни допринос на активност оном код 3-хидроксипиридин-2(1H)-она.

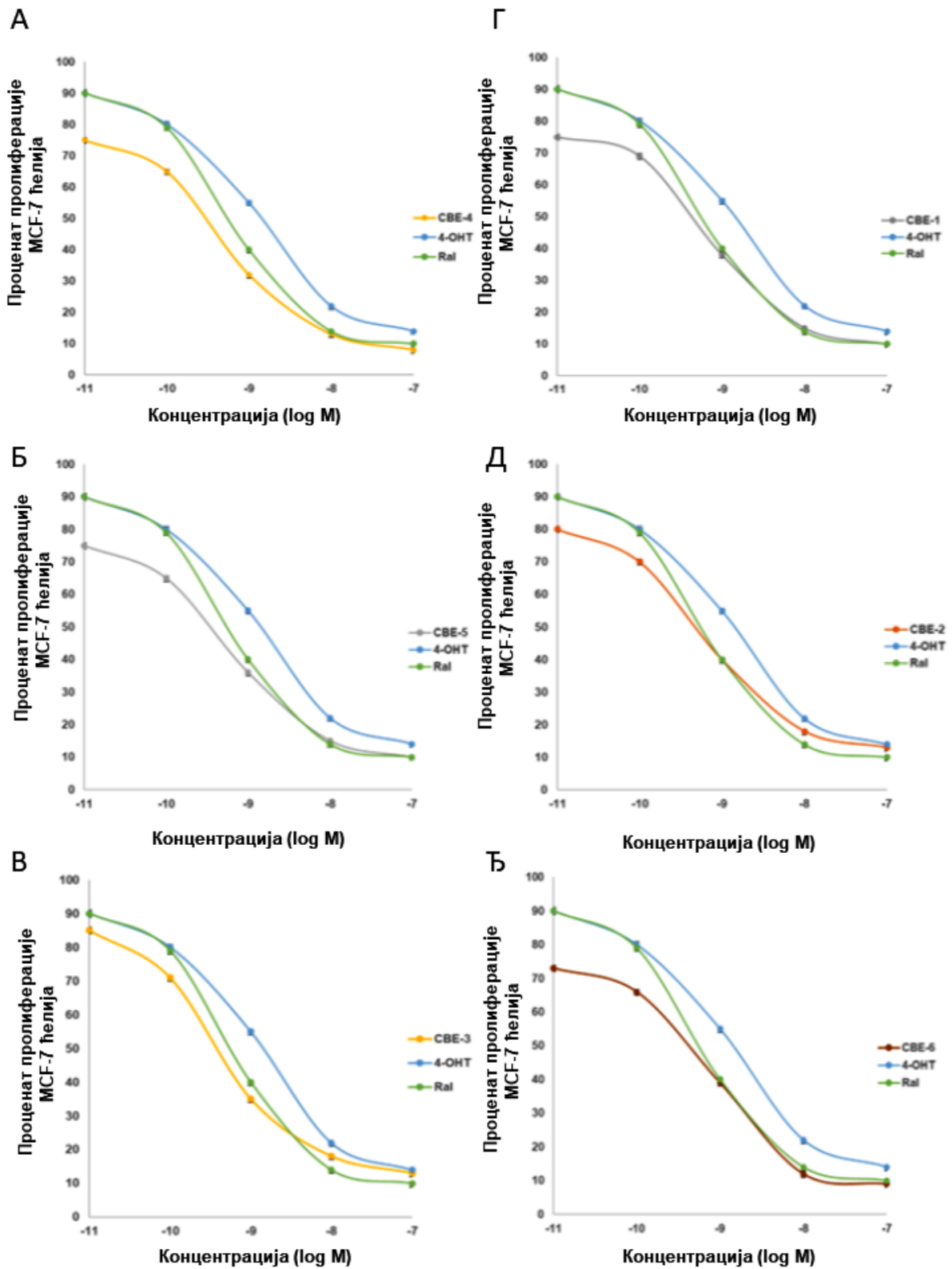
Антипролиферативна активност синтетисаних једињења СВЕ-1 до СВЕ-6 против ER α (+)- и ER α (-)-зависних ћелијских линија рака дојке

Даља евалуација једињења била је у смислу утврђивања њихове антипролиферативне активности против ER α (+) MCF-7 (Слика 3.29, Табела 3.23), односно ER α (-) MDA-MB-231 (Додатни материјал II: Слика ДМ118, Табела 3.23) ћелијских линија. Наравно, сходно доброј пракси, SERM фармакологија једињења индиректно је потврђена одсуством разградње ER α на нивоу MCF-7 ћелија (Табела 3.23), чиме агенси нису потврђени као SERDs. Такође, одсуство индукције PR потврдило је да једињења нису антагонисти овог рецептора.

У корелацији са активношћу у односу на ER α , једињење **СВЕ-4** (Слика 3.29А, Табела 3.23) било је најактивнији антипролиферативни агенс у односу на MCF-7 ћелијску линију, са IC₅₀ вредношћу од 170 pM, вредношћу 5,23 пута нижом од антипролиферативне активности **Ral**. Високу активност једињења пратио је и најбољи SI од 837,29 у односу на ER α (-) ћелијске линије. Незнатно слабији антипролиферативни агенси били су **СВЕ-5** (Слика 3.29Б, Табела 3.23) и **СВЕ-3** (Слика 3.29В, Табела 3.23) са биопотенцијалом од 240 и 260 pM против MCF-7 ћелијским линијама, односно вредностима 3,71 пута и 3,43 нижим од **Ral**. Без обзира на мању активност у односу на **СВЕ-4**, једињења **СВЕ-5** и **СВЕ-3** окарактерисана су сјајним SI у односу на MDA-MB-231 ћелијске линије од 559,67 и 529,69, респективно.

Дијада **СВЕ-1** (Слика 3.29Г, Табела 3.23, активност 2,87 пута већа од **Ral**) и **СВЕ-2** (Слика 3.29Д, Табела 3.23, активност 2,62 пута већа од **Ral**) инхибирала је раст MCF-7 ћелијских линија у интервалу 310 до 340 pM, са SI од 433,29 и 389,18, респективно. Антиканцерогени агенс који се свакако не може сматрати инактивним, али са ипак најмањом активношћу био је **СВЕ-6** (Слика 3.29Ђ, Табела 3.23). Са испољеном активношћу од 410 pM у односу на MCF-7 ћелијске линија и SI од 298,34, једињење је било 2,17 пута активније од **Ral**.

Резултати и дискусија



Слика 3.29. Антипролиферативна активност **СВЕ-4** (А); **СВЕ-5** (Б); **СВЕ-3** (В); **СВЕ-1** (Г); **СВЕ-2** (Д); **СВЕ-6** (Ђ) у односу на МСФ-7 ћелијске линије.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 3.23. Антипролиферативна активност синтетисаних деривата **СВЕ-1** до **СВЕ-6** и индекс селективности у односу на хормон-зависне MCF-7 ћелијске линије канцера дојке и хормон-независне MDA-MB-231 ћелијске линије канцера дојке, антипролиферативна активност у односу на нормалне MRC-5 ћелијске линије хуманих фибробласта плућа, супресија одговора ER α на хормонски стимулус унутар MCF-7 ћелијских линија, односно антагонизам у односу на PR унутар MCF-7 ћелијских линија, као и антиканцерогена активност против Ishikawa ћелијских линија ендометријалног аденокарцинома.

Јед.	MCF-7 ^a (IC ₅₀ nM)	MDA-MB-231 ^b (IC ₅₀ nM)	SI ^B	MRC-5 ^r (IC ₅₀ nM)	MCF-7 DR ^A (IC ₅₀ nM)	PR MCF-7 ^b (IC ₅₀ nM)	Ishikawa ^c (IC ₅₀ nM)
СВЕ-1	0,31±0,08 ^{ж,‡,§}	134,32±0,71 ^{‡,§}	433,29 [‡]	>100	>100	>100	0,44±0,12 ^{‡,§}
СВЕ-2	0,34±0,17 ^{‡,§}	132,32±0,43 ^{‡,§}	389,18 [‡]	>100	>100	>100	0,47±0,22 ^{‡,§}
СВЕ-3	0,26±0,13 ^{‡,§}	137,72±0,43 ^{‡,§}	529,69 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,38±0,21 ^{‡,§}
СВЕ-4	0,17±0,04 ^{‡,§}	142,34±0,34 [§]	837,29 ^{‡,§}	>100	>100	>100	0,32±0,13 ^{‡,§}
СВЕ-5	0,24±0,09 ^{‡,§}	134,32±0,65 ^{‡,§}	559,67	>100	>100	>100	0,38±0,21 ^{‡,§}
СВЕ-6	0,41±0,23 ^{‡,§}	122,32±0,43 ^{‡,§}	298,34 [‡]	>100	>100	>100	0,51±0,31 ^{‡,§}
E₂³	НД ⁿ	НД	НД	НД	НД	НД	НД
4-ОНТ.^m	1,20±0,34 [§]	36,76±0,46	30,63 [§]	>100	>100	>100	1,27±0,32 [§]
Ral.^j	0,89±0,05 [‡]	92,35±0,97 [‡]	103,76 [‡]	>100	>100	>100	0,94±0,32 [‡]
Контрола^k	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД

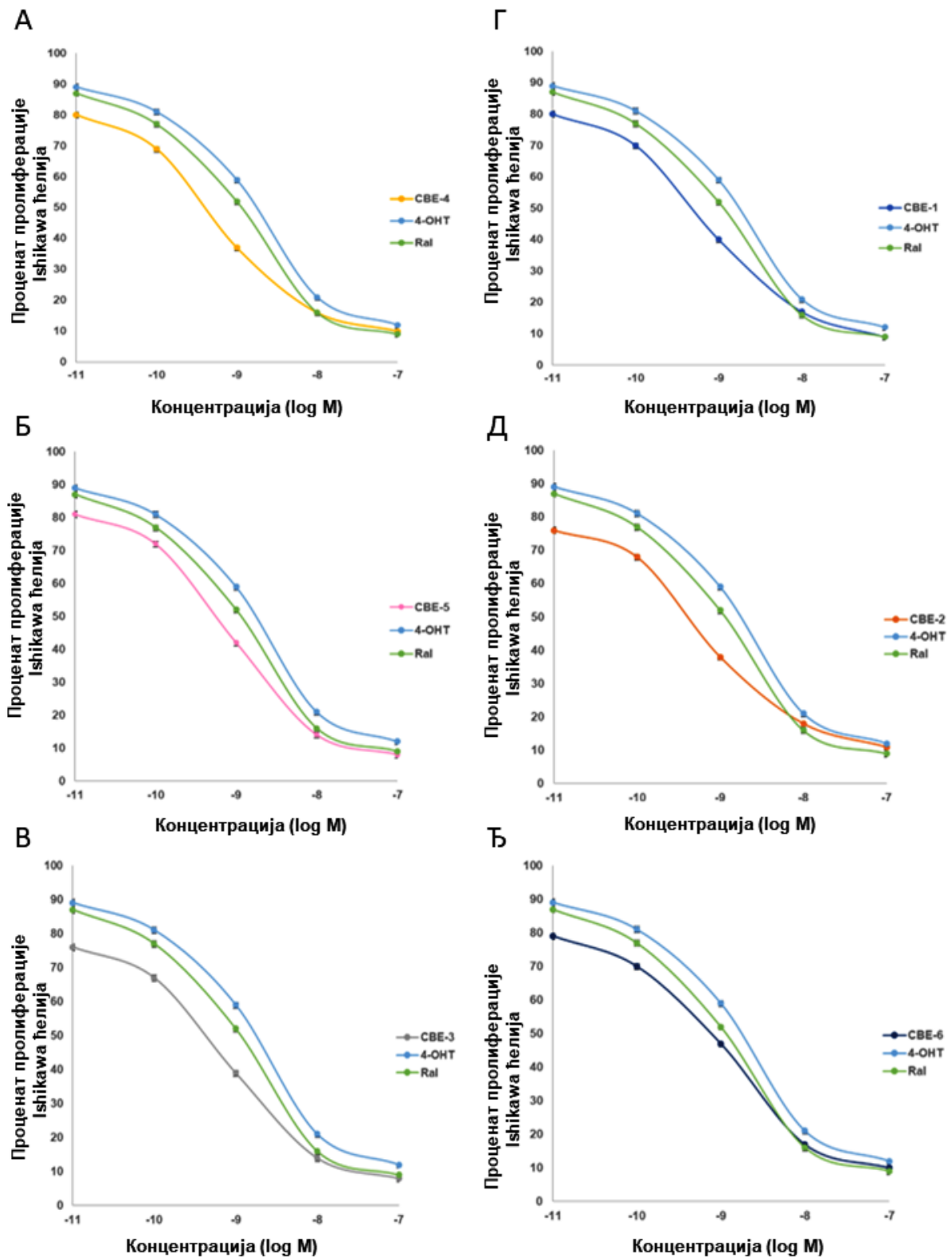
^aКонцентрација која спречава раст 50% MCF-7 ћелијских линија; ^bКонцентрација која спречава раст 50% MDA-MB-231 ћелијских линија; ^BИндекс селективности (енг. selectivity index, SI) према ћелијским линијама: [IC₅₀(MDA-MB-231)]/[IC₅₀(MCF-7)] зарад дефинисања антипролиферативног ефекта било дизајнираних једињења или референтних једињења; ^rКонцентрација која спречава раст 50% MRC-5 ћелијских линија (ћелијских линија хуманих фибробласта плућа, као позитивне контроле); ^AСупресија одговора ER α на хормонски стимулус мерена унутар MCF-7 ћелијских линија; ^bАнтагонизам прогестерон рецептора одређен је као биомаркер за антагонизам ER α унутар MCF-7 ћелијских линија; ^cКонцентрација која спречава раст 50% Ishikawa ћелијских линија; ^{*}Резултати су представљени као средња вредност±стандардна девијација; ³17 β -естрадиол; ^m4-хидрокси тамоксифен (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОНТ**); ^jРалоксифен (енг. **Raloxifene, Ral**); ^k0.9% NaCl; ⁿНије дефинисано. *p < 0,05 када се пореди са контролном групом; †p < 0,05 када се пореди са **E₂**; ‡p < 0,05 када се пореди са **4-ОНТ**; §p < 0,05 када се пореди са **Ral**.

Антипролиферативна активност синтетисаних једињења СВЕ-1 до СВЕ-6 против ER α (+)-зависних канцера ендометријума

Пратећи протокол евалуације нових антиканцерогених агенаса са SERM фармакологијом, једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** такође су администрирана на Ishikawa ћелијама ендометријалног аденокарцинома не би ли се одагнале све сумње у смислу неиспољавања агонистичке активности унутар ћелија (Слика 3.30, Табела 3.23). У том смислу се овде примењен протокол рационалног дизајна антагониста ER α поново показао оправданим јер су једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** сасвим очекивано показала

Резултати и дискусија

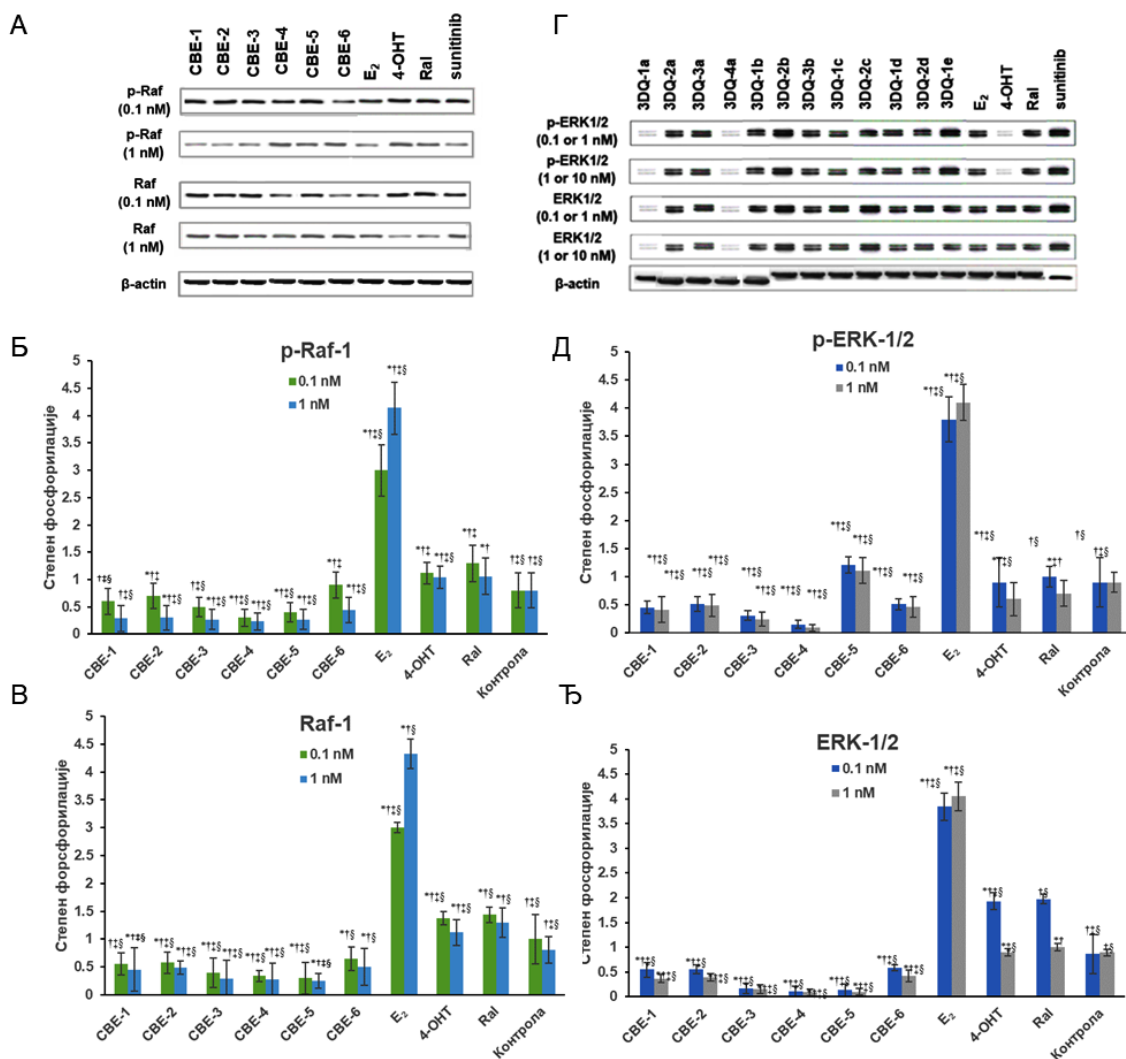
значајну антипролиферацију Ishikawa ћелијских линија уз добру активност против хиперплазије ендометријума, у исто време не индукујући ендометријални канцер.



Слика 3.30. Антипролиферативна активност СВЕ-4 (А); СВЕ-5 (Б); СВЕ-3 (В); СВЕ-1 (Г); СВЕ-2 (Д); СВЕ-6 (Ђ) у односу на Ishikawa ћелијске линије.

Утицај синтетисаних антагониста *ERα* **СВЕ-1** до **СВЕ-6** на процесе сигналне трансдукције унутар *MCF-7* ћелијских линија

Пратећи валидиране протоколе за елаборацију кумарина као антипролифератора *MCF-7* ћелијских линија, једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** подвргнута су студији утицаја на пост-транслаторну модификацију форфорилацијом протеина укључених у сигналну трансдукцију унутар *MCF-7* ћелијских линија (Слика 3.31).



Слика 3.31. Супресија одговора на стимулус Raf-1/ERK пута сигналне трансдукције унутар *MCF-7* ћелијских линија након администрације испитиваних антагониста *ERα* **СВЕ-1** до **СВЕ-6** кумаринског типа (*MCF-7* ћелије су третиране свим једињењима у концентрацији од 0,1 и 1 nM, покривајући тако опсег у коме су дефинисане IC₅₀ вредности) Експресије p-Raf-1 и Raf-1 (А), или p-ERK1/2 и ERK1/2 (Г) испитиване су Western blot техником унутар *MCF-7* ћелијских линија *MCF-7* ћелијама. Денситометријска анализа извршена је да би се утврдила стопа фосфорилације p-Raf-1 (Б), Raf-1 (В), p-ERK1/2 (Д) и ERK1/2 (Е). * p < 0,05 у поређењу са контролном групом; † p < 0,05 у поређењу са E₂; ‡ p < 0,05 у поређењу са 4-OHT; § p < 0,05 у поређењу са Ral.

Резултати и дискусија

Циљан је Raf-1/MAPK/ERK пут у сврху појачања ефекта анти-хормонске терапије и успоравања ендокрине резистенције, при чему су једињења администрирана у временском периоду од 24 сата у две концентрације које окружују IC₅₀ вредности против MCF-7 ћелија, 0,1 и 1 nM (Табела 3.23). Слично **3DQ** серији, пролиферација ћелија рака дојке подстакнута унакрсном комуникацијом између ER α и Raf-1/MAPK/ERK сигналне каскаде, била је ограничена након третмана са **СВЕ-1** до **СВЕ-6**.

Активација p-Raf-1 (Слике 3.31А и 3.31Б) и p-ERK1/2 (Слике 3.31Г и 3.31Д) била је значајно инхибирана свим једињењима у примењеним концентрацијама, док је експресија Raf-1 (Слике 3.31А и 3.31Б) и ERK1/2 (Слике 3.31Г и 3.31Ђ) остала на нивоу контроле. Најмању стопу фосфорилације унутар сваког од ефектора дозволило је једињење **СВЕ-4** (0,3 и 0,24 јединица против p-RAF-1, у нижој и вишој примењеној концентрацији, респективно, Слика 3.31Б, активност 4,33 до 4,32 већа у односу на **Ral**; 0,34 и 0,28 јединица против Raf-1, Слика 3.31В, активност 3,60 и 4,64 већа у односу на **Ral**; 0,18 и 0,12 јединица против p-ERK1/2, Слика 3.31Д, активност 8,33 и 7,78 већа у односу на **Ral**; 0,11 и 0,09 јединица против ERK1/2, Слика 3.31Ђ, активност 17,91 и 11,11 пута већа у односу на **Ral**) што је мање утицало на активацију MAPK пута (који се одвија као последица фосфорилације Raf-1) у односу на ћелијску апоптозу (исход ERK1 и ERK2 фосфорилације). Већи афинитет једињења **СВЕ-4** према индукцији апоптозе MCF-7 ћелијских линија одразио се на контролу ћелијског циклуса (видети даљу дискусију).

С друге стране, **СВЕ-5** инхибирао је фосфорилацију p-Raf-1 мање интензивно у односу на **СВЕ-4** (Слика 3.31Б, 0,6 и 0,41 јединица према p-Raf-1, Слика 3.31В, активност 3,25 до 2,59 пута већа у односу на **Ral**), али је испољио већи афинитет према фосфорилацији RAF-1 (Слика 3.31Б, 0,3 и 0,25 јединица према Raf-1, Слика 3.31В, активност 4,80 до 5,20 пута већа у односу на **Ral**); инхибиција протеин киназа ERK1 и ERK2 након администрације **СВЕ-5** (Слика 3.31Д и 3.31Ђ, 0,13 и 0,10 јединица према p-ERK1/2, Слика 3.31Д, активност 7,69 и 7,00 пута већа у односу на **Ral**; 0,14 и 0,10 јединица према ERK1/2, Слика 3.31Ђ, активност 14,07 и 10,00 пута већа у односу на **Ral**) била је упоредива са оном испољеном од стране **СВЕ-4**. Сличан афинитет показало је и једињење **СВЕ-3** (3,60 и 4,93 пута моћније у односу на **Ral** у смислу инхибиције p-Raf-1 сигнализације; 3,60 и 4,48 пута моћније у односу на **Ral** у смислу инхибиције Raf-1 сигнализације; 3,23 и 2,92 пута снажније у односу на **Ral** у погледу инхибиције p-ERK-1/2 сигнализације; 11,59 и 6,25 пута снажније у односу на **Ral** у

виду инхибиције ERK-1/2 сигнализације).

Са друге стране, **СВЕ-1** (2,17 и 3,66 пута јаче у односу на **Ral** у погледу инхибиције p-Raf-1 сигнализације; 2,57 и 2,36 пута јаче у односу на **Ral** у погледу инхибиције Raf-1 сигнализације; 2,22 и 1,71 пута снажније у односу на **Ral** у виду инхибиције p-ERK-1/2 сигнализације; 3,58 и 2,70 пута снажније у односу на **Ral** када се говори о инхибицији сигнализације ERK-1/2), **СВЕ-2** (1,86 и 3,53 пута снажније у односу на **Ral** у погледу инхибиције сигнализације p-Raf-1; 2,88 и 2,65 пута јаче у односу на **Ral** у вези са инхибицијом Raf-1 сигнализације; 1,96 и 1,43 пута снажније у односу на **Ral** у погледу инхибиције p-ERK-1/2 сигнализације; 3,58 и 2,56 пута снажније у односу на **Ral** у погледу инхибиције сигнализације ERK-1/2) и **СВЕ-6** (1,44 пута и 2,41 пута снажније у односу на **Ral** у погледу инхибиције сигнализације p-Raf-1; 2,22 и 2,60 пута јаче у односу на **Ral** у погледу инхибиције сигнализације Raf-1; 1,96 и 1,43 пута снажније у односу на **Ral** у вези са инхибицијом p-ERK-1/2 сигнализације; 3,34 и 2,38 пута снажније у односу на **Ral** у вези са инхибицијом ERK-1/2 сигнализације), могла су се свртати у кластер сходно свом афинитету према инхибицији фосфорилираних и нефосфорилираних протеина унутар Raf-1/MAPK/ERK сигналне трансдукције, задржавајући већи потенцијал у односу на **Ral**. Резултати су били у корелацији са антипролиферативном активношћу једињења против MCF-7 ћелија и њиховим утицајем на ћелијски циклус (видети даљу дискусију).

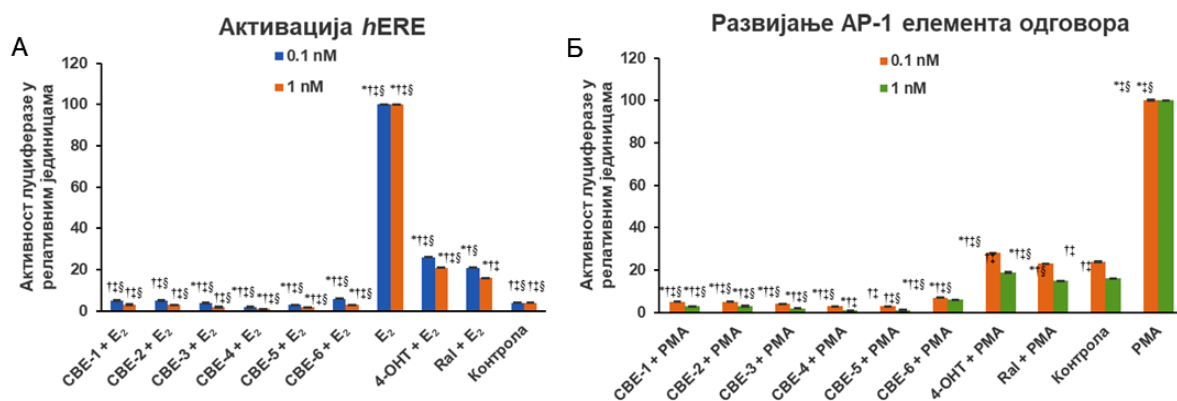
Утицај испитиваних антагониста ER α СВЕ-1 до СВЕ-6 на геномски директни и геномски индиректни пут унутар MCF-7 ћелија.

Након потврде инхибиције сигналне трансдукције, извршена је елаборација једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** на активности hERE или AP-1 као промотера унутар геномског директног или индиректног пута у MCF-7 ћелијама, респективно (Слике 3.32А и 3.32Б). У том смислу, есеји којима су процењене каталитичке активности луцифераза спроведени су на хуманим MCF-7 ћелијама трансфектованим ERE-TK-LUC или AP-1-LUC плазмидима, респективно, а који су садржали репортер гене луциферазе под ER α - односно AP-1-зависним промотерима, а затим ко-трансфектоване плазмидом β -галактозидазе.

Тако је администрација **СВЕ-4** у граничним концентрацијама утицала да луцифераза испољи активност од само 2 и 1 релативне јединице након интеракције са ERE-TK-LUC плазмидом, што је била активност 10,50 и 5,33 пута мања од активности

Резултати и дискусија

Ral, односно активност од само 3 и 1 релативне јединице у присуству AP-1-LUC плаزمида, што је било 7,67 и 15,00 пута мање него након администрације **Ral** (Слике 3.32А и 3.32Б), откривајући снажну тенденцију једињења да поништи E_2 -зависну транскрипцију гена.



Слика 3.32. (А) Антагонизам геномског директног пута развоја карцинома дојке са кумаринским антагонистима $ER\alpha$ **СВЕ-1** до **СВЕ-6** у окружењу MCF-7 ћелија које су трансфектоване ERE-TK-LUC плазмидом који садржи луциферазни репортер ген унутар хуманог елемента естрогенског одговора (*hERE*), и ко-трансфектоване плазмидом β -галактозидазе. MCF-7 ћелије третиране су концентрацијама од 0,1 и 1 nM за сва једињења. * $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; † $p < 0,05$ у поређењу са E_2 ; ‡ $p < 0,05$ у поређењу са 4-OHT + E_2 ; § $p < 0,05$ у поређењу са **Ral** + E_2 ; (Б) Антагонизам геномског индиректног пута развоја карцинома дојке кумаринским антагонистима $ER\alpha$ **СВЕ-1** до **СВЕ-6** у окружењу MCF-7 ћелија које су трансфектоване AP-1-LUC плазмидом који садржи луциферазни репортер ген унутар AP-1 елемента одговора и ко-трансфектоване плазмидом β -галактозидазе. Форбол 12-миристанат 13-ацетат (енг. phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) коришћен је као индуктор AP-1. MCF-7 ћелије третиране су концентрацијама од 0,1 и 1 nM за сва једињења. * $p < 0,05$ у поређењу са контролном групом; † $p < 0,05$ у поређењу са PMA; ‡ $p < 0,05$ у поређењу са 4-OHT + PMA; § $p < 0,05$ у поређењу са **Ral** + PMA.

Промотери *hERE* и AP-1 такође су искључени након администрације једињења **СВЕ-5** (3 и 2 релативне јединице активности луциферазе у окружењу ERE-TK-LUC, активност 7,00 и 8,00 пута мања у односу на ону након администрације **Ral**; 3 и 1 релативне јединице активности луциферазне у окружењу AP-1-LUC плазмида, 7,67 и 15,00 пута мање у односу на ону након администрације **Ral**, Слика 3.32А и 3.32Б) и **СВЕ-3** (4 и 2 релативне јединице активности луциферазе у окружењу ERE-TK-LUC плазмида, активност 5,25 и 8,00 пута мања у односу на ону након администрације **Ral**; 4 и 2 релативне јединице активности луциферазе у AP-1-LUC окружењу плазмида, активност 5,76 и 7,50 пута мања у односу на ону након администрације **Ral**, Слика 3.32А и 3.32Б). С друге стране, једињења **СВЕ-1**, **СВЕ-2** и **СВЕ-6** и даље су дозвољавала низан ниво каталитичке активности луциферазе у присуству оба плазмида

(5 до 6 и 4 релативне јединице активности луциферазе у окружењу ERE-TK-LUC плазида, активност 3,50 до 4,20 и 5,33 пута мања у односу на ону након администрације **Ral**; 5 до 7 и 3 до 6 релативних јединица активности луциферазе у окружењу AP-1-LUC плазида, активност 3,29 до 4,60 и 2,50 до 5,00 пута мања у односу на ону након администрације **Ral**, Слике 3.32А и 3.32Б). Сумирајући резултате може се закључити да су једињења **СВЕ-4**, **СВЕ-5**, **СВЕ-3**, **СВЕ-1**, **СВЕ-2** и **СВЕ-6** као антиканцерогени агенси део своје фармакологије испољили и спречавањем активирања промотера транскрипције на геномском директном и геномском индиректном путу.

Ефекти синтетисаних једињења СВЕ-1 до СВЕ-6 на цитотоксичност и ћелијски циклус MCF-7 ћелијских линија

Као и за **3DQ** серију, антипролиферативна активност једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** у односу на MCF-7 ћелијске линије, као и физиолошка активност на нивоу инхибиције Raf-1/MAPK/ERK сигналне трансдукције, односно блокаде транскрипције било на геномском директном или индиректном путу, указали су на неопходност дефинисања утицаја једињења на ћелијски циклус током апоптозе MCF-7 ћелија (Табела 3.24). Као једињења са SERM фармакологијом, једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** зауставили су раст MCF-7 ћелија у G₀/G₁ фази, прецизније између G₀ фазе (тј. фазе недељења, односно пост митозе) и фазе G₁ (тј. репликације DNA), без обзира на примењену концентрацију. Аналогно кумаринима унутар **3DQ** серије, администрација кумарина **СВЕ-1** до **СВЕ-6** узроковала је блокаду раста MCF-7 ћелија у иреверзибилном G₀ стању.

Сва једињења осим **СВЕ-6** узроковала су заустављање ћелијског раста у G₀/G₁ фази у више од 80% случајева, без обзира на примењену концентрацију. Међу њима, **СВЕ-4** блокирало је циклус MCF-7 ћелија у почетној фази између 84 и 87%, док су **СВЕ-5** и **СВЕ-3** испољили аналогни ефекат између 83 и 86%. Процент ћелија које су заустављене у G₀/G₁ фази након администрације једињења **СВЕ-1** и **СВЕ-2** био је 80 до 85%. Заустављање раста MCF-7 ћелија у G₀/G₁ фази свакако је било последица смањења интензитета сигналне трансдукције на нивоу Raf-1/MAPK/ERK пута, те спречавања транскрипције која доводи до биосинтезе рака дојке било директним или индиректним геномским путем. Захваљујући испољеној фармакологији, сва једињења унутар **СВЕ** серије даље су подвргнута *in vivo* скринингу.

Резултати и дискусија

Табела 3.24. Ефекти синтетисаних једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** на ћелијски циклус MCF-7 ћелијских линија

Јед. Фаза	Ћелијски циклус (%)					
	G ₀ /G ₁ ^{а,б}		S ^в		G ₂ /M ^{г,д}	
Конц. (nM)	0,1 ^б	1 ^б	0,1	1	0,1	1
СВЕ-1	80,45±2,45 ^{е,†}	85,43±3,34 ^{е,†}	7,34±1,13 ^{е,†}	9,04±3,33 ^{е,†,‡}	12,21±3,43 [†]	5,53±2,23 ^{е,†}
СВЕ-2	80,76±2,68 ^{е,†}	85,92±2,32 ^{е,†}	7,24±1,32 ^{е,†}	8,78±2,32 ^{е,†,‡}	12,00±2,43 ^{е,†,‡,§}	5,30±1,78 ^{е,†,§}
СВЕ-3	83,59±0,51 ^{е,†}	86,35±0,75 ^{е,†}	6,34±0,78 ^{е,†}	9,35±0,78 ^{е,†,‡}	10,07±1,53 ^{е,†,‡,§}	4,30±1,59 ^{е,†,‡,§}
СВЕ-4	84,32±1,34 ^{е,†}	87,32±1,34 ^{е,†}	6,32±0,14 ^{е,†,‡}	9,32±0,41 ^{е,†,‡}	9,36±2,35 ^{е,†}	3,36±0,94 ^{е,†}
СВЕ-5	84,34±2,24 ^{е,†}	86,32±2,34 ^{е,†}	7,31±0,43 ^{е,†}	9,23±1,78 ^{е,†,‡}	8,35±2,36 ^{†,‡,§}	4,45±1,36 ^{е,†}
СВЕ-6	76,34±1,67 ^{е,†}	79,43±1,32 ^{е,†}	11,32±0,51 ^{е,†}	14,41±0,31 ^{е,†,‡}	12,34±2,53 ^{е,†}	6,16±1,08 ^{е,†,§}
E₂^ж	17,33±0,12 ^{†,‡,§}	25,78±0,35 ^{†,§}	28,51±0,22 ^{†,§}	29,31±0,46 [§]	54,16±0,24 ^{†,‡,§}	44,91±0,43 ^{†,‡,§}
4-ОТН.^з	58,13±0,32 ^{е,†}	64,22±0,74 ^{е,†}	18,32±0,57 ^{е,†}	22,43±0,31 ^{е,§}	23,55±0,54 ^{е,†}	13,35±0,54 ^{е,†}
Ral.^и	59,12±1,32 ^{е,†}	65,32±0,31 ^{е,†}	16,41±0,32 ^{е,†}	17,43±0,21 ^{е,†}	24,47±0,43 ^{е,†}	17,25±0,18 ^{е,†}
Контрола^ј	32,32±0,31 ^{†,‡,§}		34,43±0,11 ^{†,‡,§}		33,25±0,31 ^{†,‡,§}	

^аСтања мировања ћелије: G₀ - ћелија је напустила циклус и престала да се дели;

^бЋелијска интерфаза (тј. синтеза): G₁ - повећање величине ћелија (припрема за биосинтезу DNA); ^вЋелијска интерфаза (тј. синтеза): S - репликација DNA; ^гЋелијска интерфаза (тј. синтеза): G₂ - период између биосинтезе DNA и митозе, ћелија наставља да расте;

^дСтања подела ћелија: M - раст ћелија престаје, долази до поделе;

^жКонцентрација једињења у nM администрирана на MCF-7 ћелијским линијама;

^зРезултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација. ^ж17β-естрадиол;

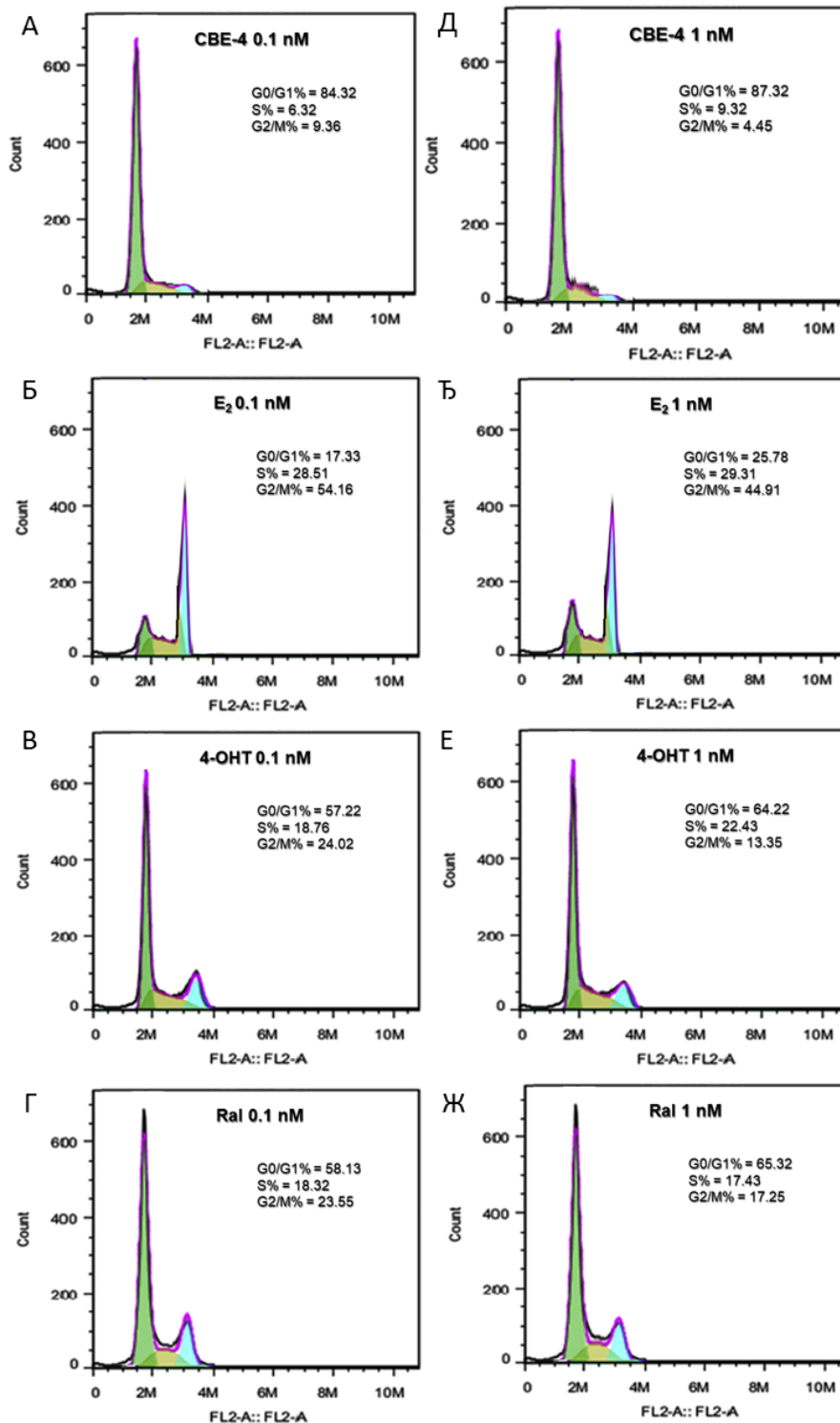
^и4-хидрокситамоксифен (енг. 4-hydroxytamoxifen, 4-ОТН); ^иРалоксифен (енг. Raloxifene, Ral); ^ј0,9% NaCl. *p < 0,05 у поређењу са контролном групом; [†]p < 0,05 у поређењу са E₂; [‡]p < 0,05 у поређењу са 4-ОТН; [§]p < 0,05 у поређењу са Ral.

^з4-хидрокситамоксифен (енг. 4-hydroxytamoxifen, 4-ОТН); ^иРалоксифен (енг. Raloxifene, Ral); ^ј0,9% NaCl. *p < 0,05 у поређењу са контролном групом; [†]p < 0,05 у поређењу са E₂; [‡]p < 0,05 у поређењу са 4-ОТН; [§]p < 0,05 у поређењу са Ral.

In vivo скрининг једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** против рака дојке

Идентични експериментални протоколи онима примењеним за елаборацију **3DQ** серије коришени за дефинисање утицаја једињења из **СВЕ** серије на туморигенезу *in vivo* (Табела 3.25, Слика 3.33, Додатни материјал III: ДМ119-ДМ124). Већина активних погодака показала је заштитне ефекте у односу на туморигенезу млечних жлезда. Тако су **СВЕ-4** и **СВЕ-5** пролонгирани латенцију тумора за 17 и 16 недеља након дозирања од 5 mg/kg bwt односно 21 недељу након администрације 50 mg/kg bwt, респективно, одржавајући ниско оптерећење тумором и малу запремину истог, показујући се бољим супресорима рака дојке **Ral**-а. Нешто нижа антиканцерогена активност *in vivo* забележена је код **СВЕ-1**, **СВЕ-2** и **СВЕ-3**, који су одржавали латентност тумора између 15 и 16 недеља у мањој дози, односно 19 недеља након администрације више дозе, такође показујући супериорност у односу на **Ral**. Најслабију ативност *in vivo*, премда поново знатно бољу од **Ral**, показало је једињење **СВЕ-6** са латенцијом тумора од 13 до 15 недеља, респективно. Безбедност једињења током примене потврђена је

каталитичким активностима ензима јетре и редокс статусом (Додатни материјал III: Табеле ДМ26 и ДМ27), где није откривен неповољан фармаколошки профил.



Слика 3.33. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **CBE-4** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **CBE-4** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Резултати и дискусија

Након оралне администрације на пацовима, једињења **СВЕ-4**, **СВЕ-5**, **СВЕ-3**, **СВЕ-1**, **СВЕ-2** и **СВЕ-6** показали су добар фармакокинетички профил (Табела 3.25), бољи у односу на **5AK2** или **SS5020** [75], као и оптимални афинитет према протеинима плазме. Задовољавајућа вредност клиренса *in vivo*, заједно за вредностима ензимских маркера, потврдили су да није дошло до нарушавања морфологије хепатоцита након администрације водећих једињења. Једињења су такође окарактерисана добром оралном изложеношћу, прихватљивим концентрацијама у плазми и добром биорасположивошћу.

Табела 3.25. Ефекти синтетисаних једињења **СВЕ-1** до **СВЕ-6** на туморигенезу млечних жлезда и фармакокинетичке студије.

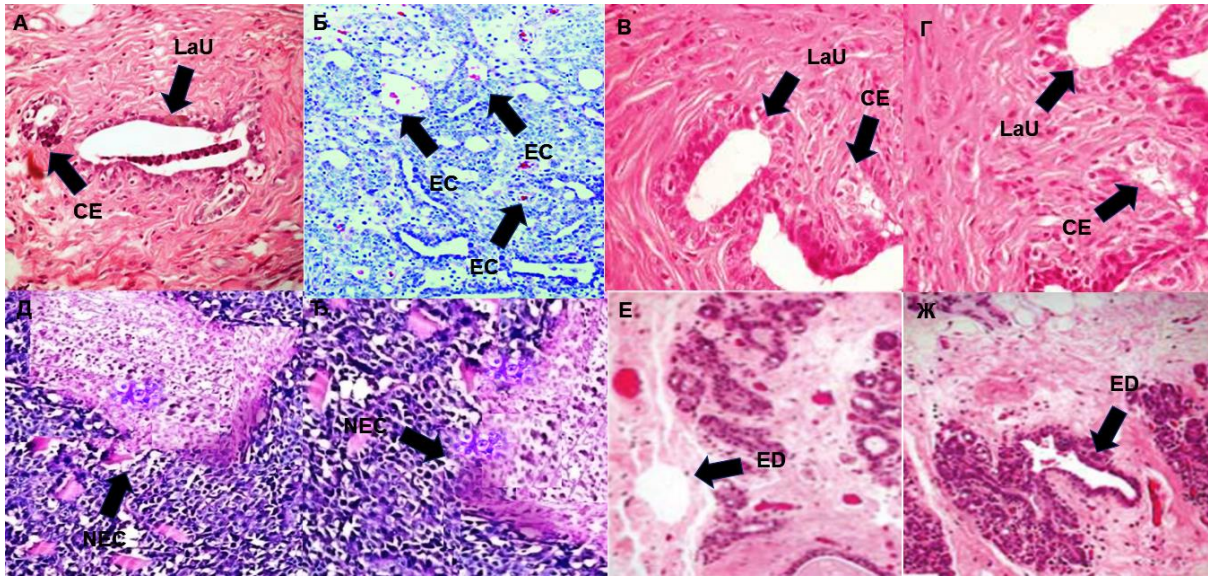
Јед.	Доза (mg/kg)	log D _{7,4} ^a	Латенција ^b тумора (недеља)	Оптерећење ^b тумором (недеља)	Запремина ^г тумора (mm ³)	PBP ^д (%)	CL ^б <i>in vivo</i>	БИО ^е
СВЕ-1	5 ^{l,†}	1.96	15 ^{*,†}	1,41±0,17 ^{e,*,†,‡,‡,‡}	0,28±0,12 ^{*,†,‡,‡}	1,13	30	92
	50		19 ^{*,†}	1,36±0,36 ^{*,†,‡,‡}	0,21±0,34 ^{*,†,‡,‡}	1,22	39	96
СВЕ-2	5	1.92	15 ^{*,†,‡,‡}	1,44±0,06 ^{*,†,‡,‡}	0,26±0,17 ^{*,†,‡,‡}	1,15	32	94
	50		19 ^{*,†,‡}	1,37±0,32 ^{*,†,‡,‡}	0,21±0,34 ^{*,†,‡,‡}	1,24	34	96
СВЕ-3	5	1,92	16 ^{*,†,‡,‡}	1,29±0,24 ^{*,†,‡,‡}	0,25±0,14 ^{*,†,‡,‡}	1,04	32	91
	50		19 ^{*,†,‡}	1,13±0,36 ^{†,‡,‡}	0,18±0,12 ^{*,†,‡,‡}	1,17	32	96
СВЕ-4	5	1,94	17 ^{*,†}	1,23±0,43 ^{*,†,‡,‡}	0,23±0,06 ^{*,†,‡,‡}	1,04	31	92
	50		21 ^{*,†}	1,07±0,31 ^{*,†,‡,‡}	0,16±0,08 ^{*,†,‡,‡}	1,13	34	96
СВЕ-5	5	1,91	16 ^{*,†}	1,33±0,35 ^{*,†,‡,‡}	0,23±0,11 ^{*,†,‡,‡}	1,08	37	92
	50		21 ^{*,†}	1,17±0,22 ^{*,†,‡,‡}	0,18±0,16 ^{*,†,‡,‡}	1,14	40	97
СВЕ-6	5	1,98	13 ^{*,†}	1,28±0,51 ^{*,†,‡,‡}	0,22±0,15 ^{*,†,‡,‡}	1,17	43	91
	50		18 ^{*,†}	1,18±0,44 ^{*,†,‡,‡}	0,17±0,05 ^{*,†,‡,‡}	1,24	44	94
4-ОТН ³	5	3.62	7 [*]	3.33±0.46 [†]	1.86±0.11 [†]	1.84	36	87
	50		10 [*]	3.26±0.43 ^{†,‡}	1.34±0.35 [†]	2.51	41	94
Ral ^и	5	2.37	8 [*]	3.09±0.46 [†]	1.66±0.32 [†]	1.84	36	93
	50		13 [*]	2.87±0.34 [†]	1.42±0.35 [†]	1.91	41	96
MNU ^ј	50	НД	5 [§]	4.51±0.17 ^{†,‡,‡,‡,‡}	4.47±0.36 ^{†,‡,‡,‡,‡}	НД	НД	НД
К ^к		НД	0 ^{†,‡,‡,‡,‡}	0 ^{†,‡,‡,‡,‡}	0 ^{†,‡,‡,‡,‡}	НД	НД	НД

^aПросечна липофилност добијена из концентрационог опсега 5, 10, 20, 30, 40 и 50 mg/kg bwt добијена методом мешања ерленмајера (енг. shake-flask methodology);

^bВреме протекло од тренутка излагања пацова **MNU** до откривања канцера дојке);

^вБрој ћелија карцинома; ^гЗапремина узорка; ^дВезивање за протеине плазме (енг. plasma protein binding, PBP) на 37°C; ^бУнутрашњи клиренс (енг. Intrinsic clearance) *in vivo*;

^еБиорасположивост једињења; ^жРезултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација; ^з **4-хидрокситамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen**, **4-ОТН**); ^и **Ралоксифен** (енг. **Raloxifene**, **Ral**); ^јМетил нитрозоуреа (енг. methyl nitrosourea, **MNU**); ^к0,9% NaCl. * p < 0,05 када се пореди са негативном контролом; † p < 0,05 када се пореди са **MNU** у концентрацији од 50 mg/kg bwt; ‡ p < 0,05 када се пореди са **4-ОТН** у концентрацији од 5 mg/kg bwt; § p < 0,05 када се пореди са **4-ОТН** у концентрацији од 50 mg/kg bwt; † p < 0,05 када се пореди са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg bwt; † p < 0,05 када се пореди са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg bwt.

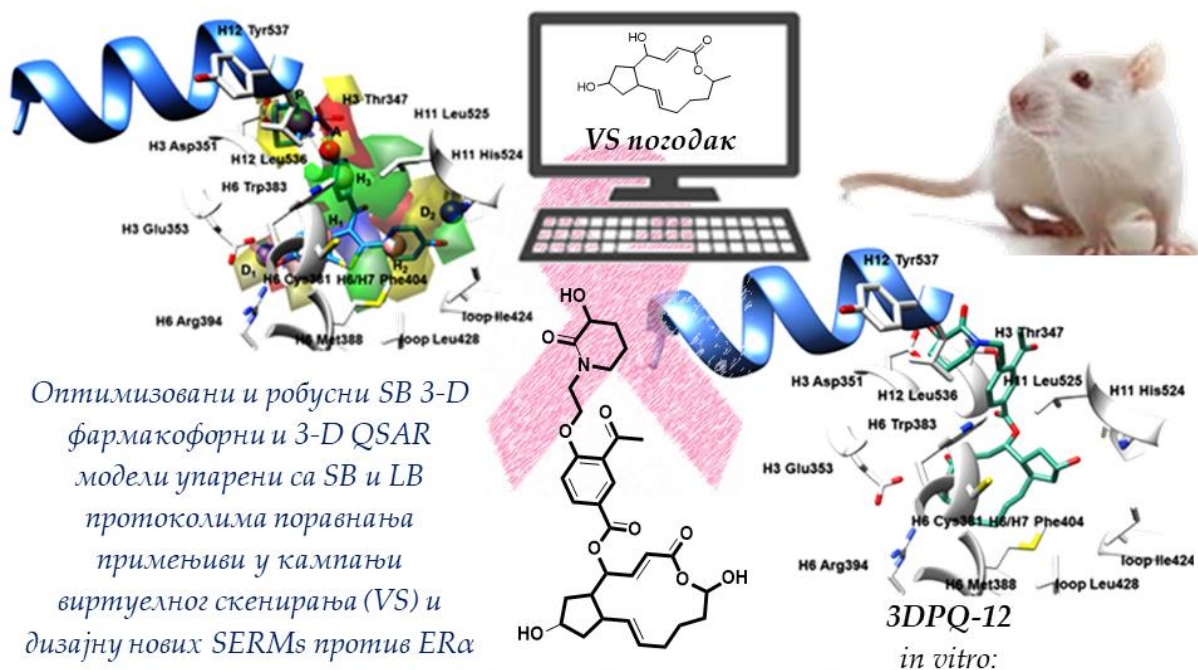


Слика 3.34. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-4** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-4** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.

Наравно, утицај администрираних једињења на ткиво процењен је анализирањем фотомикрографа канцера дојке индукованог од стране **MNU** (Слика 3.34 и Додатни материјал III: Сlike ДМ125-ДМ129). Очекивано, физиолошки раствор проузроковао је формирање лобулоалвеоларне јединице (енг. lobuloalveolar unit, LaU) и кубоидне епителијарне ћелије (енг. cuboidal epithelial cells, CE) (Слика 3.34А), док је **MNU** узроковао дуктални карцином млечне жлезде са пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (енг. neoplastic epithelial cells (EC) (Слика 3.34Б). Једињења из **СВЕ** серије показали су упоредив хистопатолошки профил за једињењима **3DQ** серије, неутралишући морфолошке промене изазване са **MNU**, те утицајући на то да се у

Резултати и дискусија

узорцима констатују само лобулоалвеоларне јединице и кубоидне епителијарне ћелије (фотомикрографи **СВЕ-4** као пример, Сlike 3.34В и 3.34Г). Једињења нису изазвала некрозу као **4-ОНТ** (енг. necrosis, NEC, Сlike 3.34Д и 3.34Ђ), нити појаву мање диференцираних екстралобуларних канала (енг. extralobular ducts, ED) као **Ral** (Сlike 3.34Е и 3.34Ж).



Hit-to-lead оптимизација $IC_{50} ER\alpha = 400 \text{ pM}$;
ка новим SERMs $IC_{50} MCF-7 = 560 \text{ pM}$;
3DPQ-1 до
3DPQ-12

in vivo:
Латенција тумора: 15 -15 недеља
Оптерећење тумора: 0.94
Запремина тумора: 0.34 mm^3

Дизајн иновативних антагониста естроген рецептора α базиран на 3-D фармакофорним и 3-D QSAR студијама генерисаним на основу поравнања атома, синтеза новодизајнираних једињења и антиканцерогена активност против рака дојке in vitro и in vivo

Резултати и дискусија

Генерисање 3-D фармакофорних хипотеза и 3-D QSAR модела и њихова интерпретација

Претходно SB преклопљена једињења унутар TR (Табеле 2.1 и 2.2) у финалном делу ове докторске дисертације искоришћена су за генерисање SB 3-D фармакофорних хипотеза (**3-D Phyp**) и последичних **3-D QSAR модела**, чија су MIF израчуната не на основу преклапања стерних и електростатичких поља већ на основу преклапања атома самих лиганда (енг. atom-based), помоћу програма PHASE имплементираних у Schrödinger Suite пакет. У даљој интерпретацији, статистички најбоља **3-D Phyp** и статистички најбољи **3-D QSAR модел** интерпретирани су заједно као **3-D Phyp/3-D QSAR модел ансамбл**. Обзиром на чињеницу да су сви TR молекули били физиолошки врло активни, једињења су подељена на „активне” и „неактивне” молекуле, користећи праг активности од 7,30 pIC₅₀ сходно упутству за употребу програма PHASE. У процесу тражења оптималног **3-D Phyp/3-D QSAR модел ансамбла**, истражене су комбинације свих доступних фармакофорних особина, при чему су оптималне **3-D Phyp** изграђене коришћењем Common Pharmacophore Hypothesis (CMP) модула, након чега су генерисани и одговарајући atom-based 3-D QSAR модели (главне хипотезе представљене су као Додатни материјал IV: Табеле ДМ2-ДМ6). Две најбоље и са статистичке тачке гледишта (највише q^2 вредности) сличне хипотезе, **ADDHHP.13** и **ADDRRRP.11** (Табела 3.26, Слика 3.35), надаље су цитиране у тексту као **3-D PhypI** односно **3-D PhypII**.

Обе хипотезе конципиране су од једне фармакофорне особине акцептора водоничне везе (**A**), две особине које су описивале доноре водоничних веза (**D₁** и **D₂**), затим три хидрофобне особине (**H₁**, **H₂** и **H₃**) или три особине ароматичних прстенова (**R₁**, **R₂** и **R₃**), те једне особине позитивног наелектрисања (**P**); **3-D PhypI** односно **3-D PhypII** биле су преклопљене са мапама *PLS-кофицијената* проистеклих из генерисаних **3-D QSAR модела** попут **ЗЕЛЕНИХ***PLS-кофицијената*, који су илустровали позитивне стерне интеракције, **ЖУТИХ***PLS-кофицијената*, који су описивали негативне стерне интеракције, **ПЛАВИХ***PLS-кофицијената*, којих су откривали регионе где су позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза доприносили активности и били фаворизовани док су негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза умањивали активност и били дисфаворизовани, те најзад **ЦРВЕНИХ***PLS-кофицијената*, који су прекривали регионе где су негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза повећавали активност и били су

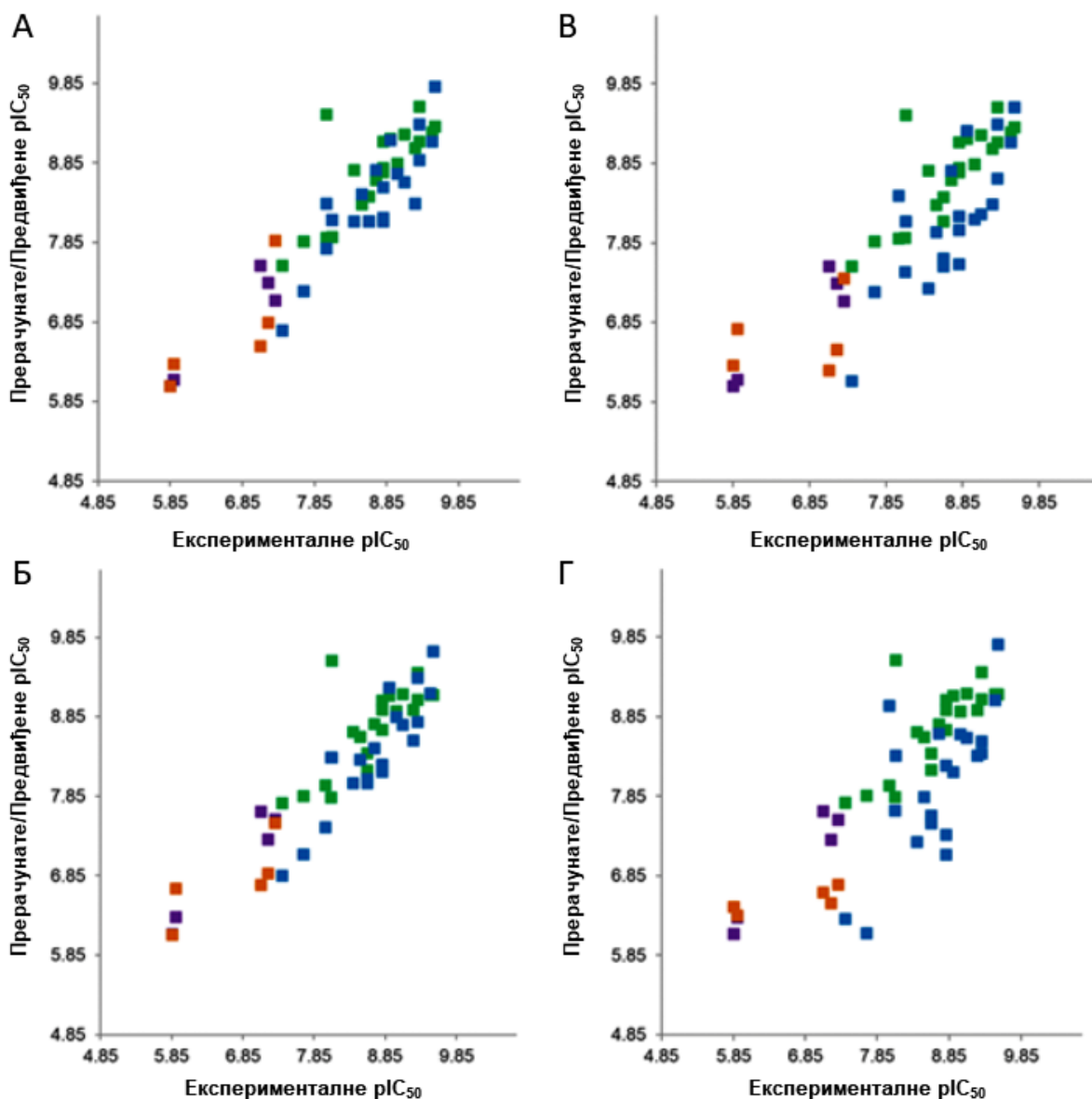
Резултати и дискусија

фаворизовани док су позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза исту смањивали и били су дисфаворизовани.

Табела 3.26. Поравнање фармакофорних особина (**A**: акцептор водоничне везе, **D**: донор водоничне везе, **R**: особина ароматичног прстена, **H**: хидрофобна особина, **P**: особина позитивног наелектрисања) статистички најбољих хипотеза у односу на **1ERR** (структура приказана плавом бојом) и **1ERE** (структура обојена ружичастом бојом). Резултати различитих параметара (горњи део) и PLS статистичких параметара (доњи део) две најбоље хипотезе.

	ADDRRRP.11					ADDHHP.13				
HID ^a	S ^b	S-I ^b	P-H [†]	S [‡]	V [§]	VOL ^e	SE ^ж	M ³	A ^и	I ^ј
ADDRRRP.11	3,741	0,967	6,429	0,81	0,991	0,426	2,678	17	9,52	1,751
ADDHHP.13	3,743	0,963	6,432	0,83	0,993	0,431	2,674	17	9,30	1,755
	PLSF ^к	r ² _L	SD ^{лб}	F ^м	P ^и	Stability ^{лб}	q ² _{LOO} ^o	q ² _{LSO} ^и	q ² _{YS LOO} ^п	q ² _{YS LSO} ^с
ADDRRRP.11	5	0,949	0,264	61,3	4,38e ⁻¹⁵	0,971	0,825	0,627	-0,234	-0,247
ADDHHP.13	5	0,951	0,257	61,4	4,41e ⁻¹⁵	0,977	0,826	0,659	-0,241	-0,258

^aHypothesis identification - Идентификација хипотезе; ^bSurvival - скалирана комбинација вектора, позиције, запремине и резултата преживљавања и процена за број једињења чија структура одговара фармакофори; ^bSurvival-inactives - резултат преживљавања за активна једињења умањен коефицијентом за неактивна једињења; [†]Post-hoc - резултат пребројавања; [‡]Site score - RMS вредност преклапања фармакофорних особина које доприносе хипотези, базирана на девијацији свих лиганата у односу на референтни лиганд; [§]Vector alignment score - мера вектора за поравнање акцептора, донора и ароматичних прстенова у структурама које доприносе овој хипотези када су саме структуре поравнате са фармакофором; ^eVolume - мера колико се запремине доприносећих структура преклапају када се поравнају на фармакофору; ^жSelectivity - удео молекула који ће се вероватно подударати са хипотезом, без обзира на њихову активност у односу на рецептор; ³Matches - број активних молекула који се подударају са хипотезом; ^иActivity - Активност референтног лиганда (pIC₅₀); ^јInactive - Оцена преживљавања неактивних молекула; ^кPLS factor, тј. N/5, где је N број лиганата присутних у тренинг сету; ^лКонвенционални коефицијент квадратне корелације; ^{лб}Стандардна девијација регресије; ^мОднос варијансе модела у односу на варијансу посматране активности; ^иНиво значајности односа варијансе; ^{лб}Стабилност предвиђања модела у односу на промене у саставу тренинг сета; ^oКоефицијент корелације унакрсне валидације применом leave-one-out методе. ^иКоефицијент корелације унакрсне валидације применом leave-some-out методе са 5 случајних група; ^пПросечан коефицијент корелације унакрсне валидације применом leave-one-out методе, добијен након Y-мешања. ^сПросечни коефицијент корелације унакрсне валидације применом leave-some-out методе, добијен након Y-мешања.



Слика 3.35. Експерименталне вредности pIC_{50} наспрам прерачунатих („активни”: зелени квадратићи, „инактивни”: љубичасти квадратићи) и предвиђених („активни”: плави квадратићи, „инактивни”: наранџасти квадратићи) за хипотезу **ADDHHP.13** помоћу LOO унакрсне валидације (А); за **ADDRPR.11** хипотезу помоћу LOO унакрсне валидације (Б); за **ADDHHP.13** хипотезу помоћу LSO унакрсне валидације (В); за **ADDRPR.11** хипотезу помоћу LSO унакрсне валидације (Г).

С обзиром да се PHASE у методологији **R** фармакофорне особине сматрају под-типовима **H** особина, у даљој дискусији примарно је коришћена **3-D PhypI**, као статистички незнатно боља хипотеза. Графичка анализа било **3-D PhypI/3-D QSAR** модел или **3-D PhypII/3-D QSAR** модел ансамбала извршена је уз помоћ програма UCSF Chimera: фармакофорне особине било унутар **3-D PhypI** (Слике 3.36, 3.37 и Додатни материјал IV: Слике ДМ1-ДМ3) или **3-D PhypII** (Додатни материјал IV:

Резултати и дискусија

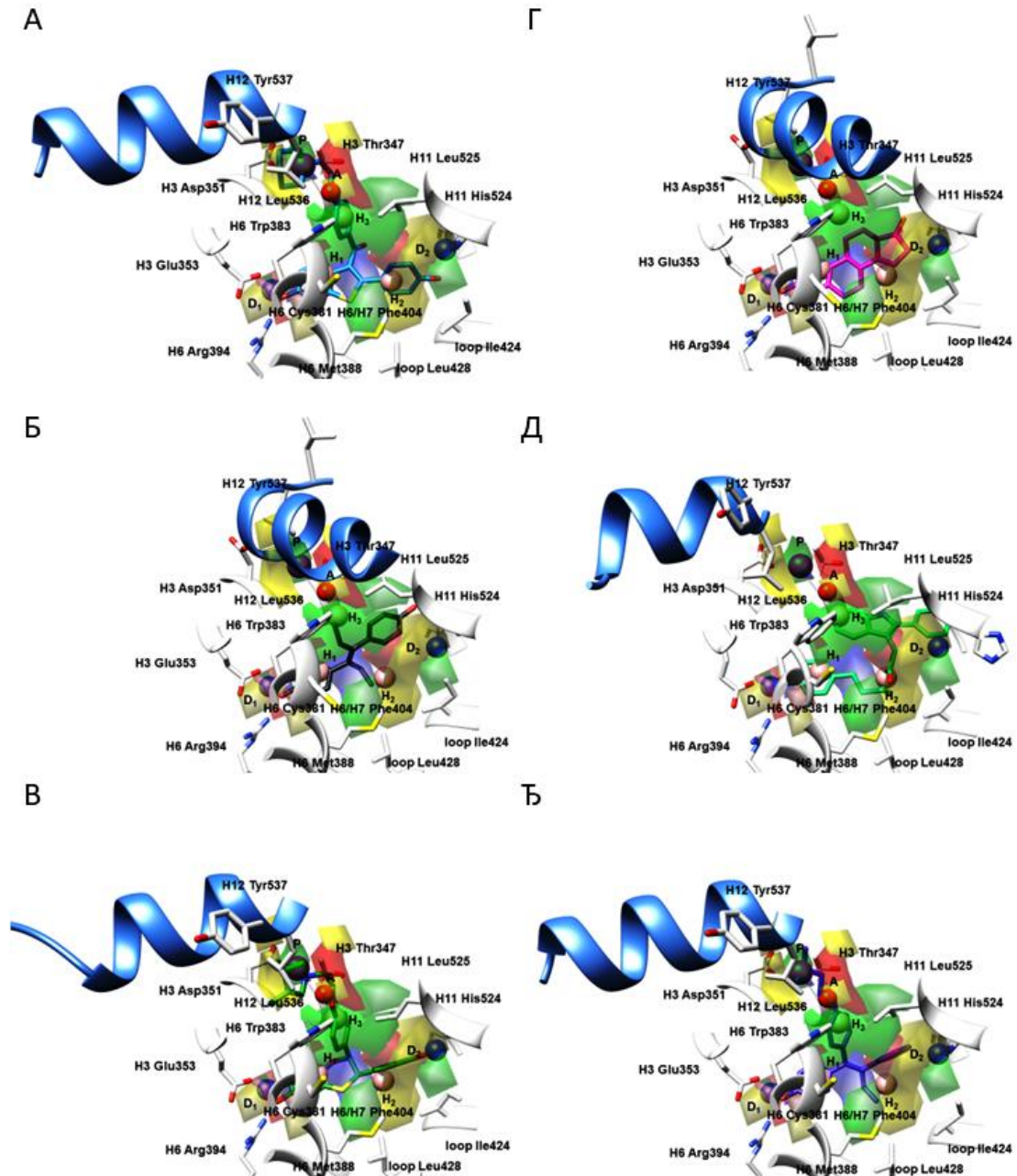
Слике ДМ4-ДМ8) биле су прекопљене са генерисаним стерним и електростатичким *PLS*-коэффицијентима и интерпретиране су заједно. Робусност модела праћена је LOO и LSO унакрсним валидацијама (Слика 3.35 и Додатни материјал IV: Табеле ДМ3-ДМ6), док је недостатак случајне корелације потврђен Y-мешањем (Y-S).

Порекло/значај D₁ фармакофорне особине и са њом повезаних PLS-коэффицијената

Поравнање **D₁/ЦРВЕНИ***PLS-коэффицијенти* описало је способност **1. PhOH** (присутне у свим једињењима осим у **1R5K**, односно GW-5638, Табела 2.1, Додатни материјал IV: Слика ДМ2Г и ДМ7Г) да се понаша као мешовити HBD/HBA у односу на H3 Glu353 и H6 Arg394 (резултат сагласан са претходним 3-D QSAR и COMBINEг студијама): овакво понашање **1° PhOH** примећено је и у комплексима са **Ral** (**1ERR**, најпотентнији антагонист ER α , Табела 2.1, Слика 3.36А, што је било супротно другим LB хипотезама [281,284,286,296], али у сагласности са претходном SB хипотезом [303]), **3ERD**, укупно другом по активности једињењу (Табела 2.1, Слика 3.36Б, слично претходно описаној LB хипотези [299]), те **1ERE** (Табела 2.1 и Слика 3.36Г, у сагласности са претходним LB хипотезама [275,278,299]). Међутим, поравнање **ЖУТИХ***PLS-коэффицијената* између **1° PhOH** и H3 Glu353 указало је да је циљана аминокиселина достигла максималан степен толеранције на стерни притисак **1° PhOH** и да увођење волуминознијих HBD/HBA не би било пригодно (опет у сагласности са претходним 3-D QSAR и COMBINEг студијама). С друге стране, **D₁/ЦРВЕНИ***PLS-коэффицијенти* нису били осетљиви на недостатак грађења водоничне везе од стране лиганата пронађених у **2IOK** (Табела 2.1 и Слика 3.36Ђ) и у **2IOG** (Табела 2.1 и Слика 3.37В) комплексима, чије фенолне групе нису формирале водоничне везе са H3 Glu353, односно **1R5K** лиганда (Табела 2.1, Додатни материјал IV: Слика ДМ2Г и ДМ7Г), услед одсуства **1° PhOH**, откривајући лимите **3-D PhypI/3-D QSAR** модел ансамбла.

Порекло/значај D₂ фармакофорне особине и са њом повезаних PLS-коэффицијената

Надаље, **D₂** особина/**ЗЕЛЕНИ***PLS-коэффицијенти*/**ЦРВЕНИ***PLS-коэффицијенти* описали су интеракцију једињења унутар TR са H11 His524 помоћу **2. PhOH**, као друге мешовите HBD/HBA фармакофорне особине (видети **1ERR**, **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **2R6Y**, **1XP9**, **1XPC**, **2R6W**, **1X7R**, **2QA8**, **2QA6**, **1X7E**, и **1GWQ**, Табеле 2.1 и 2.2, Слика 3.36А и 3.36В, Додатни материјал IV: Слика ДМ1А, ДМ1Б, ДМ1В, ДМ1Г, ДМ2А, ДМ2Б, Слика 3.37Г, Додатни материјал IV: Слика ДМ2В, ДМ3А, ДМ3Г и Слика 3.37Ђ), а који су сигурно допринели високој активности (Табела 2.1).



Слика 3.36. Фармакофорне особине 3-D **PhypI** хипотезе (**D**: донори водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **H**: хидрофобне особине, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS*-кофицијената 3-D **QSAR** модела (**ЗЕЛЕНИ***PLS*-кофицијенти: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS*-кофицијенти: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS*-кофицијенти: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS*-кофицијенти: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза неповољно утичу на активност за **1ERR** (A); **3ERD** (B); **1XP1** (C); **1ERE** (D); **2IOK** (E); **2BJ4** (F). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Резултати и дискусија

Поравнање **D₂/ЦРВЕНИХ_{PLS}-коэффицијената** указује, аналогно резултатима претходно спроведених 3-D QSAR и COMBINEг студија, на формирање водоничне везе са Н11 His524 као неопходне за високу физиолошку активност парцијалног агониста или једињења са SERM/SERD фармакологијом (што није предвиђено другим LB хипотезама [284,294], али је предвиђено SB хипотезама [286,303]). Функционалне групе неадекватно интерпретиране као **2. Ph-OH**, попут 17β-OH групе унутар D-прстена **1ERE** (Табела 2.1, Слика 3.36Г) или 17β-OH групе унутар D-прстена **2B1Z** (Табела 2.2, Додатни материјал IV: Слика ДМ3В) нису биле суперпониране са **D₂** фармакофорном особином (слично другим LB хипотезама [275,278,299]), али су биле прекривене **ЗЕЛЕНИМ_{PLS}-коэффицијентима** и **ЦРВЕНИМ_{PLS}-коэффицијентима**, који су само делимично описали интеракције са Н11 His524. Унутар **2B1Z**, (S)- у (R)-стереохемијско премештање 17β-OH узроковало је ротацију Н11 His524 ван LBD, подстакнуто присуством Y537S мутације, што је пропраћено присуством **ЖУТИХ_{PLS}-коэффицијената/ЦРВЕНИХ_{PLS}-коэффицијената** и окарактерисано као неповољно за активност биомолекула.

Надаље, **D₂/ЦРВЕНИ_{PLS}-коэффицијенти**, заједно са значајном порцијом **ЗЕЛЕНИХ_{PLS}-коэффицијената**, били су позиционирани између Н11 His524 и **5AK2** (Табела 2.2, Слика 3.37Б: Н6 С381S мутација, односно С417S мутација која се налази унутар структуре насумице увијања између хеликса Н6 и Н7, које не узрокују промене у трансактивацији ERα након везивања E₂, нису утицале на интеракцију **5AK2** као једињења са SERD фармакологијом), генистеина (**1X7R**, Табела 2.1, односно **2QA8**, Табела 2.2, респективно), **2QA6** (Табела 2), **1XQC**, односно **1UOM** (Табеле 2.1 и 2.2, респективно). Већ је описано да је *m*-F атом **5AK2** спречио формирање водоничне везе са Н11 His524 и тиме смањио биоактивност **5AK2**: присуство **D₂/ЦРВЕНИХ_{PLS}-коэффицијената/ЗЕЛЕНИХ_{PLS}-коэффицијената** указало је да би биоизостерна замена *m*-HBA са *p*-HBD/HBA повећала активност (Слика 3.37Б) (у сагласности са претходним 3-D QSAR и COMBINEг студијама). И заиста, потпуни недостатак *p*-HBA, као у структурама **1XQC** и у **1UOM** (Табеле 2.1 и 2.2, Додатни материјал IV: Слика ДМ2Б, Слика 3.37Д), односно диспозиционирање HBA у *m*-положај, као код А-прстена генистеина (**1X7R**, Табела 2.1, Слика 3.37Г, **2QA8**, Табела 2.2, Додатни материјал IV: Слика ДМ2В), резултовало је одсуством активације Н11 His524 у смислу грађења водоничне везе са лигандима и биактивношћу нижом од 8 pIC₅₀ јединица, односно селективношћу према ERβ.

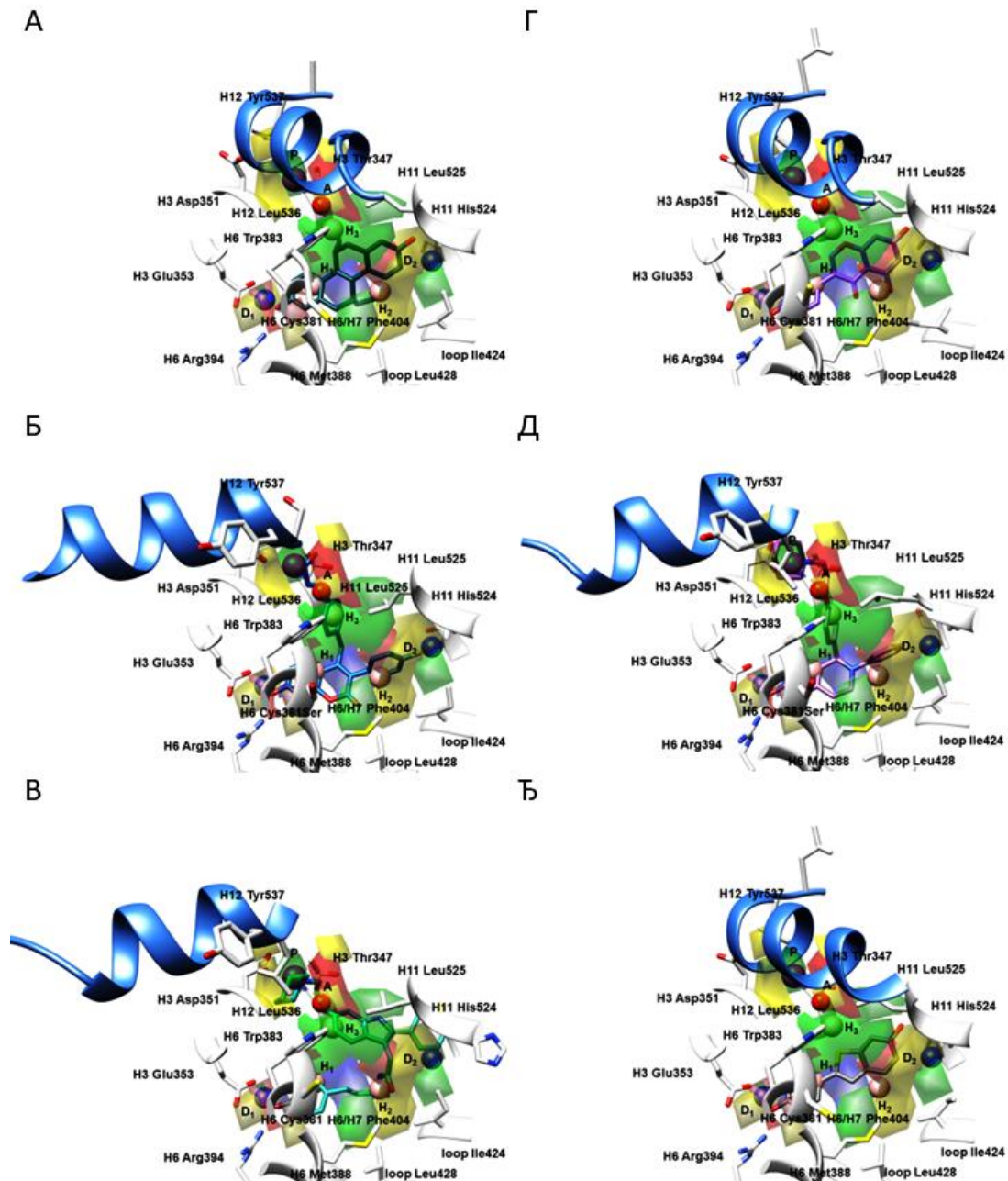
Докторска дисертација Незрине Куртановић

Порекло/значај H_1/R_1 фармакофорне особине и са њом повезаних PLS-коэффицијената

Даља анализа била је усмерена ка функционалним групама које су повезивале **1. PhOH** и **2. PhOH**. Тако, **H₁ (R₁)** особина преклопљена са **ЖУТИМ** PLS-коэффицијентима указала је на то да би стерни притисак који је **1. PhOH**, као интегрални део језгра 2-(4-хидроксифенил)бензо[*b*]тиофен-6-ола у структури **1ERR**, **2R6Y** и **2R6W** (Слика 3.36, Додатни материјал IV: Сlike ДМ4А, ДМ1В, ДМ6В, ДМ2Б и ДМ7Б, респективно), вршила на Н6 требао бити смањен (у сагласности са другим LB [278,286] или SB [303] хипотезама). С друге стране, упркос томе што није био у складу са **H₁/R₁** особинама, атом сумпора у структури 2,3-дихидротиофена **1ERR** (Табела 2.1, Слика 3.36А, Додатни материјал IV: Слика ДМ1А), остварио је стерно повољне интеракције са Н6 Met388, што је описано **ЗЕЛЕНИМ** PLS-коэффицијентима. Такав диспарат између **3-D PhypI/3-D PhypII** и PLS-коэффицијената може бити једино приписан чињеници да су **3-D QSAR** модели генерисани на основу преклапања атома лигананда унутар тренинг сета, а не на основу преклапања поља молекулских интеракција сваког од лигананда. Мутације типа Н6 С381S и С417S, иако примећене унутар **2R6Y** и **2R6W** комплекса, нису имале велики утицај на биопотенцијал.

ПЛАВИ PLS-коэффицијенти описали су супституцију 2,3-дихидротиофена са 1,4-оксатином која је пронађена унутар 4-[(3S)-1,4-оксатин-3-ил]фенолног остатка у структури **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **1XP9** и **1XPC** (Табела 2.1, Слика 3.36В, Додатни материјал IV: Сlike ДМ4В, ДМ1А, ДМ6А, ДМ1Б, ДМ6Б, ДМ1Г, ДМ6Г, ДМ2А и ДМ7А, респективно), као неповољну по активност и указали су на то да би атом кисеоника унутар 1,4-оксатина, као НВА, требао бити замењен са НВД да би се смањио пад у активности: **1XP1** и **1XP6** били су међу најпотентнијим антагонистима ER α (укупно 3. и 4. по реду активности), док су **1SJ0**, **1XP9** и **1XPC** показали активност изнад 8,7 pIC₅₀ јединица. Међутим, преклапање **ЗЕЛЕНИХ** PLS-коэффицијената и **ЖУТИХ** PLS-коэффицијената сугерисало је да би алифатични или ароматични мост, ипак не превише волуминозан, био погодан за интеракцију са Н6 Met388: додатна модификација 1,4-оксатина у смислу замене -S- са -CH-CH₃, као код **1YIM** and **1YIN**, довела је до смањена активности (Табела 2.1, Додатни материјал IV: Сlike ДМ1Д и ДМ6Д, односно ДМ1Ђ и ДМ6Ђ, респективно).

Резултати и дискусија



Слика 3.37. Фармакофорне особине **3-D PhypI** хипотезе (**D**: доноси водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **H**: хидрофобне особине, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS*-коэффицијента **3-D QSAR** модела (**ЗЕЛЕНИ***PLS*-коэффицијенти: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS*-коэффицијенти: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS*-коэффицијенти: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS*-коэффицијенти: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза неповољно утичу на активност за **1L2I** (А), **5AK2** (Б), **2IOG** (В), **1X7R** (Г), **1UOM** (Д) и **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Порекло/значај H_2/R_2 фармакофорне особине и са њом повезаних PLS -коэффицијената

Хидрофобна особина H_2 (Слике 3.36 и 3.37, Додатни материјал IV: Слике ДМ1-ДМ3, у сагласности са претходним LB хипотезама [281,282,284,294]) (или фармакофорна особина прстена, R_2 , Додатни материјал IV: Слике ДМ4-ДМ8, у сагласности са претходним LB хипотезама [286,289,291], односно SB хипотезама [293,303,304]), поравњана заједно са $ЖУТИМ_{PLS}$ -коэффицијентима, генерисана је као резултат стерних интеракција **2. Ph-OH** са H6 Leu391, као и са аминокиселинама унутар структуре насумице увијања између хеликса H6 и H7, Ile424, Phe425 и Leu428, указујући на то да би смањење волуминозности утицало бенефитно на активност, што је било у супротности са претходно генерисаним Py-CoMFA и Py-ComBinE 3-D QSAR моделима. Супротно H_1/R_1 , H_2/R_2 фармакофорна особина делимично је описала допринос функционалних група које су повезивале **1. PhOH** и **2. PhOH**, мада је допринела разликовању парцијалних агониста од једињења са SERM/SERD фармакологијом. Тако су **3ERD** (Табела 2.1, Слика 3.36Б, Додатни материјал IV: Слика ДМ4Б) и **1L2I** (дериват тетрахидрохризена, Табела 2.2, Слика 3.37А, Додатни материјал IV: Слика ДМ5А), као парцијални агонисти ER α и чисти ER β антагонисти, остваривали стерне интеракције са H3 Ala350, H6 Leu384, те аминокиселинама Phe404 и Leu428 које се налазе у секвенци насумице увијања између хеликса H6 и H7 преко једне од својих *trans*-етил група, које су, и поред чињенице да су биле преклопљене са H_2 фармакофорном особином (што није предвиђено претходном SB хипотезом [299]), биле такође окарактерисане и стерним PLS -коэффицијентима супротних знакова, указујући на то да етил групе које остварују интеракцију са α -хеликсом H6 нису адекватне за дизајн једињења са SERM/SERD фармакологијом.

Преостале **3-D PhypI/3-D PhypII** фармакофорне особине, заједно са одговарајућим **3-D QSAR** мапама, биле су распоређене кроз целу просторну шупљину сачињену од α -хеликса H3, H11 и H12, те су допринеле даљем разликовању парцијалних агониста од антагониста (односно једињења са SERM/SERD фармакологијом), као између SERM/SERD једињења међусобом (Табеле 2.1 и 2.2).

Порекло/значај H_3/R_3 фармакофорне особине и са њом повезаних PLS -коэффицијената

Фармакофорна особина H_3 (R_3) преклопљена са **ЗЕЛЕНИМ** $_{PLS}$ -коэффицијентима/**ЦРВЕНИМ** $_{PLS}$ -коэффицијентима описала је интеракције једињења са SERM/SERD фармакологијом са H3 Thr347, наглашавајући важност централног

Резултати и дискусија

бензеновог прстена, надаље обележеног као **Ph**, пронађеног у скафолдима попут C(=O)-Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикла унутар структуре **1ERR**, **2R6W** и **2R6Y** (Слика 3.36, Додатни материјал IV: Сlike ДМ4А, ДМ1В, ДМ6В, ДМ2Б и ДМ7Б, респективно), Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикла код **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **1XP9**, **1YIM**, **1YIN** и **1XPC** (Табела 2.1, Слика 3.36В, Додатни материјал IV: Сlike ДМ4В, ДМ1А, ДМ6А, ДМ1Б, ДМ6Б, ДМ1Г, ДМ6Г, ДМ1Д, ДМ6Д, ДМ1Ђ, ДМ6Ђ, ДМ2А и ДМ7А, респективно), или варијације Ph-O-(CH₂)₂-хетероцикла у виду Ph-O-(CH₂)₂-N⁺R₁R₂ или Ph-O-*trans*-CH=CH-COOH, пронађених у **2BJ4** (Табела 2.1, Слика 3.36Ђ, Додатни материјал IV: Слика ДМ4Ђ) или **5AK2** (Табела 2.2, Слика 3.37Б, Додатни материјал IV: Слика ДМ5Б), респективно (тј. фармакофорном особино често наглашаваном у претходним LB [281,284,286,291,298] и SB [293] хипотезама). Одсуство разматраних фрагмената, као код **1GWQ** (Табела 2.1, Слика 3.37Ђ), једињења које је представљало молекулско поједностављење **1ERR**, **2R6Y** и **2R6W**, довело је до смањене активности. Веза између **Ph** и главног језгра помоћу карбонилне групе описана је **ЗЕЛЕНИМ***PLS-коэффицијентима*/**ЦРВЕНИМ***PLS-коэффицијентима*/**ПЛАВИМ***PLS-коэффицијентима*, али не и одговарајућом фармакофорном особиним, иако је карбонилна група **Ral** у претходно публикованој LB хипотези нотирана као мешовита НВА-хидрофобна (липидна) особина [282], указујући на то да би се биоактивност могла повећати ако се карбонилна група биоизостерно супституише са НВД током интеракције са Н11 His524. Позиционирање **ЗЕЛЕНИХ***PLS-коэффицијентима* преко **Ph** указало је на то да би волуминозност могла бити повећана према Н6 Trp383 (што је било у сагласности са претходно генерисаним 3-D QSAutogrid/R, Py-CoMFA и Py-ComBinE 3-D QSAR моделима), као и према Н3 Thr347 и Н12 Leu536 (што је било у сагласности са претходно генерисаним 3-D QSAutogrid/R и Py-CoMFA 3-D QSAR моделима, али делимично у супротности са Py-ComBinE 3-D QSAR моделима): **Ph** је остварио стерну интеракцију са метил групом бочног низа Н3 Thr347, присиљавајући аминокиселину да мигрира према Н11 Leu25 и Н12 Leu536, што је резултовало формирањем хидрофобне мреже Н3 Thr347-Н11 Leu525-Н12 Leu536 (стабилизоване помоћном Н3 Ala350-**Ph**-Н11 Leu525 мрежом). Ипак, обзиром да је хидроксилна група бочног ланца Н3 Thr347 била измештена из LBD према Н3 Met343, према постојећим **ЗЕЛЕНИМ***PLS-коэффицијентима*/**ЦРВЕНИМ***PLS-коэффицијентима* требала би да буде стабилована инкорпорирањем *o*-хидрофобне/НВА функционалне групе у **Ph**.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Међутим, парцијални агонисти (**3ERD**, **1ERE**, **2B1Z** и **1X7R/2QA8**, Табеле 2.1 и 2.2) нису стимулисали формирање Н3 Thr347-Н11 Leu525-Н12 Leu536 хидрофобне мреже. Заиста, друга *trans*-етил група **3ERD** (Слика 3.36Б, Додатни материјал IV: Слика ДМ4Б) и **2B1Z** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ3В и ДМ8В), слично 18 α -СН₃ групи **1ERE** (Слика 3.36Д, Додатни материјал IV: Слика ДМ4Д), није успела да стерно стабилизује метил групу бочног ланца Н3 Thr347, чиме није дошло до поремећаја АФ-2 површине. Супституција разматране етил групе **3ERD** са волуминознијом ароматичном, као код **2BJ4** (Табела 2.1, Слика 3.36Ђ, Додатни материјал IV: Слика ДМ4Ђ), довела је до нарушавања АФ-2 површине (односно отварања Н12). Са друге стране, потпуни недостатак лиганд-Н3 Thr347 интеракција, као код **1X7R** (Слика 3.37Д и Додатни материјал IV: Слика ДМ5Г) односно **2QA8** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ2В и ДМ7В), довело је чак до селективности према ER β .

Порекло/значај А фармакофорне особине и са њом повезаних PLS-коэффицијената

Унутар С(=О)-Ph-О-(СН₂)₂-хетероцикла, Ph-О-(СН₂)₂-хетероцикла или сличних хемијских конструкција, етаноламински мост повезао је **Ph** јединицу са терминалним хетероциклом. **A** фармакофорна особина (слично претходним LB [281,289] и SB [303] хипотезама) заједно са **ЦРВЕНИМ***PLS-коэффицијентима* нагласила је важност **Oxy** атома кисеоника (видети **1ERR**, **1XP1**, **1XP6**, **1SJ0**, **2R6Y**, **1XP9**, **1YIM**, **1YIN**, **1XPC** и **2R6W**, Табеле 2.1 и 2.2, Сlike 3.36А и 3.36В, Додатни материјал IV: Сlike ДМ1А, ДМ1Б, ДМ1В, ДМ1Г, ДМ1Д, ДМ1Ђ, ДМ2А и ДМ2Б), откривајући електростатичке интеракције између **Oxy** и -ОН групе бочног ланца из Н3 Thr347. У исто време, поменуте интеракције имале су одбојни карактер, макар према позиционирању **ЖУТИХ***PLS-коэффицијената*, чиме је искључена могућност грађења водоничне везе. Међутим, **ЖУТИ***PLS-коэффицијенти* такође су индицирали да **Oxy**-Н3 Thr347 интеракције не би требало да буду стерно ометане, као помоћу (*S*)-метил (**1XP9**, Додатни материјал IV: Сlike ДМ1Г и ДМ6Г) или (*R*)-метил (**1XPC**, Додатни материјал IV: Сlike ДМ2А и ДМ7А) супституената етаноламинског моста, да би се одржао висок ниво активности. На овај начин откривена је још једна занимљива особина Н3 Thr347 са директним импликацијама у дизајну лекова: аминокиселина би толерисала додатни стерни притисак са **Ph**, али не и са етаноламинског моста (што је није било у сагласности са претходно генерисаним 3-D QSAutogrid/R али јесте са Py-CoMFA 3-D QSAR моделима).

Резултати и дискусија

Порекло/значај *P* фармакофорне особине и са њом повезаних *PLS*-коэффицијената

Преклапање **P** фармакофорне особине/**ПЛАВИХ***PLS*-коэффицијената (слично претходним **LB** [291] и **DMB** [293] хипотезама) проистекло је из интерпретације водоничних веза формираних између **H3 Asp351** и позитивно наелектрисаних атома азота као конституената терминалних хетероцикала који су супституисали етаноламински мост: пиперазина у структури **1ERR**, **1SJ0**, **1YIN**, **2R6W** и **1UOM** (Слика 3.36А, Додатни материјал IV: Сlike ДМ1Б, ДМ1Ђ и ДМ2Б, Слика 3.36Д, респективно), (3*R*,4*R*)-3,4-диметилпиролидина у структури **1XP1** (Слика 3.36В), (3*S*,4*S*)-3,4-диметилпиролидина у структури **1XP6** (Додатни материјал IV: Слика ДМ1А), пиролидина у структури **2R6Y**, **1XP9**, **1YIM** и **1XPC** (Додатни материјал IV: Слика ДМ1В, ДМ1Д, ДМ1Ђ и ДМ2А), 2-фенил-1*H*-индола у структури **2IOK** и **2IOG** (Сlike 3.36Д и 3.37В), те октахидро-1*H*-пиридо[1,2-а]пиразина у структури **1XQC** (Додатни материјал IV: Слика ДМ3Б). Водоничне везе остварене са **H3 Asp351** стабилизовале су **H12** у отвореној конформацији чиме је индиректно спречено везивање ко-активатора било унутар геномског директног или индиректног пута.

На основу позиционирања **ЗЕЛЕНИХ***PLS*-коэффицијената, формирање водоничне везе са **H3 Asp351** препознато је као стерно фаворизовано. Међутим, **ЖУТИ***PLS*-коэффицијенти који су прекривали прстен пиперазина (**1ERR**), (3*R*,4*R*)-3,4-диметилпиролидина (**1XP1**), (3*S*,4*S*)-3,4-диметилпиролидина (**1XP6**), или остале сличне *N*-хетероцикле, указали су на то да би смањење интензитета van der Waals-ових интеракција према **H12 LLEML** могло изазвати индуковано прилагођавање **H12** према отвореној конформацији те да *N*-хетероцикл не мора нужно бити најпогоднији носилац **HBD** за интеракцију са **H3 Asp351** (што је било у сагласности са претходно генерисаним 3-D QSAutogrid/R, Py-CoMFA и Py-ComBinE 3-D QSAR моделима). Редукција хетероцикла на ниво диметиламиноетанола, као код **2BJ4** (Табела 2.1, Слика 3.36Ђ), или његова замена функционалном групом која садржи **HBA/HDB**, попут карбоксилне у структури фенил акрилне киселине (као код **1R5K** и **5AK2**, односно једињења са **SERD** фармакологијом), такође је резултовала формирањем водоничне везе са **H3 Asp351**, препоручујући мешовите **HBA/HBD** функционалне групе, односно **HBX**, за будићи рационални дизајн ефикасних антагониста **ERα**.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Процена способности различитих алгоритама и функција погодака за репродукцију кристалних структура парцијалних агониста и антагониста ER α користећи комерцијалне софтвере

Како би се извршила валидација способности предвиђања активности **3-D Phypl/3-D QSAR** модел ансамбла, извршени су SB/LB AA протоколи помоћу програма за молекулско доковање Glide односно програма за упоређивање сличности структура и њихово међусобно преклапање Flexible Ligand Alignment (FLA), оба имплементирана у Schrodinger Suite, примењујући стратегију консензуса. Правила за SB и LB поравнања потом су коришћена за дефинисање биоактивних конформација за једињења са непознатим модом интеракције са ER α и за инкорпорирање SB/LB биоактивних конформација у алат за предвиђање биоактивности. Наравно, SB и LB AA процењивани су кроз ECRD, RCRD, ECCD и RCCD, односно ECRA, RCRA, ECCA и RCCA.

Процена поравњања базираног на структури молекулске мете

За потребе процене квалитета SB поравнања, лиганди ER α третирани су претходно описаним протоколом поновног/унакрсног доковања. Две различите функције погодака имплементиране у софверу Glide SP (стандардна прецизност) и XP (додатна прецизност), коришћене су за репродукцију експерименталних конформација лиганда ER α . Користећи унакрсно доковање, флексибилност рецептора је укључена на дискретан начин.

Што се тиче SB AA, мод екстра прецизности програма Glide (енг. extra precision mode, XP) био је најтачнији у репродукцији експерименталних конформација ко-кристализованих лиганда ER α (Табела 3.27, Сlike 3.38 и Додатни материјал IV: Сlike ДМ9-ДМ12): програм Glide XP репродуковао је експерименталне конформације лиганда ко-кристализованих унутар WT рецептора са највећом тачношћу од 72,22, 63,88, 66,66 и 55,55% за ECRD, RCRD, ECCD и RCCD, тим редоследом, док су структуре пронађене унутар MUT рецептора репродуковане са тачношћу доковања од 75, 62,5, 62,5 и 62,5% за ECRD, RCRD, ECCD и RCCD, респективно. Због тога се Glide XP алат може сматрати драгоценим за виртуелно скенирање и рационални дизајн нових лиганда ER α , макар што се тиче употребљивости комерцијалних решења, те је био коришћен у даљем току ове докторске дисертације.

Резултати и дискусија

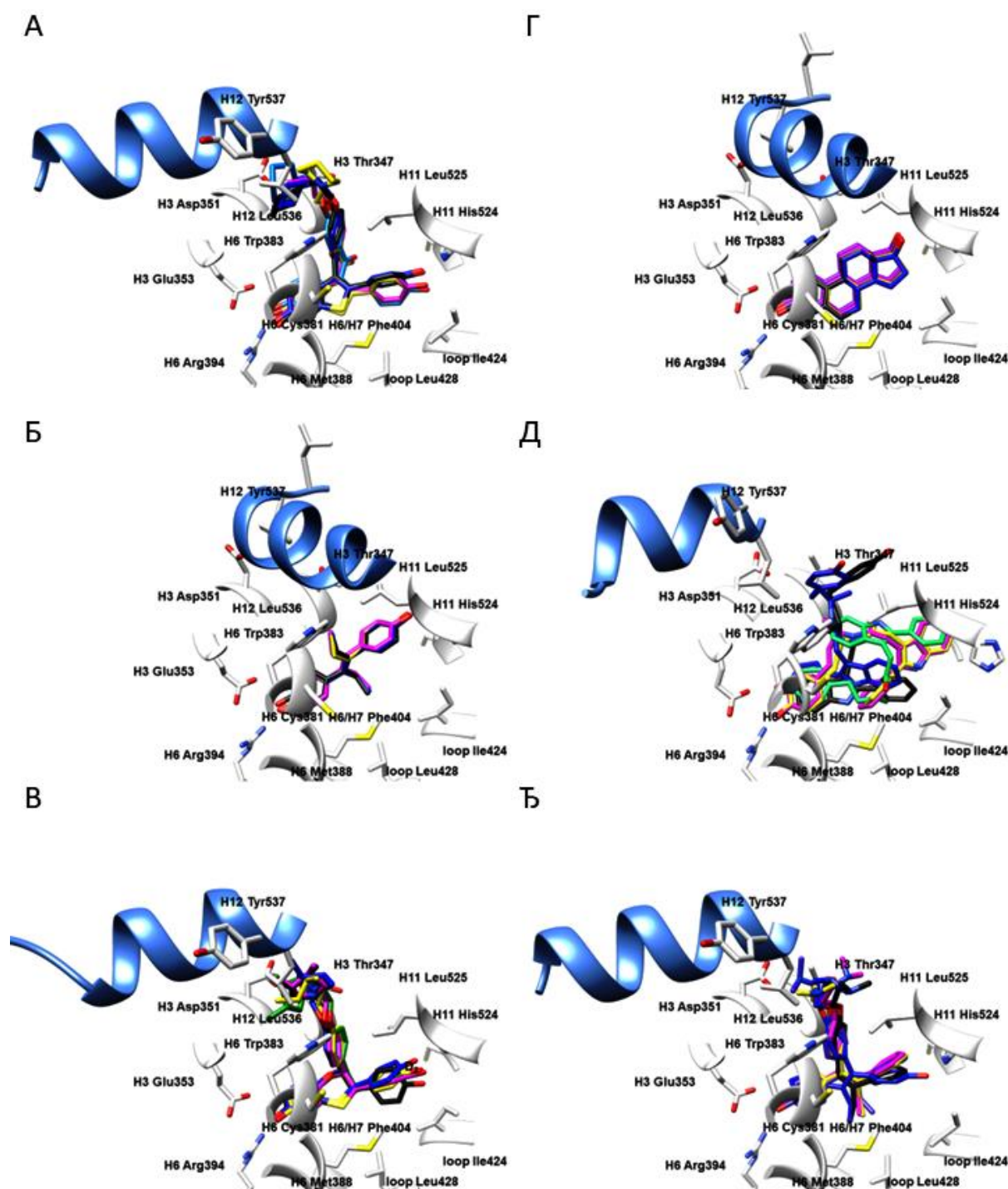
Табела 3.27. Репродукција кристалних структура лигананда ER α мутираног типа на основу структуре молекулске мете током ECRD, RCRD, ECCD и RCCD фаза.

Јед. EC ^a	Glide							
	SP ^b	XP ^b	SP ^b	XP ^b	SP ^b	XP ^b	SP ^b	XP ^b
WT	ERCD		RCRD		ECCD		RCCD	
1ERE	1,932 ^Г	1,944	1,973	1,972	2,203	2,125	2,524	2,225
1ERR	1,413	1,325	1,454	1,403	1,584	1,506	1,905	1,606
1GWQ	3,899	3,811	4,940	4,889	9,070	8,992	9,391	9,092
1R5K	2,477	1,889	2,518	1,967	2,648	2,570	2,969	2,670
1SJ0	1,895	1,807	1,936	1,885	1,966	1,988	2,387	1,988
1X7E	4,280	4,192	4,321	4,270	4,451	4,373	4,772	4,473
1X7R	8,851	8,763	8,892	8,841	9,022	8,944	9,343	9,044
1XP1	2,379	1,991	2,420	2,369	1,550	1,472	1,871	1,572
1XP6	2,148	1,960	2,189	2,138	1,919	1,841	2,640	1,941
1XP9	2,039	1,951	2,080	2,029	1,990	1,932	2,531	1,992
1XPC	1,867	1,779	1,908	1,857	2,038	1,960	2,359	2,060
1XQC	1,838	1,750	1,879	1,828	2,009	1,931	2,330	2,031
1YIM	2,670	2,582	2,711	2,660	2,841	2,763	3,162	2,863
1YIN	2,274	2,186	2,315	2,264	2,445	2,367	2,766	2,467
2BJ4	2,888	2,800	2,929	2,878	3,059	2,981	3,380	3,081
2IOG	1,438	1,350	1,479	1,428	1,609	1,531	1,930	1,631
2IOK	1,742	1,654	1,783	1,732	1,913	1,835	2,234	2,935
3ERD	2,052	1,964	2,093	2,042	2,223	2,145	2,544	2,245
ТД%^А	58,33	72,22	61,11	63,88	55,55	66,66	38,88	55,55
MUT	ERCD		RCRD		ECCD		RCCD	
1L2I	1,358 ^Г	1,248	1,451	1,384	2,651	1,987	2,984	1,989
1UOM	2,432	2,341	2,658	2,684	1,985	1,894	2,251	1,954
2B1Z	1,943	1,894	2,651	2,651	2,215	2,147	2,517	2,541
2QA6	2,453	1,897	2,589	2,517	2,694	2,651	2,614	2,964
2R6W	2,983	2,226	2,654	2,691	3,215	2,894	3,874	2,846
2R6Y	2,599	2,594	2,698	2,478	2,658	2,584	2,659	2,512
4TUZ	1,771	1,559	1,894	1,751	2,121	2,224	2,658	2,229
5AK2	2,345	2,368	2,654	2,546	2,651	2,195	2,651	2,185
ТД%	68,75	75,00	62,50	62,50	50,00	62,50	43,75	62,50

^aЕкспериментална конформација. ^bНајбоља докована конформација добијена помоћу Glide SP модула. ^bНајбоља докована конформација добијена помоћу Glide XP модула. ^ГВредности корена средњих квадрата одступања измерене између тешких атома експерименталне и поновно поравнате конформације лигананда. ^АТачност доковања.

Процена поравњања базираног на структури лигананда

Слично SB протоколима, процена LB поравњања извршена је на парцијалним агонистима и антагонистима ER α ко-кристализованим унутар WT или MT рецептора. LB експерименти су изведени помоћу FLA алата, процењујући FSBA и CSA начине поравњања користећи све доступне функције погодака (LCBMC, MCS и SMARTS) у сва четири нивоа тежине (Табеле 3.28-3.29).



Слика 3.38. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Glide: **1ERR** (A), ЕС плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **3ERD** (Б), ЕС црно, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1XP1** (B), ЕС светлозелена, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1ERE** (Г), ЕС љубичаста, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **2IJK** (Д), ЕС светлозелена, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; и **2BJ4** (Ђ) ЕС љубичаста, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Резултати и дискусија

Узимајући у обзир процену LB поравнања WT и MT (Табеле 3.28 и 3.29, Слика 3.39, Додатни материјал IV: Сlike ДМ13-ДМ16) лиганада ER α , FSBA алгоритам био је најпрецизнији, са тачношћу поравнања већом од 50% на свим нивоима тежин: FLA FSBA показао је највећу тачност LB поравнања лиганда кокрисотализованих унутар WT рецептора од 100,00, 97,22, 55,55 и 50,50% за ECRA, RCRA, ECCA и RCCA кораке, респективно, док су структуре пронађене унутар MUT рецептора репродуковане са тачношћу од 100,00, 100,00, 75,00 и 50,00% за ECRA, RCRA, ECCA и RCCA, тим редоследом, те је као драгоцен алат коришћен у даљим експериментима.

Процена предиктивне способности 3-D PhypI/3-D QSAR модел ансамбла.

Једињења унутар TSCRY (Табела 3.30) или TSMOD1-TSMOD3 (Додатни материјал IV: Табеле ДМ7-ДМ12) била су подвргнута било SB или LB поравнању помоћу Glide XP и FLA FSBA програма, респективно, те учитана у **3-D PhypI/3-D QSAR** модел ансамбл зарад предвиђања активности. Тако, експериментално доступне pK_i вредности TSCRY (неправилно интерпретиране као pIC_{50} вредности) биле су предвиђене са вредностима AAEPs за LOO и LSO CV између 0,66 и 2,35 (средња вредност 1,24) (Табела 3.30). Вредности квадратних коефицијента корелације предвиђања (q^2_{pred}) проистекли из LOO и LSO CV 0,51 односно 0,39.

Активности молекула чије су биоактивне конформације поново поравњане у SB маниру предвиђене су са мањим грешкама у односу на оне који су поново поравнати LB парадигмом: $q^2_{pred}/AAEP$ вредности SB поравнатих TSCRY једињења у односу на $q^2_{pred}/AAEP$ вредности LB поравнатих TSCRY једињења су биле 0,46/1,27 наспрам 0,29/1,37 за LOO CV, односно 0,37/ 1,35 наспрам 0,31/1,40 за LSO CV. Ове вредности указују на добру способност предвиђања **3-D PhypI/3-D QSAR** модел ансамбла.

Са друге стране, активности TSMOD1 у виду pIC_{50} у опсегу од 3,47 до 5,52; предвиђене су са AAEP од 1,41. Ипак, узимајући у обзир само најактивнија једињења (скоро 17% једињења, експерименталне pIC_{50} вредности ниже од 10 μM и близу TR опсега од 5,85-9,52), грешка предвиђања је била значајно мања (AAEP једнака 1,04), што указује на перспективу **3-D PhypI/3-D QSAR** модел ансамбла у кампањи виртуелног скенирања (VS).

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 3.28. Репродукција кристалних структура лиганата EР α природног типа на основу структуре самих лиганата током ЕССА, RCRA, ЕССА и RCCA фаза.

Јед	FSBA ^б			FSBA ^б				
	LCBMC ^б	MCS ^г	SMARTS ^д	LCBMC ^б	MCS ^г	SMARTS ^д		
ЕС^а	ECRA			RCRA				
1ERE	0,884 ^б	1,120	1,248	0,997	1,052	1,550	1,531	1,969
1ERR	0,984	1,652	1,348	1,097	1,152	1,650	1,631	2,069
1GWQ	0,584	0,965	0,948	0,697	0,752	1,250	1,231	1,669
1QKU	0,625	0,594	0,989	0,738	0,793	1,291	1,272	1,710
1R5K	0,984	1,326	1,348	1,097	1,152	1,650	1,631	2,069
1SJ0	1,625	1,562	1,989	1,738	1,793	2,291	2,272	2,710
1X7E	0,685	1,851	1,049	0,798	0,853	1,351	1,332	1,770
1X7R	1,333	1,451	1,697	1,446	1,501	1,999	1,980	2,418
1XP1	0,635	0,894	0,999	0,748	0,803	1,301	1,282	1,720
1XP6	1,025	1,236	1,389	1,138	1,193	1,691	1,672	2,110
1XP9	1,268	1,351	1,632	1,381	1,436	1,934	1,915	2,353
1XPC	1,136	1,025	1,500	1,249	1,304	1,802	1,783	2,221
1XQC	0,782	0,895	1,146	0,895	0,950	1,448	1,429	1,867
1YIM	1,324	1,326	1,688	1,437	1,492	1,990	1,971	2,409
1YIN	1,265	1,158	1,629	1,378	1,433	1,931	1,912	2,350
2BJ4	1,635	1,459	1,999	1,748	1,803	2,301	2,282	2,720
2IOG	1,235	1,741	1,599	1,348	1,403	1,901	1,882	2,320
2IOK	1,845	1,269	2,209	1,958	2,013	2,511	2,492	2,930
3ERD	0,694	0,784	1,058	0,807	0,862	1,360	1,341	1,779
ТП%^е	100,00	100,00	97,22	100,00	97,22	94,44	94,44	61,11
	ЕССА			RCCA				
1ERE	1,859	2,212	2,826	2,481	2,608	2,577	2,726	2,725
1ERR	1,959	2,312	2,926	2,581	2,708	2,677	2,826	2,825
1GWQ	1,559	1,912	2,526	2,181	2,308	2,277	2,426	2,425
1QKU	1,600	1,953	2,567	2,222	2,349	2,318	2,467	2,466
1R5K	1,959	2,312	2,926	2,581	2,708	2,677	2,826	2,825
1SJ0	2,600	2,953	3,567	3,222	2,349	3,318	3,467	3,466
1X7E	1,660	2,013	2,627	2,282	2,409	2,378	2,527	2,526
1X7R	2,308	2,661	3,275	2,930	2,057	3,026	3,175	3,174
1XP1	1,611	1,963	2,577	2,232	2,359	2,328	2,477	2,476
1XP6	2,000	2,353	2,967	2,622	2,749	2,718	2,867	2,866
1XP9	2,243	2,596	3,210	2,865	2,992	2,961	3,110	3,109
1XPC	2,111	2,464	3,078	2,733	2,860	2,829	2,978	2,977
1XQC	1,757	2,110	2,724	2,379	2,506	2,475	2,624	2,623
1YIM	2,299	2,652	3,266	2,921	2,048	3,017	3,166	3,165
1YIN	2,240	2,593	3,207	2,862	2,989	2,958	3,107	3,106
2BJ4	2,610	2,963	3,577	3,232	2,359	3,328	3,477	3,476
2IOG	2,210	2,563	3,177	2,832	2,959	2,928	3,077	3,076
2IOK	2,820	3,173	3,787	3,442	2,569	3,538	3,687	3,686
3ERD	1,669	2,022	2,636	2,291	2,418	2,387	2,536	2,535
ТП%	55,55	77,77	27,77	44,44	50,00	38,88	30,55	30,55

^аЕкспериментална конформација. ^бFSBA конформација. ^вCSA: LCBMC конформација. ^гCSA: MCS конформација. ^дCSA: SMARTS конформација. ^бВредности корена средњих квадрата одступања измерене између тешких атома експерименталне и поновно поравнате конформације лиганда. ^еТачност поравнања.

Резултати и дискусија

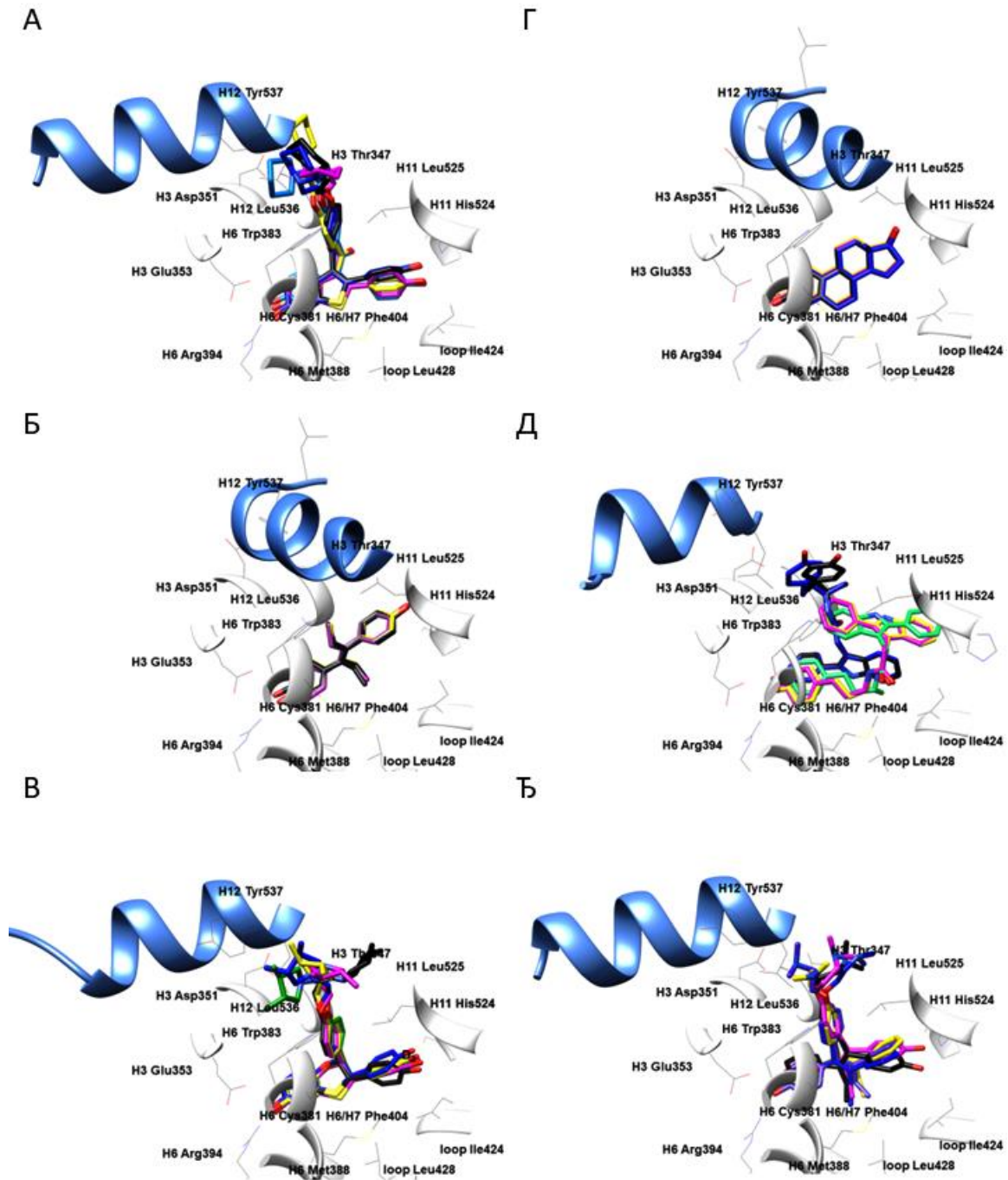
Табела 3.29. Репродукција кристалних структура лигананда ER α мутираног типа на основу структуре самих лигананда током ECCA, RCRA, ECCA и RCCA фаза

Јед	FSBA ^б	CSA			FSBA ^б	CSA			
		LCBMC ^б	MCS ^г	SMARTS ^д		LCBMC ^б	MCS ^г	SMARTS ^д	
ЕС^а		ECRA				RCRA			
1L2I	1,141 ^б	1,481	1,594	1,845	1,915	1,784	2,116	1,978	
1UOM	1,241	1,594	1,953	1,561	1,594	2,849	1,162	1,774	
2B1Z	0,841	1,658	1,597	0,849	1,249	2,624	1,596	1,362	
2QA6	0,882	1,854	1,595	0,695	1,625	1,658	1,694	1,547	
2R6W	1,241	1,516	2,621	1,398	1,748	1,241	2,623	1,462	
2R6Y	1,882	1,557	1,298	2,016	1,449	2,336	2,165	1,548	
4TUZ	0,942	1,658	0,584	0,594	1,326	1,856	1,965	1,698	
5AK2	1,590	1,684	1,953	1,894	1,874	1,984	2,856	2,654	
ТП%^е	100,00	100,00	97,22	97,22	100,00	81,25	75,00	61,11	
		ECCA				RCCA			
1L2I	2,654	2,784	2,548	2,710	2,739	2,739	3,125	2,825	
1UOM	2,842	2,652	2,659	2,810	2,839	2,839	3,225	2,925	
2B1Z	1,695	2,326	2,514	2,410	2,439	2,439	2,825	2,525	
2QA6	2,953	2,996	5,652	2,451	2,480	2,480	2,866	2,566	
2R6W	1,985	2,152	2,598	2,810	2,839	2,839	3,225	2,925	
2R6Y	1,965	3,326	3,625	3,451	2,480	3,480	3,866	3,566	
4TUZ	2,564	2,856	2,594	2,511	2,540	2,540	2,926	2,626	
5AK2	1,659	2,659	2,695	3,159	2,188	3,188	3,574	3,274	
ТП%	75,00	43,75	37,50	37,50	50,00	37,50	18,75	37,50	

^аЕкспериментална конформација. ^бFSBA конформација. ^вCSA: LCBMC конформација. ^гCSA: MCS конформација. ^дCSA: SMARTS конформација. ^еВредности корена средњих квадрата одступања измерене између тешких атома експерименталне и поновно поравнате конформације лиганда. ^еТачност поравнања.

Надаље, екстерно предвиђање активности једињења унутар TS_{MOD2} (pK_i-заснован тест сет) и TS_{MOD3} (pRBA-заснован тест сет) од стране **3-D PhypI/3-D QSAR модел** ансамбла, било је окарактерисано са AAEP вредностима од 1,78, односно 1,81, респективно. Опет, слично као за TS_{CRY}, pK_i и pRBA су погрешно интерпретиране као pIC₅₀ вредности: интерно спроведено виртуелно скенирање унутар TS_{MOD2} тест сета резултирао је препознавањем 50% једињења са предвиђеним активностима већим од 7 (100 nM), међу којима је 78% погодака имало pK_i вредности у распону од 7,25 до 9,08; међу TS_{MOD3} једињењима (pRBA у опсегу 1,45 до 6,72), 40% је имало предвиђену pRBA вредност већу од 7.

Закључно, **3-D PhypI/3-D QSAR модел** ансамбл представља, било на SB или на LB нивоу, драгоцен алат за дизајн лекова или VS када се разматра дизајн или одабир нових моћнијих ER α антагониста/парцијалних агониста.



Слика 3.39. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α виртуелно поравњаних у активном центру ER α помоћу програма FLA: **1ERR** (A), EC плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **3ERD** (Б), EC црно, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1XP1** (B), EC светло зелено, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1ERE** (Г), EC виолет, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **2IOK** (Д), EC светло зелено, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; и **2BJ4** (Ђ) EC љубичасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Резултати и дискусија

Табела 3.30. Примена **3-D PhysI/3-D QSAR** модел ансамбла проистеклог на SB/LB предвиђање активности једињења унутар TC_{CRY}.

Унос	pK _i	ЕС пред. pK _i ^a		AAEP ^г	SB пред. pK _i ^a		AAEP ^д	LB пред. pK _i ^a		AAEP ^г
		LOO ^б	LSO ^в		LOO ^б	LSO ^в		LOO ^б	LOO ^б	
3ERT	9,60	8,76	8,64	0,90	8,36	8,34	1,25	7,99	8,12	1,55
3UU7	8,79	8,14	6,91	1,27	8,09	7,22	1,14	7,85	7,14	1,30
3UUA	8,79	8,15	7,54	0,94	7,05	7,12	1,71	8,07	7,37	1,07
3UUC	5,70	4,36	4,39	1,33	4,45	4,06	1,45	5,67	6,77	0,55
4DMA	5,60	6,54	7,69	1,52	7,91	7,59	2,15	8,86	7,70	2,68
4MG6	6,00	4,76	4,77	1,24	4,17	3,03	2,40	4,16	4,82	1,51
4MG8	10,00	8,86	8,87	1,14	9,16	7,76	1,54	8,99	8,85	1,08
4MG9	6,00	7,12	6,52	0,82	6,19	4,10	1,05	4,51	5,96	0,77
4MGA	6,00	8,13	6,99	1,56	7,13	6,89	1,01	7,41	4,98	1,22
4MGC	7,00	8,66	6,70	0,98	6,36	6,54	0,55	7,58	5,85	0,87
4MGD	6,00	7,66	9,04	2,35	8,46	7,13	1,80	9,19	9,48	3,34
4TUZ	10,00	8,64	8,88	1,24	9,17	7,52	1,66	9,06	8,70	1,12
4ZN9	9,60	8,96	8,92	0,66	8,74	7,06	1,70	8,78	8,49	0,97

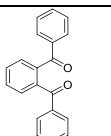
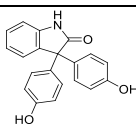
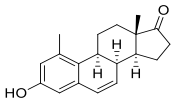
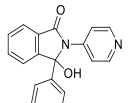
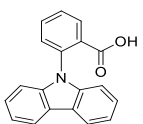
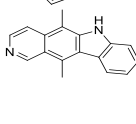
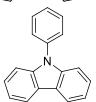
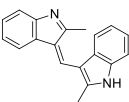
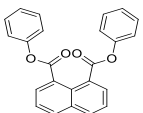
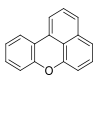
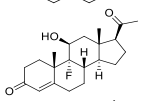
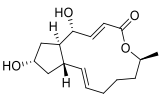
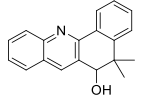
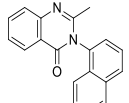
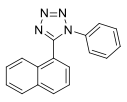
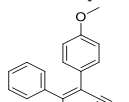
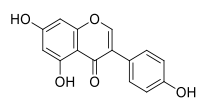
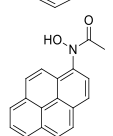
^aПредвиђања добијена **3-D PhysI/3-D** моделима оптимизованих са LOO и LSO унакрсном валидацијом. ^бLOO унакрсна валидација. ^вLSO унакрсна валидација са 5-random-groups-out. ^гAAEP, просечна апсолутна грешка предвиђања LOO и LSO унакрсних валидација.

Виртуелно скенирање, антиканцерогена активност и анализа биоактивне конформације брефелдина А као поготка за hit-to-lead оптимизацију према иновативним једињењима са SERM фармакологијом

3-D PhysI/3-D QSAR модел ансамбл упарен заједно са најбољим SB/LB алатима, коришћен је за виртуелно скенирање (SB/LB VS) 4411 једињења чије су сктруктура депоноване у бази National Cancer Institute (<https://www.cancer.gov/>) у оквиру три сета (NCI Natural Products 3, 486 једињења; NCI Diversity Sets 2 и 3, 1574 и 2351 једињења, респективно). Као резултат виртуелног скенирања издвојено је 18 погодака (Табела 3.31, Додатни материјал IV: Сlike ДМ17-ДМ19) чије су pIC₅₀ вредности предвиђене у односу на ER α , након чега су једињења потврђена као парцијални агонисти ER α и антипролиферативни агенси против MCF-7, MDA-MB-231 и MRC-5 ћелијских линија (Табела 3.32). Једињење означено као **NCI89671**, односно природно једињење Брефелдин А (енг. Brefeldin A, **BFA**, Слика 3.40А), као агенс са најбоље предвиђеном активношћу, испољило је значајну активност парцијалног агониста (фармакологија парцијалног агониста антиципирана је након биоактивне конформације добијене унакрсним доковањем) против ER α (IC₅₀ једнако 8,34 μ M), антипролиферативну активност против MCF-7 ћелијских линија (IC₅₀ једнако 9,01 μ M) и селективност у односу на MDA-MB-231 ћелијску линију (SI једнак 11,10).

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 3.31. NCI кодови, структуре лигананда и афинитети 18 виртуелно скенираних парцијалних агониста против WT или MUT ER α , као и просечни скорови LB поравнања против једињења унутар TR.

NCI ID	Структура лигананда	WT ^a /MUT ^b ER α BA (kcal/mol)	LB ASCORE ^B vs. TR	NCI ID	Структура лигананда	WT ^a /MUT ^b ER α BA (kcal/mol)	LB ASCORE ^B vs. TR
6145		-9,40 ^a -9,10 ^b	0,451	59814		-9,70 -9,00	0,398
9782		-10,80 -9,70	0,534	69359		-10,10 -9,00	0,371
10211		-10,20 -9,40	0,497	71795		-9,80 -9,30	0,465
10416		-9,70 -9,50	0,364	76747		-9,70 -9,50	0,459
16437		-9,20 -10,00	0,365	85239		-9,40 -8,70	0,448
17128		-9,30 -9,60	0,597	89671		-9,80 -9,00	0,574
19824		-11,00 -10,50	0,464	93427		-9,40 -8,60	0,451
30813		-10,00 -9,50	0,439	101789		-9,60 -9,10	0,481
36586		-9,10 -9,00	0,459	645330		-9,40 -9,00	0,418

^aПросечна вредност афинитета везивања након експеримента унакрсног доковања против естроген рецептора α природног типа користећи Glide XP протокол молекулског доковања. ^bПросечна вредност афинитета везивања након експеримента унакрсног доковања против естроген рецептора α мутираног типа користећи Glide XP протокол молекулског доковања; ^BПросечни резултат унакрсног у односу на једињења TR користећи FLA FSBA протокол поравнања.

Резултати и дискусија

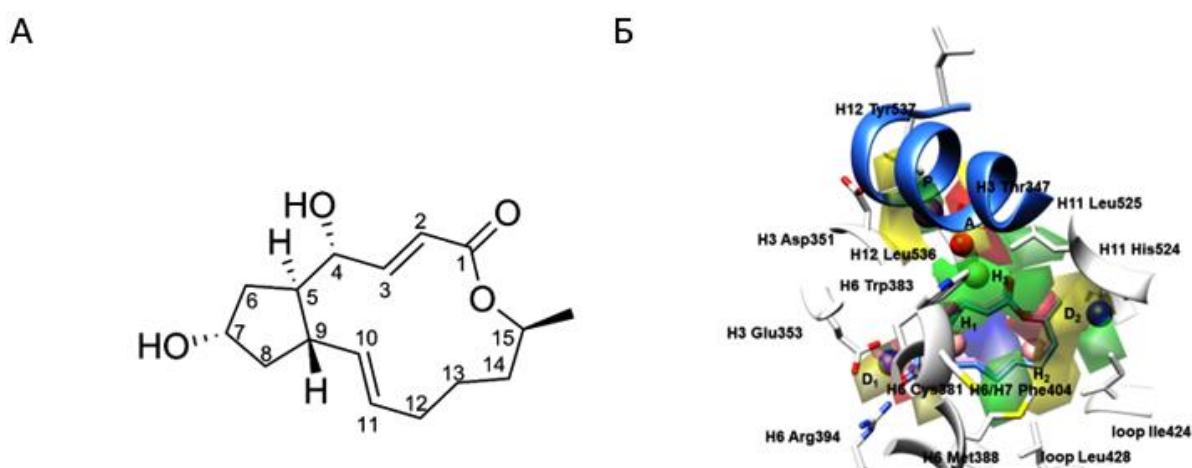
Табела 3.32. SB и LB предвиђене и експериментално одређене вредности активности виртуелно скенираних погодака против ER α , антипролиферативна активност и индекс селективности против хормон-зависних MCF-7 и хормон-независних MDA-MB-231 ћелијских линија канцера дојке, антипролиферативна активност против нормалних MRC-5 ћелијских линија фибробласта хуманог плућног ткива.

NCI ID	SB. пред. pIC ₅₀ ^a	LB. пред. pIC ₅₀ ^b	ER α ^b (IC ₅₀ μ M)	MCF-7 ^c (IC ₅₀ μ M)	MDA-MB-231 ^d (IC ₅₀ μ M)	SI ^e	MRC-5 ^e (IC ₅₀ μ M)
6145	4,02	3,78	75,54 \pm 6,34 ^{ж†‡§}	93,42 \pm 11,36 ^{†‡§}	> 100 ^{‡§}	NA	> 100
9782	4,11	3,59	53,21 \pm 3,42 ^{†‡§}	57,35 \pm 8,23 ^{†‡§}	> 100 ^{‡§}	НД	> 100
10211	3,98	4,14	66,93 \pm 5,12 ^{†‡§}	73,94 \pm 3,35 ^{†‡§}	> 100 ^{‡§}	НД	> 100
10416	4,41	4,18	74,83 \pm 2,43 ^{†‡§}	89,03 \pm 9,24 ^{†‡§}	> 100 ^{‡§}	НД	> 100
16437	4,02	3,76	61,35 \pm 3,14 ^{†‡§}	67,13 \pm 3,31 ^{†‡§}	86,43 \pm 5,45 ^{‡§}	1,29 ^{‡§}	34,84 \pm 1,26 ^{‡§}
17128	4,44	4,12	64,31 \pm 3,43 ^{†‡§}	67,53 \pm 11,93 ^{†‡§}	92,94 \pm 3,84 ^{‡§}	1,38 ^{‡§}	23,65 \pm 2,94 ^{‡§}
19824	3,77	3,65	97,31 \pm 4,14 ^{†‡§}	> 100 ^{†‡§}	> 100 ^{‡§}	НД	> 100
30813	4,61	4,87	73,94 \pm 6,11 ^{†‡§}	83,72 \pm 7,35 ^{†‡§}	> 100 ^{‡§}	НД	> 100
36586	3,56	3,96	> 100 ^{†‡§}	> 100 ^{†‡§}	> 100 ^{‡§}	НД	> 100
59814	4,26	4,58	43,92 \pm 2,43 ^{†‡§}	53,95 \pm 5,32 ^{†‡§}	83,41 \pm 7,65 ^{‡§}	1,54 ^{‡§}	> 100
69359	4,03	3,61	58,02 \pm 4,12 ^{†‡§}	61,63 \pm 3,43 ^{†‡§}	34,21 \pm 6,59 ^{‡§}	0,56 ^{‡§}	51,52 \pm 2,64 ^{‡§}
71795	3,86	3,48	54,35 \pm 1,22 ^{†‡§}	77,77 \pm 4,42 ^{†‡§}	> 100 ^{‡§}	1,29 ^{‡§}	> 100
76747	3,99	4,19	47,72 \pm 2,43 ^{†‡§}	52,63 \pm 2,54 ^{†‡§}	45,36 \pm 3,54 ^{‡§}	0,86 ^{‡§}	> 100
85239	4,07	4,59	55,85 \pm 3,41 ^{†‡§}	69,63 \pm 3,46 ^{†‡§}	8,45 \pm 3,74 ^{‡§}	0,12 ^{‡§}	25,92 \pm 1,59 ^{‡§}
89671	5,09	5,06	8,34 \pm 2,43 ^{†‡§}	9,01 \pm 2,78 ^{†‡§}	> 100 ^{‡§}	11,10 ^{‡§}	> 100
93427	3,22	3,49	> 100 ^{†‡§}	> 100 ^{†‡§}	162,24 \pm 6,45 ^{‡§}	1,62 ^{‡§}	> 100
101789	4,81	4,97	17,94 \pm 1,32 ^{†‡§}	25,93 \pm 3,35 ^{†‡§}	> 100 ^{‡§}	НД	14,23 \pm 1,57 ^{‡§}
645330	4,81	4,78	35,31 \pm 3,24 ^{†‡§}	44,72 \pm 3,43 ^{†‡§}	35,78 \pm 2,78 ^{‡§}	0,80 ^{‡§}	24,78 \pm 2,47 ^{‡§}
			(IC ₅₀ nM)	(IC ₅₀ nM)	(IC ₅₀ nM)		(IC ₅₀ nM)
E ₂ ³	8,98	8,86	0,91 \pm 0,34	НД	НД	НД	НД
4-ОHT. ^н	8,91	8,84	1,16 \pm 0,21	1,24 \pm 0,32	37,04 \pm 0,32	29,87	>100
Ral. ^ј	9,04	9,00	0,77 \pm 0,31	0,90 \pm 0,22	93,12 \pm 0,24	103,47	>100
Контрола ^к	НД ^п	НД	НД	НД	НД	НД	НД

^aSB предвиђена активност виртуелно скенираних погодака помоћу 3-D PhypI/3-D QSAR модел ансамбла. ^bLB предвиђена активност виртуелно скенираних погодака помоћу 3-D PhypI/3-D QSAR модел ансамбла. ^cКонцентрација која антагонира 50% сигналне активности ER α . ^dКонцентрација која спречава раст 50% MCF-7 ћелијских линија; ^eКонцентрација која спречава раст 50% MDA-MB-231 ћелијских линија; ^fИндекс селективности (енг. selectivity index, SI) према ћелијским линијама: [IC₅₀(MDA-MB-231)]/[IC₅₀(MCF-7)] зарад дефинисања антипролиферативног ефекта било дизајнираних једињења или референтних једињења; ^gКонцентрација која спречава раст 50% MRC-5 ћелијских линија (ћелијских линија хуманих фибробласта плућа, као позитивне контроле); ^жРезултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација; ^з17 β -естрадиол; ^н4-хидрокситамоксифен (енг. 4-hydroxytamoxifen, 4-ОHT); ^јРалоксифен (енг. Raloxifene, Ral); ^к0.9% NaCl; ^пНије дефинисано. *p < 0,05 када се пореди са контролном групом; †p < 0,05 када се пореди са E₂; ‡p < 0,05 када се пореди са 4-ОHT; §p < 0,05 када се пореди са Ral.

Ипак, BFA је било доста слабије активности у односу на E₂ (ако се хормон посматра као парцијални агонист), 4-ОHT или Ral (Табела 3.32). Након интеракције са ER α , BFA (Слика 3.40А) испољио је фармакологију парцијалног агониста,

дозвољавајући Н12 да остане у затвореној конформацији (Слика 3.40Б). Тако, С7-ОН група циклопентанског прстена **BFA** формирала је водоничне везе са Н3 Glu353 и са Н6 Arg394 ($d_{\text{НВ}} = 2,855$ и $2,990 \text{ \AA}$, респективно). Даље, С4-ОН група била је електростатички привучена од стране Н3 Glu353. С друге стране, позиционирање С15-СН₃ групе према Н11 His524 могло би се сматрати неповољним са становишта **3-D PhypI/3-D QSAR модел** ансамбла, имплицирајући неопходност супституције са НВА/НВД функционалном групом. Као последица ове неповољне интеракције, С1-до-С4 карбонска конструкција била је усмерена према Н12, док је С9-до-С15 угљенични скелет бо укључен у стерне интеракције са Н6 Met388 и аминокиселинама Ile423 и Leu428 унутар структуре насумице увијања између Н6 и Н7. Ипак, позиционирање С1 карбонилне групе у „ничјој земљи“, далеко од било какве значајне интеракције, није било у складу са препорукама **3-D PhypI/3-D QSAR модел** ансамбла, индицирајући да би С1 карбонилна група требала да буде ефикасније искоришћена као НВА. **3-D PhypI/3-D QSAR модел** ансамбл препоручио је трансформацију С15-СН₃ групе у С15-ОН (или биоизостерно сличан фрагмент) што би могло да резултује хоризонталном ротацијом језгра **BFA** ка Н3 Glu353 и са Н6 Arg394, у исто време позиционирајући С7-ОН групу циклопентановог прстена ка Н11 His524 (што је поравнање упоредиво са позиционирањем С17-ОН групе D прстена **E₂**). У таквом сценарију, С1 карбонилна група била би усмерена ка Н3 Glu353 док би С-4 ОН група постала реакциони центар за имплементацију остатка који садржи **Ph**. Надаље је валидност ових постулата испитана након структурне оптимизације **BFA** као иновативним антагонистима ER α .



Слика 3.40. Структура **NCI89671** (односно **BFA**) и његова номенклатура (А); SB/LB виртуелно скениране конформације **NCI89671**, SB конформација плава, LB конформација розе (Б).

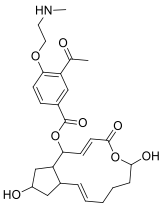
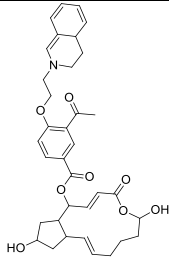
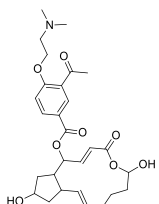
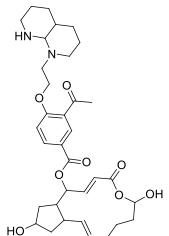
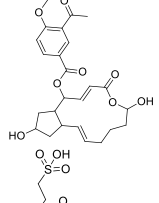
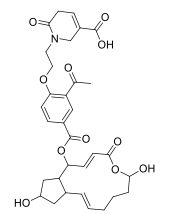
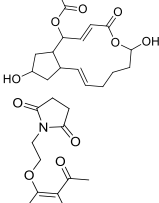
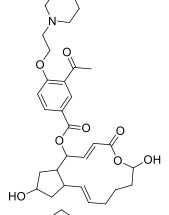
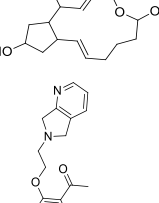
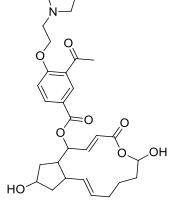
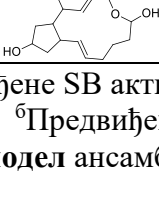
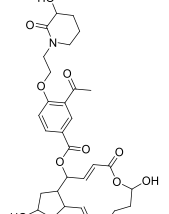
Резултати и дискусија

Правила за рационални дизајн нових деривата брефелдина А као антагониста ER α

Структурна оптимизација **BFA** ка новим ER α SERMs (Табела 3.33) надаље је извршена уважавањем препорука **3-D PhypI/3-D QSAR** модел ансамбла. Да би се успело у конвезрији *парцијални агонист-до-антагонист*, предузети су следећи кораци:

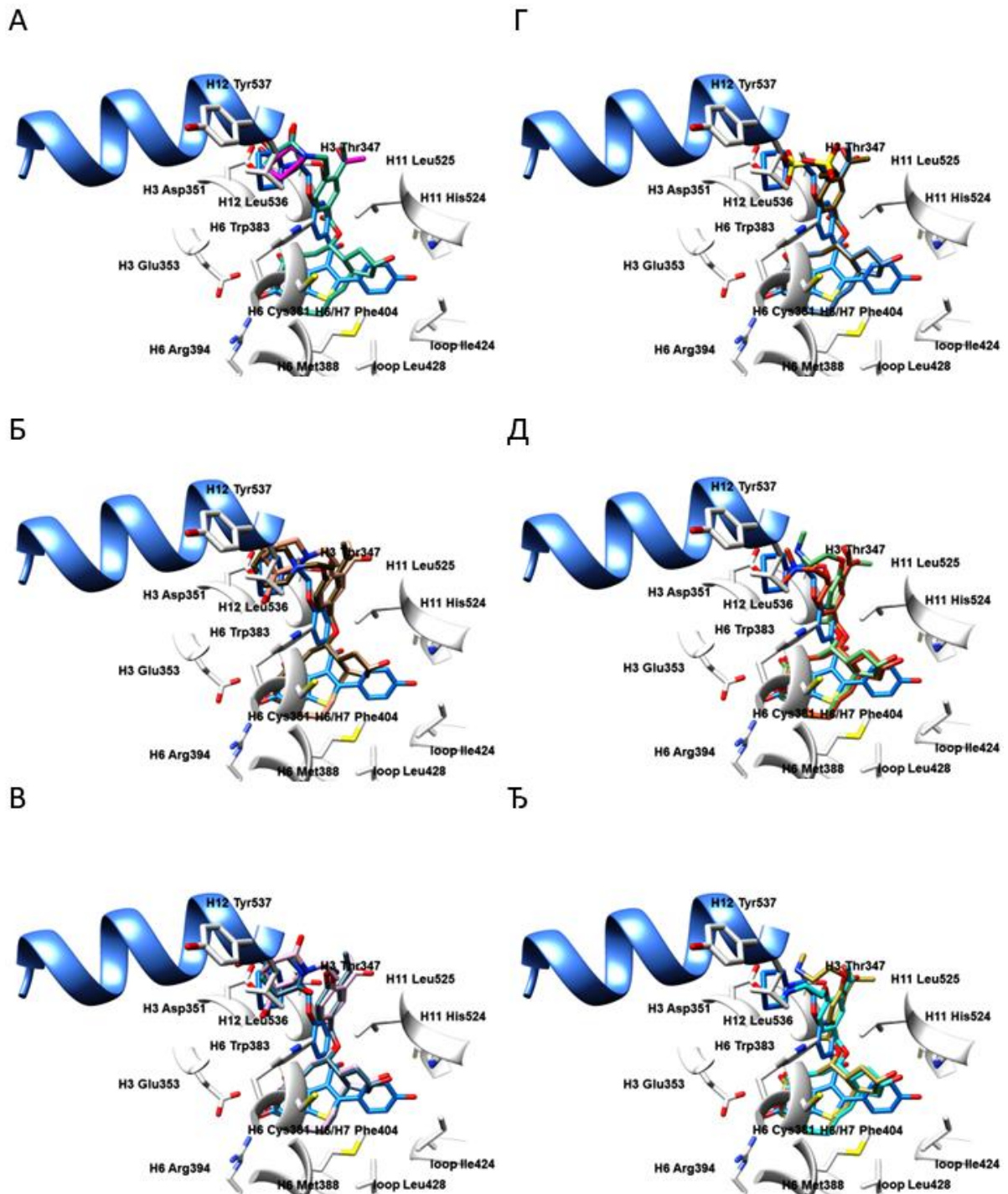
1. C15-CH₃ група **BFA** супституисана је C15-OH групом у сврху увођења додатне мешовите HBA/HBD функционалне групе и повећања капацитета једињења за успостављање водоничних веза било са H3 Glu353 и H6 Arg394 или H11 His524;
2. C4-OH група **BFA** супституисана је 3-ацетил-4-хидроксибензојевом киселином ради успостављања интеракција са H6 Trp383 и H3 Thr347, као и да би се стабилизовала H3 Thr347-Leu525-H12 Leu536 хидрофобна мрежа и последична дислокација H12. Избор 3-ацетил-4-хидроксибензојеве киселине као C4-OH супституента BFA био је експериментално условљен обзиром на чињеницу да покушаји да се синтетички инкорпорира 1-(1,4-дихидроксинафтален-2-ил)етанол (видети даљи текст), фрагмент коришћен у синтези једињења из **СВЕ** серије и можда повољнији у смислу интеракција са H6 Trp383, нису били успешни;
3. *p*-OH група 3-ацетил-4-хидроксибензојеве киселине даље је дериватизована било дериватима етаноламина, носиоцима примарних и секундарних амина, различитим *N*-, *O*-, и *N,O*-хетероциклима, односно 2-хидроксиетансулфонском киселином, тј. структурним фрагментима способним да изазову дислокацију AF-2 функције. Примарни амин, секундарни амин и 2-хидроксиетансулфонска киселина изабрани су за интеракцију са AF-2 функцијом да би смањили стерни притисак према H12, у исто време са способношћу да формирају водоничне везе са H3 Asp351. Са друге стране, како **3-D PhypI/3-D QSAR** модел ансамбл није био експлицитан да ли треба задржати стерни притисак према H12 или га треба потпуно редуковати, различити *N*-, *O*-, и *N,O*-хетероцикли изабрани су као биоизостери хетероцикала доступних унутар TR (Табеле 2.1 и 2.2) на начин да њихове HBD функционалне групе могу примарно остварити интеракцију са H3 Asp351, тако изазивајући, поред стерног притиска, индуковано прилагођавање H12, док би постојеће HBA функционалне групе могле продуковати додатне повољне интеракције са аминокиселима из окружења.

Табела 3.33. Структуре пројектованих погодака и њихове предвиђене активности против ER α .

#	Структура лиганда	3DPhypI/3-D QSAR		#	Структура лиганда	3DPhypI/3-D QSAR	
		пред. pIC ₅₀ XP ^a	LB ^b			пред. pIC ₅₀ XP ^a	LB ^b
3DPQ-1		9,20	9,17	3DPQ-7		9,26	9,11
3DPQ-2		9,21	9,12	3DPQ-8		9,04	8,95
3DPQ-3		9,37	9,29	3DPQ-9		9,31	9,26
3DPQ-4		9,26	9,22	3DPQ-10		9,18	9,05
3DPQ-5		9,05	8,92	3DPQ-11		9,12	9,28
3DPQ-6		9,01	8,91	3DPQ-12		9,42	9,35

^aПредвиђене SB активности дизајнираних једињења помоћу 3DPhypI/3-D QSAR модел ансамбла; ^bПредвиђене LB активности дизајнираних једињења помоћу 3DPhypI/3-D QSAR модел ансамбла.

Резултати и дискусија



Слика 3.41. Преклапање између дизајнираних једињења **3DPQ-12** (А), SBC светло зелено-плава, LBC ружичаста; **3DPQ-3** (Б), SBC браон, LBC боја орхидеје **3DPQ-9** (В), SBC тамнозелено-плава, LBC ружичаста; **3DPQ-4** (Г), SBC плава, LBC смеђа; **3DPQ-2** (Д), SBC црвена, LBC зелена; **3DPQ-1** (Ђ) SBC плава, LBC жуто-зелена; и **1ERE**, ЕС плаво, унутар ER α активног центра. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Дванаест дизајнираних једињења, која су припадала серији базираној на **3-D PhysI/3-D QSAR** модел ансамблу, тј. **3DPQ** серији, потом је подвргнуто SB/LB поравнању (Слика 3.41, Додатни материјал IV: Слика ДМ20) и предвиђању pIC_{50} вредности у односу на $ER\alpha$ (Табела 3.33). На овај начин, дизајнирана једињења сачињавала су ултимативни предикциони сет за **3-D PhysI/3-D QSAR** модел ансамбл, у коме су придружене вредности q^2_{pred} и AAEP за SB и LB моделе износиле 0,858/0,045 и 0,732/0,1, респективно. Активност чак осам једињења, означених као **3DPQ-12**, **3DPQ-3**, **3DPQ-9**, **3DPQ-4**, **3DPQ-2**, **3DPQ-1**, **3DPQ-7** и **3DPQ-11**, била је предвиђена да буде већа од **1ERR** (најактивнијег једињења унутар TR).

Синтеза деривата Брефелдина А **3DPQ-1** до **3DPQ-12**

Дизајнирана једињења од **3DPQ-1** до **3DPQ-12** потом су синтетисана у високим приносима и степенима чистоће (Шема 3.10). Структуре синтетисаних једињења потврђене су одговарајућим 1H NMR, ^{13}C NMR, ^{15}N NMR и ^{17}O NMR спектрима (Додатни материјал IV: Сlike ДМ21-ДМ173), док је чистоћа једињења већа од 95% потврђена одговарајућим HPLC спектрима (Додатни материјал IV: Сlike ДМ174-ДМ185).

Синтеза језгра врло сличног оном у **BFA** започела са процедуром приправе алдехида **R1** (принос од 87%), према претходно публикованом протоколу двостепене модификације комерцијално доступног 1,5-пентандиола: производ реакције садржао је алдехидну функционалну групу на пређашњем положају C1-OH и C5-OH групу заштићену *tert*-бутилдиметилсилил хлоридом (енг. *tert*-butyldimethylsilyl chloride, TBS-Cl) [402]. Након тога, алдехид **R1** конвертован је у геминални диол **R2** (принос од 88%), интермедијер чија је једна од геминалних хидроксилних група била метилована да би формирала прекурсор оног што ће постати C15 метил група **BFA**: конверзија је извршена асиметричном адицијом диметилцинк и употребом (-)-1,8-диазабицикло [5.4.0]ундек-7-ена (енг. (-)-1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, (-)-DBNE) као хиралног лиганда на температури од 0°C, након чега је **R2** пречишћен флеш хроматографијом на колони силика гела ($Et_2O:EtOAc = 10:1$ v/v као елуент) [403]. Потом је **R2** модификован у смислу депротекције хидроксилне групе која је била заштићена TBS-ом помоћу 1*N* HCl до добијања **R3** (95% приноса), који је даље конвертован до 1-фенил-1*H*-тетразол-5-тиол деривата **R4** (70% приноса, продукт пурификован флеш хроматографијом на колони силика гела, $Et_2O:EtOAc = 40:1$ v/v као елуент) помоћу Mitsunobu реакције која је подразумевала: (i) заштиту слободне хидроксилне групе геминалног диола са TBS-

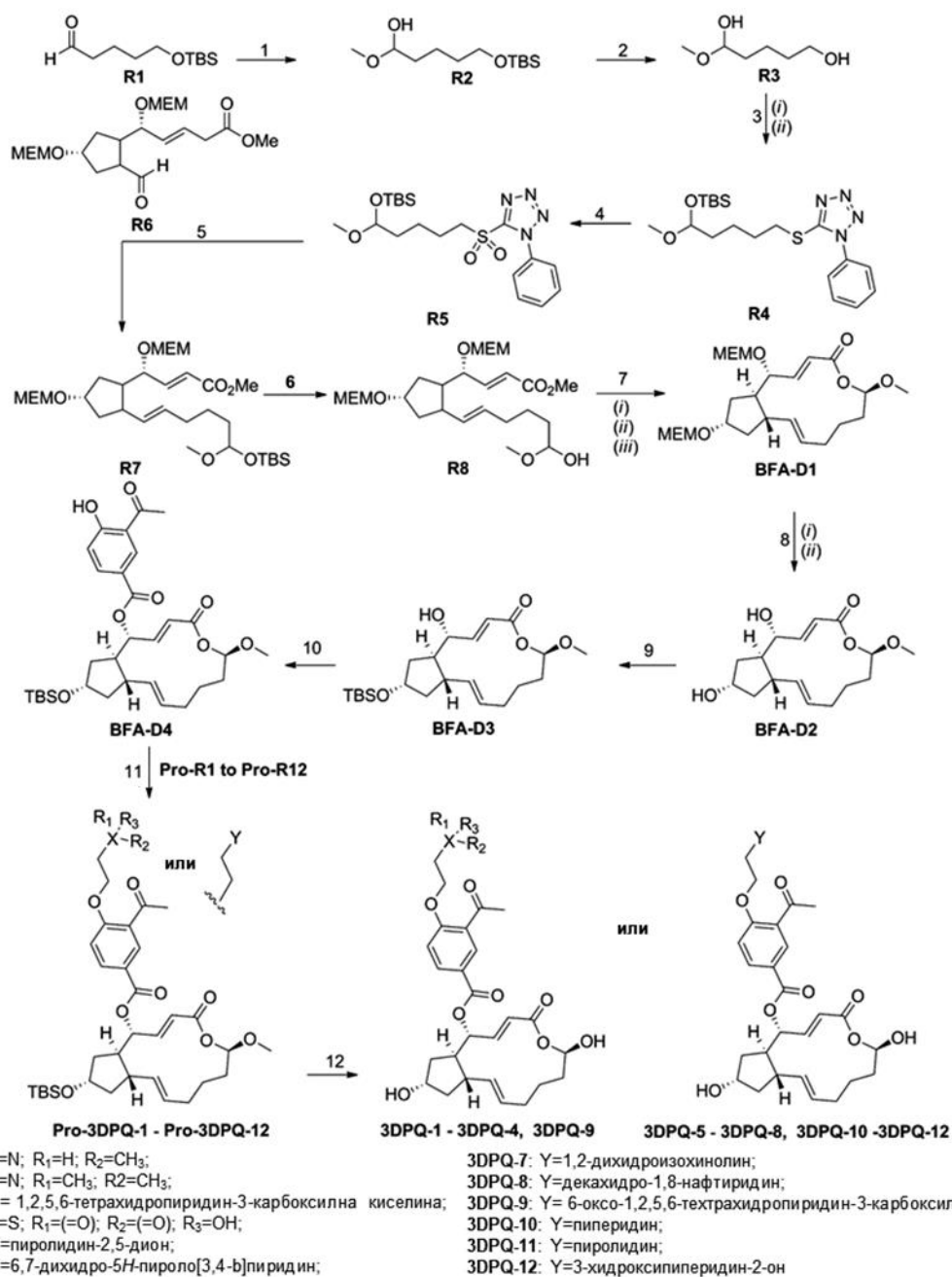
Резултати и дискусија

Cl; (ii) адисију 1-фенил-1*H*-тетразол-5-тиола у сувом THF на C5-OH групу **R3**, као и инклузију TBS-Cl у имидазолу и 4-(диметиламино)пиридина (енг. 4-(dimethylamino)pyridine, DMAP) на хидроксилну групу геминалног диола [263]. Потом је Mo(VI)-катализована оксидација **R4** дала тетразолил сулфон **R5** (75% приноса), рафиниран флеш хроматографијом на колони силика гела (Et₂O:EtOAc = 2:1 v/v као елуент) [263], који је даље подвргнут Julia–Kocienski олефинацији са **R6** (реактантом припремљеним по претходно описаној процедури и приносу од 67% [404,405] који је садржао хидроксилне групе заштићене MEM-ом), коришћењем калијум хексаметилдисилазида (енг. potassium hexamethyldisilazide, KHMDS) у толуену као бази, да би се добио *E*-олефин **R7** са приносом од 73% [406,407]. Затим је селективна депротекција хидроксилне групе унутар геминалног диола заштићене TBS-ом са 1*N* HCl дала **R8** (88% приноса), производ пречишћен флеш хроматографијом на колони силика гела (Et₂O:EtOAc = 3:1 v/v као елуент) [263].

Након тога је **R8** подвргнут Yamaguchi-јевој макролактонизацији у више корака, дајући дериват 1 Брефелдина А (**BFA-D1**, принос од 88%) [408]: (i) метил естар једињења **R8** (тј. функционална група која је уведена са **R6**) хидролизован је помоћу 1*N* LiOH; (ii) Yamaguchi-јев реагенс (2,4,6-трихлоробензоил хлорид) додат је у карбоксилну киселину, у окружењу NEt₃, што је резултовало стварањем мешовитог анхидрида (производ који није изолован); (iii) реакција анхидрида са хидроксилном групом геминалног диола у присуству DMAP резултовала је стварањем лактона **BFA-D1** у коме је C15 метил група из **BFA** успешно трансформисана у метокси групу. Потом су са **BFA-D1** уклоњене MEM заштитне функционалне групе помоћу cсHBr [409], након чега је добијен **BFA-D2**, пречишћен помоћу флеш хроматографијом на колони силикагела (Et₂O:EtOAc = 1:1 v/v као елуент) и прекристализован из MeOH у приносу од 75% [263].

Затим је C7-OH група **BFA-D2** тенденциозно заштићена *tert*-бутилдиметилсилил трифлуорометансулфонатом (енг. *tert*-butyldimethylsilyl trifluoromethanesulfonate, TBSOTf) у 2,6-лутидину, да би се добио **BFA-D3** у умереном приносу (25%, након пречишћавања флеш хроматографијом на колони силикагела, *n*-хексан:EtOAc = 8:2 v/v као елуент) [263]. Потом је C4-OH група **BFA-D3** естерификована са комерцијално доступном 3-ацетил-4-хидроксибензоевом киселином, у присуству 1-етил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид хидрохлорида (EDAC·HCl) и DMAP-а, у временски продуженој реакцији (24 h), да би настао **BFA-D4**,

производ пречишћен хроматографијом на колони силикагела (*n*-hexane:EtOAc = 1:1 v/v као елуент) [410].



Шема 3.10. Синтеза једињења **3DPQ-1** до **3DPQ-12**. Реагенси и услови: (1) Me₂Zn, (-)-DBNE, толуен, 0 °C, 24 h, 87% ee; (2) HCl, THF, rt, 25 мин; (3) (i) PPh₃, DEAD, 1-фенил-1*H*-тетразол-5-тиол, THF, 0°C, 16h, (ii) TBS-Cl, имидазол, DMAP, CH₂Cl₂, 0°C, 3 h; (5) (NH₄)₆Mo₇O₂₄, H₂O₂, EtOH, rt, 16 h; (5) једињење **R6**, KHDMS, 1,2-диметоксиетан; -78°C, 18h; (6) HCl, THF, rt, 1.5 h; (7) (i) LiOH, THF/H₂O, rt, 2h, (ii) 2,4,6-трихлорбензоилхлорид, NEt₃, THF, rt, 1.5 h, (iii) DMAP, толуен, рефлукс, 5h; (8) (i) *cc* HBR, THF, rt, 1.5 h (ii) рекристализација; (9) TBSOTf, 2,6-лутидин, CH₂Cl₂, rt; (10) 3-ацетил-4-хидроксibenзова киселина, ECD, DMAP, CH₂Cl₂, рефлукс; (11) K₂CO₃, EtOH, рефлукс; (12) (i) TBAF, THF, rt, (ii) VBr₃, CH₂Cl₂, 0°C, 3h, рефлукс.

Резултати и дискусија

Након увођења, *p*-ОН група **BFA-D4** подвргнута је еквимоларном алкиловању било са комерцијално доступним реактантама **Pro-R1**, **Pro-R2**, **Pro-R4**, **Pro-R5**, **Pro-R10** и **Pro-R11** (односно 2-хлоро-*N*-метилетанамином, 2-хлоро-*N,N*-диметилетанамином, 2-хлороетансулфонском киселином, 1-(2-хлороетил)пиролидин-2,5-дионом, 1-(2-хлороетил)пиперидином и 1-(2-хлороетил)пиролидином, респективно), или са **Pro-R3**, **Pro-R6**, **Pro-R7**, **Pro-R8**, **Pro-R9** и **Pro-R12** (тј. 1-(2-хлороетил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином, 6-(2-хлороетил)-6,7-дихидро-5*H*-пироло[3,4-*b*]пиридином, 2-(2-хлороетил)-1,2-дихидроизохинолином, 1-(2-хлороетил)декахидро-1,8-нафтиридином, 1-(2-хлороетил)-6-метилен-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином и 1-(2-хлороетил)-3-хидроксипиперидин-2-оном, респективно), реактантама припремљеним за потребе израде докторске дисертације, у окружењу калијум карбоната под рефлуксом, да би се добили производи **Pro-3DPQ-1** до **Pro-3DPQ-12** [396]. Субсеквентна депротекција *C7*-ОН групе, помоћу *tert*-бутиламонијум флуорида у THF-у [263], односно *C15*-ОН групе, потпуном деметилацијом *C15*-ОН коришћењем бор трибромида (2 еквивалента по метокси групи) у сувом дихлорметану на 0°C [389], коначно је резултовала синтезом дизајнираних једињења **3DPQ-1** до **3DPQ-12**.

Интерпретација спектралних података синтетисаних једињења **3DPQ-1** до **3DPQ-12**

Коришћењем модификованог синтетичког приступа (Шема 3.9), дизајнирана једињења **3DPQ-1** до **3DPQ-12** добијена су у високим приносима. Спектрални подаци (¹H NMR, ¹³C NMR, ¹⁵N NMR, ¹⁷O NMR, снимљени у DMSO-*d*₆ као растварачу) и елементална анализа синтетисаних једињења, били су у потпуној сагласности са предложеним молекуларним структурама. Тако је синтеза **R1** (Додатни материјал IV: Слика ДМ21-ДМ23) окарактерисана увођењем TBS као заштитне групе на терминалну хидроксилну групу 5-хидроксипентанала. Сама заштита хидроксилне групе потврђена је појавом сигнала за метил групу TBS као ¹H NMR мултиплета високог интензитета при хемијском померању од 0,14 и 1,05 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ21), као и помоћу ¹³C NMR мултиплета на -3,21 ppm, који су потицали од метил група директно везаних за атом Si, односно мултиплетом на 25,53 ppm за *tert*-бутил групу (Додатни материјал IV: Слика ДМ22). Слободна алдехидна група потврђена је ¹H NMR синглетом ниског интензитета на 9,65 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ21) и ¹³C NMR синглетом на 198,49 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ22). Метиленска група супституисана -O-TBS остатком препозната је као ¹H NMR мултиплет на 3,74

Докторска дисертација Незрине Куртановић

ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ21) и ^{13}C NMR синглет на 63,02 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ22), док је атом кисеоника био уочен као ^{17}O NMR синглет на 6,00 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ23). Метил група вицинална алдехиду потврђена је као ^1H NMR мултиплет на 2,46 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ21) те као ^{13}C NMR синглет на 36,09 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ22), док је повезујући етиленски остатак био очигледан у виду ^1H NMR мултиплета на 1,54 и 1,59 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ21), односно ^{13}C NMR синглета на 22,78 ppm из 25,53 ppm мултиплета и синглета на 30,03 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ22).

Редукција алдехидне групе до хидроксилне унутар **R2** (Додатни материјал IV: Слика ДМ24-ДМ26), потврђена је ^1H NMR синглетом на 4,24 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ24) и ^{17}O NMR синглетом на 44,50 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ26). Надаље, супституција бившег алдехидног водоника метокси групом у структури **R2**, која ће у структури брефелдина А постати метокси група на положају С15, потврђена је појавом мултиплета у ^1H NMR спектру на 3,33 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ24) и синглетом унутар ^{13}C NMR спектра при 53,07 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ25, потеклих од метил групе, као и детектовањем атома кисеоника метокси групе као ^{17}O NMR синглета на 23,00 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ26).

Даља трансформација представљала је уклањање TBS заштитне групе са терминалне хидроксилне групе **R2**, чије је постојање унутар **R3** (Додатни материјал IV: Слика ДМ27-ДМ29) потврђено појавом новог ^1H NMR синглета умереног интензитета на 3,80 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ27), оштрим ^{17}O NMR синглетом на -6.00 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ29) те одсуством сигнала за метил групе TBS ^{13}C NMR спектра (Додатни материјал IV: Слика ДМ28).

Инкорпорацијом 1-фенил-1*H*-тетразол-5-тиола и заштитом секундарне хидроксилне групе добијен је сулфид **R4** (Додатни материјал IV: Слика ДМ30-ДМ33). Поменуте реакције одмах су потврђене одсуством терминалне хидроксилне групе унутар ^1H NMR спектра и постојањем мултиплета приписаних фенил групи унутар ^1H NMR спектра на 7,12, 7,31 и 7,81 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ30) односно унутар ^{13}C NMR спектра на 124,93, 129,59 и 134,73 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ31). Присуство 1*H*-тетразола било је очигледно након што су уочени ^{15}N NMR синглети на -148,10 (сигнал *N*-Phe), -100,50, -30,50 и 5,10 ppm (*sp*² хибридовани

Резултати и дискусија

сигнали азота) (Додатни материјал IV: Слика ДМ32). Угљеник везан једноструком везом за сумпор и двоструком везом за азот виђен је као ^{13}C NMR синглет на 157,35 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ31), чиме је индиректно потврђено присуство атома сумпора. Надаље, постојао је недостатак сигнала хидроксилне групе из редукованог карбонилног остатка; метил групе из TBS биле су евидентне и појава ^{13}C NMR мултиплета на -3,09 и 25,66 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ31) и ^{17}O NMR синглета на 16,80 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ33) показала је да је TBS заиста заштитио различите хидроксилне групе у поређењу са **R2**.

Оксидација **R4** дала је **R5** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ34-ДМ37), што је довело до емисије фрагмента сумпорне киселине као ^{17}O NMR мултиплета на 147,00 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ37).

Реагенс **R6** припремљен је према поступку описаном на другом месту и његова структура (Додатни материјал IV: Сlike ДМ38-ДМ40) била је у складу са претходним налазима. Како је **R6** припремљен од **VFA**, уобичајена номенклатура за **VFA** користиће се за опис структуре **R6**. Тако је карбонилна група на позицији C1 потврђена ^{13}C NMR синглетом на 173,10 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39), док је супституишућа метокси група уочена на 3,74 ppm унутар ^1H NMR мултиплета на 3,75 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38), као ^{13}C NMR синглет на 51,82 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39) те као ^{17}O NMR синглет на 142,70 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ40). Метиленски остатак између C1 карбонилне групе и C3=C4 двоструке везе био је очигледан као ^1H NMR мултиплет на 2,92 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38) односно као ^{13}C NMR синглет на 34,95 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39). Надаље, C3 угљеник унутар *trans*- $\Delta^{3,4}$ двоструке везе примећен је као ^1H NMR синглет на 6,03 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38) и као ^{13}C NMR синглет на 134,67 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39), док је одговарајући C4 угљеник емитовао на 5,56 ppm у оквиру ^1H NMR триплета на 5,49 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38) и као ^{13}C NMR синглет на 134,50 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39). Надаље, C4 метиленски угљеник заштићен са MEMO- био је уочен као оштар ^1H NMR сигнал на 3,78 ppm унутар мултиплета на 3,75 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38), те као ^{13}C NMR синглет на 78,25 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39). Надаље, MEM-протекција коришћена је и за C7-OH групу; C4 метиленски угљеник супституисан MEMO-делом био је очигледан као оштар сигнал на 3,31 ppm унутар ^1H NMR мултиплета на 3,78 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38) и као ^{13}C NMR

Докторска дисертација Незрине Куртановић

синглет на 78,25 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39). MEM сигнали асоцирани са супституцијом било C4-OH или C7-OH групе виђени су као ^1H NMR мултиплети на 3,31, 3,50, 3,53, 4,30 и 5,45 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38), ^{13}C NMR мултиплети на 57,81, 67,74 и 73,66 ppm, те као синглети на 93,28 и 94,14 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39), односно као ^{17}O NMR мултиплети на -23,80, 18,00 и 38,50 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ40), где су сигнали на 4,30/5,45 ppm и 93,28/94,14 одговарали метиленским групама директно везаним за C4, односно за C7 хидроксилне групе, респективно (сами C4-O или C7-O атоми емитовали су на 18,00 ppm унутар ^{17}O NMR мултиплета). Даља карактеризација односила се на некадашњи циклопентански прстен ВФА. Тако је C5 угљеник примећен као ^{13}C NMR синглет на 43,69 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39), док је његов *trans*-водоник као супституент примећен као ^1H NMR синглет врло ниског интензитета на 1,96 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38). Метиленски остатак на положају C6 нотира се као ^1H NMR синглет на 1,46 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38) и ^{13}C NMR синглет на 37,56 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39), док је одговарајући положај C8 емитовао као ^1H NMR дублет на 2,14 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38) и ^{13}C NMR синглет на 36,28 (Додатни материјал IV: Слика ДМ39); сваки од сигнала је био ниског или средњег интензитета. Између потоњих угљеника, метиленска група на положају C7 као носилац C7-ОМЕМ појавила у виду ^1H NMR пика високог интензитета на хемијском померању од 3,31 ppm, као део мултиплета на 3,36-3,28 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38), односно као ^{13}C NMR синглет на 80,61 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39). Коначно, C9 угљеник виђен као ^{13}C NMR синглет на 52,86 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39) употпунио је циклопентански прстен, где се његов *cis*-водоник појавио при 2,06 ppm као део ^1H NMR дублета на 2,08 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38). На крају, алдехидна функционална група на положају C10 потврђена је ^1H NMR синглетом на 9,72 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ38) и ^{13}C NMR синглетом на 205,39 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ39).

Купловање **R6** са **R5** дало је *E*-олефин **R7** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ41-ДМ43) где је реакција олефинације потврђена губитком сигнала за алдехидну функционалну групу на положају C10 алдехида и појавом *trans*- $\Delta^{10,11}$ двоструке везе. Тако је sp^2 хибридизовани угљеник на положају C10 детектован унутар **R7** на нижим пољима, као ^1H NMR синглет на 5,24 ppm синглет (Додатни материјал IV: Слика

Резултати и дискусија

ДМ41) и ^{13}C NMR синглет при хемијском померању од 132,97 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ42). Надаље, постојање sp^2 хибридованог C11 угљеника закључено је постојањем ^1H NMR синглета врло ниског интензитета на 5,49 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ41) и ^{13}C NMR синглета средњег интензитета на 130,82 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ42). Угљеници C12, C13, C14, и C15 пронађени су као ^1H NMR мултиплет на 1,60 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ41) и ^{13}C NMR синглет на 32,41 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ42), затим као сигнал на 1,35 ppm унутар ^1H NMR дублета на 1,44 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ41) те као ^{13}C NMR синглет на 22,92 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ42), као ^1H NMR синглет на 1,62 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ41) односно ^{13}C NMR синглет на 32,63 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ42) и коначно као ^1H NMR синглет на 4,82 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ41) односно ^{13}C NMR синглет на 100,70 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ42), респективно. Метокси група на положају C15 препозната је као сигнал на 3,32 ppm унутар ^1H NMR мултиплета на 3,33 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ41), као ^{13}C NMR синглет при хемијском померању од 55,30 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ42) и ^{17}O NMR синглет на 23,00 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ43). Коначно, C15-О-TBS остатак био је на очекиваним пољима (Додатни материјал IV: Сlike ДМ41-ДМ43).

Надаље, синтеза **R8** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ44-ДМ46) подразумевала је уклањање заштите са хидроксилне групе на положају C15, што је потврђено ^1H NMR синглетом на 4,25 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ44) и ^{17}O NMR синглетом на 44,50 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ46).

Синтезом **BFA-D1** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ47-ДМ49), одговарајући ^1H NMR пик C15-ОН групу изгубљен је због затварања прстена (Додатни материјал IV: Слика ДМ47): затварање прстена верификовано је благим померањем C15 угљеника према горњем пољу унутар ^1H NMR спектра, где је поменути атом уочен као као синглет ниског интензитета на 6,37 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ47) односно као ^{13}C NMR синглет умереног интензитета на 101,68 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ48). С друге стране, синтезу **BFA-D2** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ50-ДМ52) окарактерисало је уклањање заштите са C7-ОН, квантификовано појавом ^1H NMR синглета средњег интензитета на 4,19 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ50) и ^{17}O NMR синглета високог интензитета на 33,40 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ50), који су могли да се разликују од сигнала за C4-ОН групу (^1H NMR синглет на

Докторска дисертација Незрине Куртановић

4,05 ppm, ^{17}O NMR синглет на 32,30 ppm, Додатни материјал IV: Слике ДМ50 и ДМ52, респективно). Наравно, сигнали који би потицали од МЕМ групе нису били присутни у одговарајућим спектрима (Додатни материјал IV: Слике ДМ50-ДМ52).

Ипак, ради даље циљане синтезе **BFA-D4**, у структури **BFA-D3** (Додатни материјал IV: Слике ДМ53-ДМ55), С7-ОН група заштићена је ТБС-ом, што је резултовало одсуством одговарајућег ^1H NMR синглета на 4,19 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ55) и појавом познатих сигнала за ову заштитну групу (Додатни материјал IV: Слике ДМ53-ДМ55).

Горе наведена циљана синтеза **BFA-D4** (Додатни материјал IV: Слике ДМ56-ДМ58) подразумевала је естерификацију С4-ОН функционалне групе из **BFA-D3** са 3-ацетил-4-хидроксибензојевом киселином. Тако је естерификација првобитно потврђена појавом естарске карбонилне групе у ^{13}C NMR спектру као синглет умереног интензитета на 166,92 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ57) и унутар ^{17}O NMR спектра као синглет средњег интензитета на 338,90 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ58), као и постојањем естарског кисеоника везаног за положај С4 унутар ^{17}O NMR спектра као синглета средњег интензитета на 130,60 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ58) односно одсуством одговарајућег синглета за С4-ОН групу унутар ^1H NMR спектра (Додатни материјал IV: Слика ДМ56). ^1H NMR спектар је, међутим, потврдио инкорпорацију бензена на основу синглета на 7,00, 8,00 и 8,64 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ56), као и појавом ^{13}C NMR синглета на 166,92 ppm (пореклом из угљеника носиоца функционалности естра), 122,70 ppm (од угљеника за који је била везана С3'-ацетил група), као и 165,45 ppm (угљеник за који је била везана *p*-ОН група), респективно (Додатни материјал IV: Слика ДМ57). С3'-ацетил супституент препознат је као мултиплет на 2,53 ppm у оквиру ^1H NMR спектра (Додатни материјал IV: Слика ДМ56) и као ^{13}C NMR синглет на 28,28 ppm, проистекао из метил групе (Додатни материјал IV: Слика ДМ57), као и на основу ^{13}C NMR синглета на 202,48 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ57) и ^{17}O NMR синглета на 488,00 ppm, пореклом из карбонилне групе (Додатни материјал IV: Слика ДМ58). Пристутво ^1H NMR синглета ниског интензитета при 8,62 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ56) и ^{17}O NMR синглета високог интензитета при 85,80 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ58) указало је на постојање *p*-ОН групе.

Резултати и дискусија

Синтеза **BFA-D4** била је неопходна за припрему **3DPQ-1** до **3DPQ-12**, уз употребу одговарајућих прекурсора **Pro-3DPQ-1** до **Pro-3DPQ-12**. Ипак, пре припреме **Pro-3DPQ-3**, **3DPQ-6**, **3DPQ-7**, **Pro-3DPQ-8**, **3DPQ-9** и **Pro-3DPQ-12**, требало је синтетисати одговарајуће прекурсоре **Pro-R3**, **Pro-R6**, **Pro-R7**, **Pro-R8**, **Pro-R9** и **Pro-R12**.

Тако су унутар структуре **Pro-R3** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ59-ДМ62) остаци 2-хлороетанола потврђени ^1H NMR мултиплета на 3,70 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ59) и ^{13}C NMR синглета на 40,27 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ60), додељених метиленској групи супституисаној хлором, као и ^1H NMR синглетом на 2,63 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ59) и ^{13}C NMR синглетом на 56,04 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ60), пореклом из метиленске групе супституисане 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином. Унутар хетероцикла, карбоксилна група препозната је по присуству оштрог ^1H NMR синглета на 13,18 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ59), док је карбонилни остатак уочен као ^{13}C NMR синглет на 166,47 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ60) и као ^{17}O NMR синглет на 337,20 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ62). Двострука веза $\text{C}3=\text{C}4$ која је носила -COOH групу била је потврђена постојањем ^{13}C NMR синглета на 126,73 ppm приписаног положају $\text{C}3$ (Додатни материјал IV: Слика ДМ60), односно помоћу ^1H NMR синглета ниског интензитета на 7,31 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ59) и ^{13}C NMR синглетом средњег интензитета на 142,15 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ60) приписаног положају $\text{C}4$. Наравно, супституција 2-хлороетанола са 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином (тј. азотом у фрагменту 2-хлороетанамина) уочена је као ^{15}N NMR синглет при -330,10 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ61).

Што се тиче **Pro-R6** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ63-ДМ65), остаци 2-хлороетанола препознати су помоћу ^1H NMR мултиплета на 3,69 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ63) и помоћу ^{13}C NMR синглета на 40,27 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ64), додељеног метиленској групи супституисаној хлором, као и ^1H NMR синглетом на 2,61 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ63) и ^{13}C NMR синглетом на 55,47 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ64), пореклом из метиленске групе супституисане 6,7-дихидро-5*H*-пироло [3,4-*b*] пиридином. Унутар хетероцикла, пиролдинске метиленске групе препознате су као ^1H NMR синглет на 3,26 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ63) и ^{13}C NMR синглет на 63,36 ppm (Додатни

Докторска дисертација Незрине Куртановић

материјал IV: Слика ДМ64), односно као ^1H NMR синглет на 3,58 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ63) и ^{13}C NMR синглет на 61,31 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ64), док су пиридинске метиленске групе препознате као ^1H NMR синглет на 7,28 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ63) и ^{13}C NMR синглет на 121,84 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ64), као ^1H NMR синглет на 7,76 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ63) и ^{13}C NMR синглет на 130,94 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ64), те као ^1H NMR синглет на 8,30 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ63) и ^{13}C NMR синглет на 146,33 ppm (иминијумска функција у оквиру пиридина) (Додатни материјал IV: Слика ДМ64). Двострука веза 6,7-дихидро-5*H*-пироло [3,4-*b*] пиридина била је нотирана ^{13}C NMR синглетима на 126,54 и 162,61 (угљеник из =C-N-фрагмента у пиридину) ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ64). Наравно, 6,7-дихидро-5*H*-пироло [3,4-*b*] пиридин као супституент 2-хлороетанола (тј. азота унутар 2-хлороетанаминског фрагмента) примећен је као ^{15}N NMR синглет на -315,50 ppm, док је пиридински азот унутар структуре емитовао као ^{15}N NMR-ов синглет на -47,00 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ65).

Анализом спектралних података за **Pro-R7** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ66-ДМ68) утврђено је да је супституција 2-хлороетанола са 1,2-дихидроизохинолином довела је до промене поља на којима је емитовала метиленска група везана за атом азота 1,2-дихидроизохинолина: ^1H NMR синглет на 2,79 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ66) и ^{13}C NMR синглет на 52,74 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ67) окарактерисали су поменуто купловање. Као што се очекивало, 1,2-дихидроизохинолин окарактерисан је одговарајућим ^1H NMR сигнаlima у распону од 4,44 до 7,41 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ66), као и ^{13}C NMR сигнаlima између 51,86 ppm и 140,38 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ67) (граничне вредности биле су за метиленске групе ковалентно везане за атом азота). Сам атом азота примећен је као ^{15}N NMR синглет на -287,10 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ68).

Дериватизацијом 2-хлороетанола са декахидро-1,8-нафтиридином добијен је **Pro-R8** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ69-ДМ71), у коме је метиленска група везана за један од азота у оквиру декахидро-1,8-нафтиридина емитовала као ^1H NMR синглет на 3,51 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ69) и као ^{13}C NMR синглет на 54,16 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ70). Костур декахидро-1,8-нафтиридина емитовао је у ^1H NMR опсегу од 1,26 до 2,88 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ69) и ^{13}C NMR

Резултати и дискусија

опсегу од 23,23 до 65,38 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ70). Што се тиче супституције азота, потврђена је присуством ^{15}N NMR синглета на -326,40 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ71); несупституисани -NH- део је био очигледан у виду ^1H NMR синглета при 2,77 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ69) и као ^{15}N NMR синглет на -334,90 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ71).

Дериватизацијом такође 2-хлороетанола са 6-оксо-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином добијен је **Pro-R9** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ72-ДМ75), где је новоуведена C6 карбонилна група у односу на **Pro-R3** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ59-ДМ62) квантификована помоћу ^{13}C NMR синглета на 167,89 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ73) и ^{17}O NMR синглета на 346,00 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ75).

Коначно, супституција 2-хлороетанола са 3-хидроксипиридин-2-оном резултовала је синтезом **Pro-R12** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ76-ДМ79), у коме је метиленска група везана за атом азота у оквиру хетероцикла емитовала као 3,44 пик унутар ^1H NMR мултиплета на 3,41 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ76) те као ^{13}C NMR синглет на 48,88 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ77). Скелет 3-хидроксипиридин-2-она емитовао је у ^1H NMR опсегу од 1,67 до 4,44 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ76) и унутар ^{13}C NMR опсега од 22,42 до 175,82 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ77), хидроксилна група пронађена је као ^1H NMR синглет на 5,44 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ76), ^{13}C NMR синглет на 67,27 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ77) и ^{17}O NMR синглет на 32,30 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ79), док је карбонилна група препозната као ^{13}C NMR синглет на 175,82 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ77) и као ^{17}O NMR синглет на 346,00 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ79). Што се тиче супституције азота, потврђена је присуством ^{15}N NMR синглета на -257,80 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ78).

Пошто је уведена у структуру **BFA-D4**, *p*-ОН хидроксилна група подвргнута је еквимоларном алкиловању било са 2-хлоро-*N*-метилетанаминим (**Pro-R1**), 2-хлоро-*N,N*-диметилетанаминим (**Pro-R2**), 1-(2-хлороетил)-1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином (**Pro-R3**), 2-хлороетансулфонском киселином (**Pro-R4**), 1-(2-хлороетил)пиридин-2,5-дионом (**Pro-R5**), 6-(2-хлороетил)-6,7-дихидро-5*H*-пироло [3,4-*b*]пиридином (**Pro-R6**), 2-(2-хлороетил)-1,2-дихидроизохинолином (**Pro-R7**), 1-(2-хлороетил)декахидро-1,8-нафтиридином (**Pro-R8**), 1-(2-хлороетил)-6-оксо-1,2,5,6-

Докторска дисертација Незрине Куртановић

тетрахидропиридин-3-карбоксилном киселином (**Pro-R9**), 1-(2-хлороетил) пиперидином (**Pro-R10**), 1-(2-хлороетил)пиролидином (**Pro-R11**), или са 1-(2-хлороетил)-3-хидроксипиперидин-2-оном (**Pro-R12**), да би се добили **Pro-3DPQ-1** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ80-ДМ83), **Pro-3DPQ-2** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ84-ДМ87), **Pro-3DPQ-3** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ88-ДМ91), **Pro-3DPQ-4** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ92-ДМ94), **Pro-3DPQ-5** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ95-ДМ98), **Pro-3DPQ-6** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ99-ДМ102), **Pro-3DPQ-7** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ103-ДМ106), **Pro-3DPQ-8** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ107-ДМ110), **Pro-3DPQ-9** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ111-ДМ114), **Pro-3DPQ-10** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ115-ДМ118), **Pro-3DPQ-11** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ119-ДМ122) или **Pro-3DPQ-12** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ123-ДМ126), респективно.

Супституција *p*-ОН групе била је евидентна кроз губитак бившег ^1H NMR синглета на 8,62 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ56) и ^{17}O NMR синглета на 85,80 ppm (Додатни материјал IV: Слика ДМ58), као и појавом етарског кисеоника у виду ^{17}O NMR синглета на 78,00 ppm унутар **Pro-3DPQ-1** (Додатни материјал IV: Слика ДМ83), **Pro-3DPQ-2** (Додатни материјал IV: Слика ДМ87), **Pro-3DPQ-3** (Додатни материјал IV: Слика ДМ91), **Pro-3DPQ-4** (Додатни материјал IV: Слика ДМ94), **Pro-3DPQ-5** (Додатни материјал IV: Слика ДМ98), **Pro-3DPQ-6** (Додатни материјал IV: Слика ДМ102), **Pro-3DPQ-7** (Додатни материјал IV: Слика ДМ106), **Pro-3DPQ-8** (Додатни материјал IV: Слика ДМ110), **Pro-3DPQ-9** (Додатни материјал IV: Слика ДМ114), **Pro-3DPQ-10** (Додатни материјал IV: Слика ДМ118), **Pro-3DPQ-11** (Додатни материјал IV: Слика ДМ122), односно **Pro-3DPQ-12** (Додатни материјал IV: Слика ДМ126). Преостале новоуведене функционалне групе за **Pro-3DPQ-1**, **Pro-3DPQ-2**, **Pro-3DPQ-3**, **Pro-3DPQ-4**, **Pro-3DPQ-5**, **Pro-3DPQ-6**, **Pro-3DPQ-7**, **Pro-3DPQ-8**, **Pro-3DPQ-10**, **Pro-3DPQ-11** или за **Pro-3DPQ-12** биле су на очекиваним хемијским померањима.

Коначно, уклањањем заштите са C7-OTMS или C15-O-CH₃ у структурама **Pro-3DPQ-1**, **Pro-3DPQ-2**, **Pro-3DPQ-3**, **Pro-3DPQ-4**, **Pro-3DPQ-5**, **Pro-3DPQ-6**, **Pro-3DPQ-7**, **Pro-3DPQ-8**, **Pro-3DPQ-9**, **Pro-3DPQ-10**, **Pro-3DPQ-11** или **Pro-3DPQ-12** добијени су **3DPQ-1** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ127-ДМ130), **3DPQ-2** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ131-ДМ134), **3DPQ-3** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ135-ДМ138), **3DPQ-4** (Додатни материјал IV: Сlike ДМ139-ДМ141), **3DPQ-5** (Додатни

Резултати и дискусија

материјал IV: Слике ДМ142-ДМ145), **3DPQ-6** (Додатни материјал IV: Слике ДМ146-ДМ149), **3DPQ-7** (Додатни материјал IV: Слике ДМ150-ДМ153), **3DPQ-8** (Додатни материјал IV: Слике ДМ154-ДМ157), **3DPQ-9** (Додатни материјал IV: Слике ДМ158-ДМ161), **3DPQ-10** (Додатни материјал IV: Слике ДМ162-ДМ165), **3DPQ-11** (Додатни материјал IV: Слике ДМ166-ДМ169) или **3DPQ-12** (Додатни материјал IV: Слике ДМ170-ДМ173), респективно.

Антагонистичка активност синтетисаних једињења 3DPQ-1 до 3DPQ-12, релативни афинитети везивања према ER α и ER β и анализа биоактивних конформација

По синтези, **3DPQ-1** до **3DPQ-12** тестирани су као потенцијални агенси против рака дојке у смислу способности да антагонирају ER α или ER β (Слика 3.42, Табела 3.34 и Додатни материјал IV: Слике ДМ186-ДМ188). Експериментално одређене IC₅₀ **3DPQ-1** до **3DPQ-12** (Табела 3.34) биле су у високој корелацији са вредностима предвиђеним **3-D PhypI/3-D QSAR** модел ансамблом (Табела 3.33). Једињења **3DPQ-12**, **3DPQ-3**, **3DPQ-9**, **3DPQ-4**, **3DPQ-2**, **3DPQ-1**, **3DPQ-7**, и **3DPQ-11** били су моћнији антагонисти ER α од **Ral** и **4-ОНТ**, испољавајући активност у pM опсегу. Сва једињења показала су висок афинитет везивања према ER α а низак према ER β (видети logRBA вредности у Табели 3.34).

За сва испитивана једињења, конверзија C15-CH₃ групе у C15-OH заиста је резултовала хоризонталном ротацијом главног језгра унутар LDB ER α , у односу на **BFA** (Слика 3.43 и Додатни материјал IV: Слика ДМ189). Тако је C15-OH група остварила две водоничне везе, по једну са Н3 Glu353 и Н6 Arg394 (видети Додатни материјал IV: Табелу ДМ13 за детаље). Последично, карбонилна група на положају C1 остварила је слабе електростатичке интеракције са атомом азота унутар индолског прстена Н6 Trp383, интеракцију која није предвиђена **3-D PhypI/3-D QSAR** модел ансамблом, али која је сматрана бенефитном. Угљенични скелет C8-C15 остварио је хидрофобне интеракције са Н6 Met388 и аминокиселинама Pe423 и Leu428 које су се налазиле у структури насумице увијања између Н6 и Н7. Обрнуто поравнање главног језгра утицало је на просторно позиционирање циклопентанског прстена чија је C7-OH група остварила водоничне везе са Н11 His524 (видети Додатни материјал IV: Табелу ДМ13 за детаље). Преостали атоми унутар C1-C4 угљеничног скелета учествовали су у стеричним интеракцијама са Н6 Trp383. Надаље, естерификација C4-OH групе са 3-ацетил-4-хидроксибензојевом киселином утицала је на стварање Н3 Thr347-Н11

Докторска дисертација Незрине Куртановић

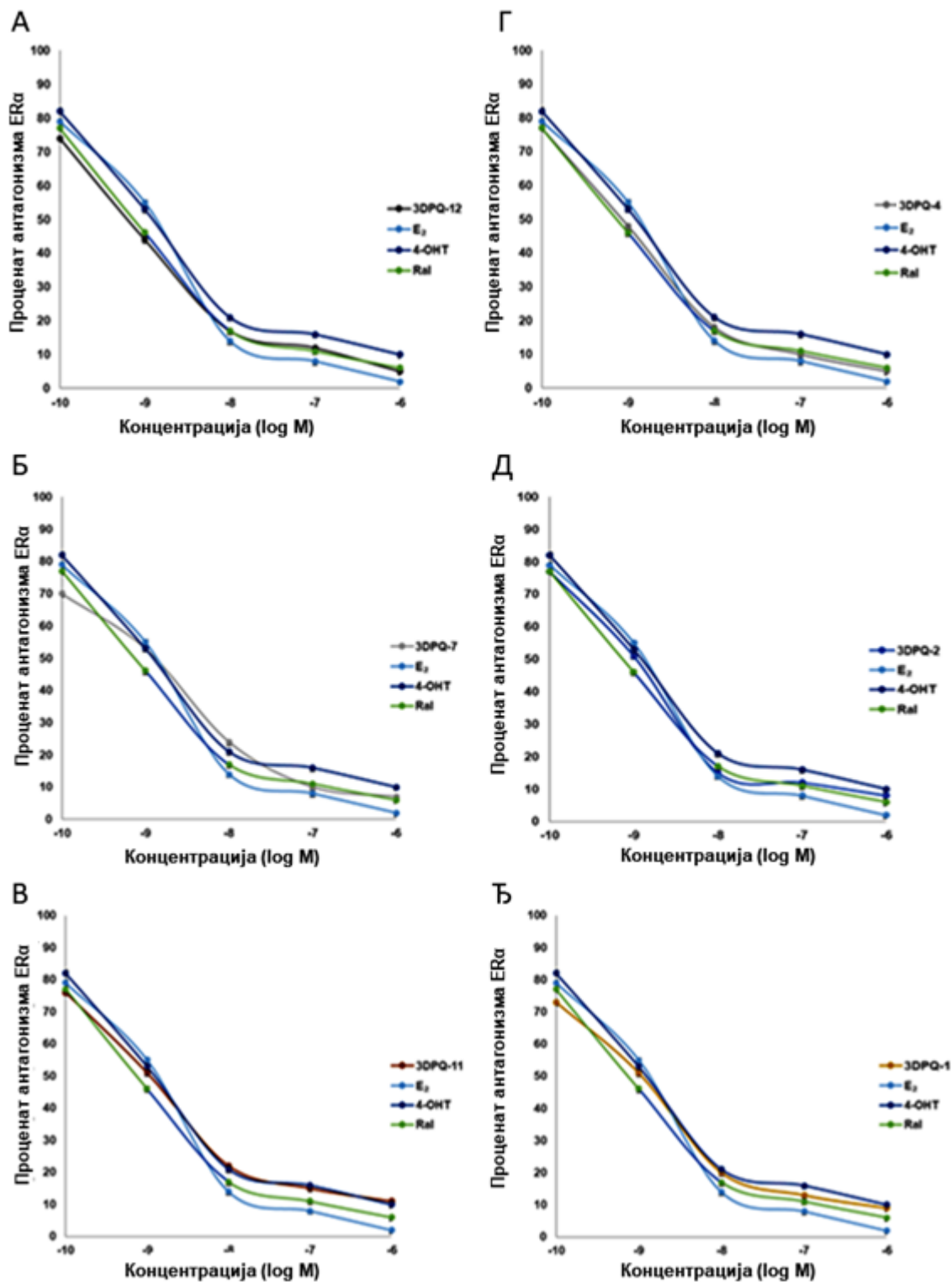
Leu525-H12 Leu536 хидрофобне мреже: естарски кисеоник електростатички је привукао бочни ланац аминокиселине H11 His524, док је *p*-позиционирана карбонилна група формирала водоничне везе са хидроксилном групом R-остатка H3 Thr347 бочног ланца (видети Додатни материјал IV: Табелу ДМ13 за детаље); инкорпорирани *o*-Ac-Ph фрагмент формирао је еклипсине стерне интеракције са метил групом бочног ланца H3 Thr347 преко сопствене метил групе, као и додатне водоничне везе са хидроксилном групом бочног ланца H3 Thr347 (видети Додатни материјал IV: Табелу ДМ13 за детаље) помоћу карбонилног остатка ацетил групе. Несупституисани атоми угљеника 3-ацетил-4-хидроксibenзоeве киселине формирали су стерне интеракције са H12 Leu536 у форми слова T. Надаље, *p*-O-CH₂-CH₂- мост носио је функционалне групе једињења **3DPQ-1** до **3DPQ-12** које су утицале на индуковано прилагођавање H12, у исто време успостављајући електростатичко привлачење са хидроксилном групом бочног ланца H3 Thr347 преко атома кисеоника и стерне интеракције између метиленских угљеника и изобутил групе H12 Leu536.

Једињење **3DPQ-12** (Слика 3.42А, Табела 3.34, Слика 3.43А, активност 1,85 пута већа у односу на **Ral**) остварило је високу активност и SERM фармакологију због остатка 3-хидроксипиридин-2-она који је био позициониран испод равни коју су чиниле H3 Asp351 и H12 Leu536 и чија је хидроксилна група остварила водоничну везу са H3 Asp351 ($d_{\text{HВ}} = 3,112 \text{ \AA}$), форсирајући индуковано прилагођавање H12 ка отвореној конформацији. Карбонилна група 3-хидроксипиридин-2-она остварила електростатичку интеракцију са хидроксилном групом бочног ланца H3 Thr347 док је угљенични скелет био у близини изобутил групе H12 Leu536.

Незнатно мању активност, за само 0,04 nM, испољило је једињење **3DPQ-3** (Слика 3.42Б, Табела 3.34, Слика 3.43Б, активност 1,68 пута већа од **Ral-a**), чији је остатак 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине формирао водоничну везу са H3 Asp351 ($d_{\text{HВ}} = 3,222 \text{ \AA}$), преко саме карбоксилне групе (испољавајући SERM фармакологију), односно стерне интеракције са изобутил групом H12 Leu536, слично **3DPQ-12**. Надаље, активност **3DPQ-9** (Слика 3.42В, Табела 3.34, Слика 3.43В, антагонист 1,64 пута моћнији од **Ral**) смањена је за 0,01 nM у односу на **3DPQ-3** увођењем карбонилне функционалне групе у положај C6 1,2,5,6-тетрахидропиридин-3-карбоксилне киселине, која је електростатички привукла атом азота индолског прстена H6 Trp383, што је имало за последицу промену положаја C3-COOH групе и водоничну везу слабијег интензитета са H3 Asp351 ($d_{\text{HВ}} = 3,314 \text{ \AA}$). Супституција волуминозног хетероцикла са HBD, попут сулфонилне групе у структури **3DPQ-4** (Слика 3.42Г,

Резултати и дискусија

Табела 3.34, Слика 3.43Г, SERM са 1,57 пута бољом активношћу од **Ral**) резултовала је смањењем биоактивности за само 0,07 nM у поређењу са **3DPQ-12**, упркос чињеници да је сулфо група наградила водоничну везу са Н3 Asp351 ($d_{\text{НВ}} = 3,347 \text{ \AA}$).



Слика 3.42. Антагонизам α рецептора естрогена у присуству **3DPQ-12** (А); **3DPQ-7** (Б); **3DPQ-11** (В); **3DPQ-4** (Г); **3DPQ-2** (Д); **3DPQ-1** (Ђ).

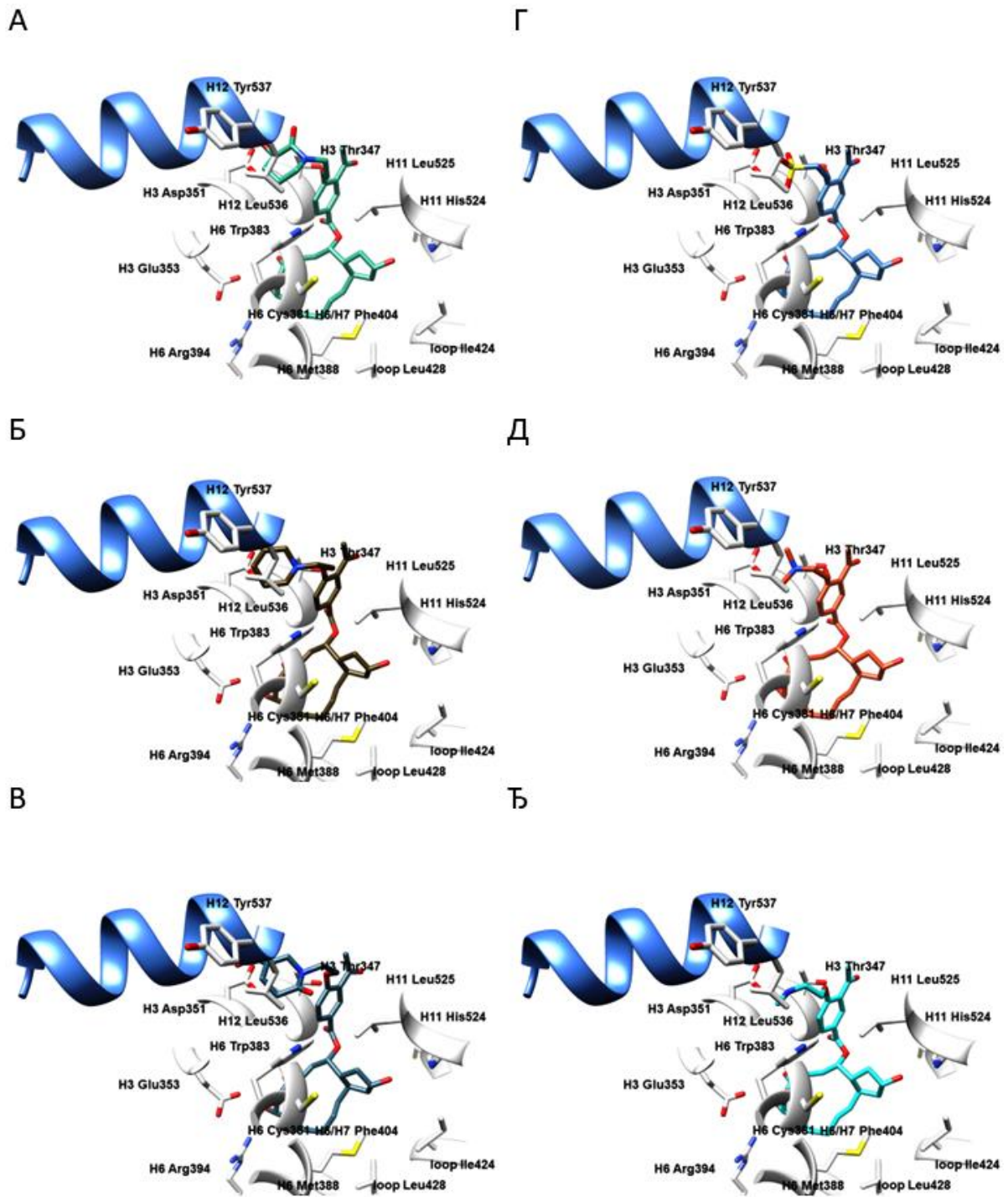
Табела 3.34. Антагонистичке активности синтетисаних једињења **3DPQ-1** до **3DPQ-12**, релативни афинитети везивања према ER α и ER β и одговарајуће антагонистичке константе.

Јед.	ER α ^a (IC ₅₀ nM)	ER β ^b (IC ₅₀ nM)	logRBA ^b ER α	logRBA ^c ER β	K _a ER α ^d (nM)	K _a ER β ^e (nM)
3DPQ-1	0,57±0,54	74,33±0,46	2,19	0,08	0,13	41,76
3DPQ-2	0,54±0,31	77,24±0,42	2,22	0,06	0,12	43,39
3DPQ-3	0,44±0,31	74,86±0,14	2,31	0,08	0,10	42,06
3DPQ-4	0,47±0,12	82,45±0,54	2,28	0,03	0,11	46,32
3DPQ-5	0,81±0,43	74,41±0,46	2,04	0,08	0,18	41,80
3DPQ-6	0,84±0,11	86,56±0,33	2,03	0,01	0,19	48,63
3DPQ-7	0,64±0,13	72,34±0,17	2,14	0,09	0,14	40,64
3DPQ-8	0,81±0,14	72,35±0,78	2,04	0,09	0,18	40,65
3DPQ-9	0,45±0,14	83,56±0,46	2,30	0,03	0,10	46,94
3DPQ-10	0,77±0,14	79,54±0,76	2,06	0,05	0,17	44,69
3DPQ-11	0,70±0,33	76,52±0,48	2,10	0,07	0,16	42,99
3DPQ-12	0,40±0,43	89,45±0,31	2,35	0,00	0,09	50,25
E₂[*]	0,88±0,24	0,88±0,32	2,00	2,00	0,20	0,49
4-ОНТ.³	1,13±0,24	3,62±0,43	1,90	1,39	0,25	2,03
Ral.^н	0,73±0,35	3,39±0,16	2,09	1,42	0,16	1,9
Контрола^ј	НД ^o	НД	НД	НД	НД	НД

^aКонцентрација која антагомира 50% сигналне активности ER α ; ^bКонцентрација која антагомира 50% сигналне активности ER β ; ^вЛогаритамска вредност процента релативног афинитета везивања према ER α ; ^гЛогаритамска вредност процента релативног афинитета везивања према ER β (^ввредности и ^гвредности релативног афинитета везивања (енг. relative binding affinity, RBA) израчунате су у односу на естрадиол са афинитетом од 100%, logRBA вредности веће од 0 указују на велики афинитет везивања, logRBA вредности између -2 и 0 указују на умерен интензитет везивања, logRBA вредности испод -2 указују на слаб интензитет везивања); ^дИзрачунате константе антагонизма (инхибиције) у односу на ER α ; ^еИзрачунате константе антагонизма (инхибиције) у односу на ER β ; ^oРезултати су представљени као средња вредност±стандардна девијација; ^{*}**17 β -естрадиол**; ³**4-хидрокситамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОНТ**); ^н**Ралоксифен** (енг. **Raloxifene, Ral**); ^јБез лиганда (0,9% NaCl). ^кНије доступно. ^{*}†p < 0,05 у поређењу са контролном групом; [‡]p < 0,05 у поређењу са **4-ОНТ**; [§]p < 0,05 у поређењу са **Ral**.

Међутим, супституција сулфо групе са *N,N*-диметил или *N*-метил групом, као код једињења са SERM фармакологијом **3DPQ-2** (Слика 3.42Г, Табела 3.34, Слика 3.43Г) и **3DPQ-1** (Слика 3.42Ђ, Табела 3.34, Слика 3.43Ђ) (дужине водоничних веза са Н3 Asp351 једнаке 3,122 односно 3,083 Å, тим редоследом), довела је до озбиљнијег смањења активности (разматрана једињења су ипак још увек била 1,37 пута односно 1,30 пута активнија у односу на **Ral**).

Резултати и дискусија



Слика 3.43. Биоактивне конформације **3DPQ-12** (A); **3DPQ-3** (Б); **3DPQ-9** (В); **3DPQ-4** (Г); **3DPQ-2** (Д); **3DPQ-1** (Ђ) унутар активног центра ER α . Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Једињења која су такође испојила SERM фармакологију, попут **3DPQ-7** (Додатни материјал IV: Слика ДМ186А, Табела 3.34, Додатни материјал IV: Слика

Докторска дисертација Незрине Куртановић

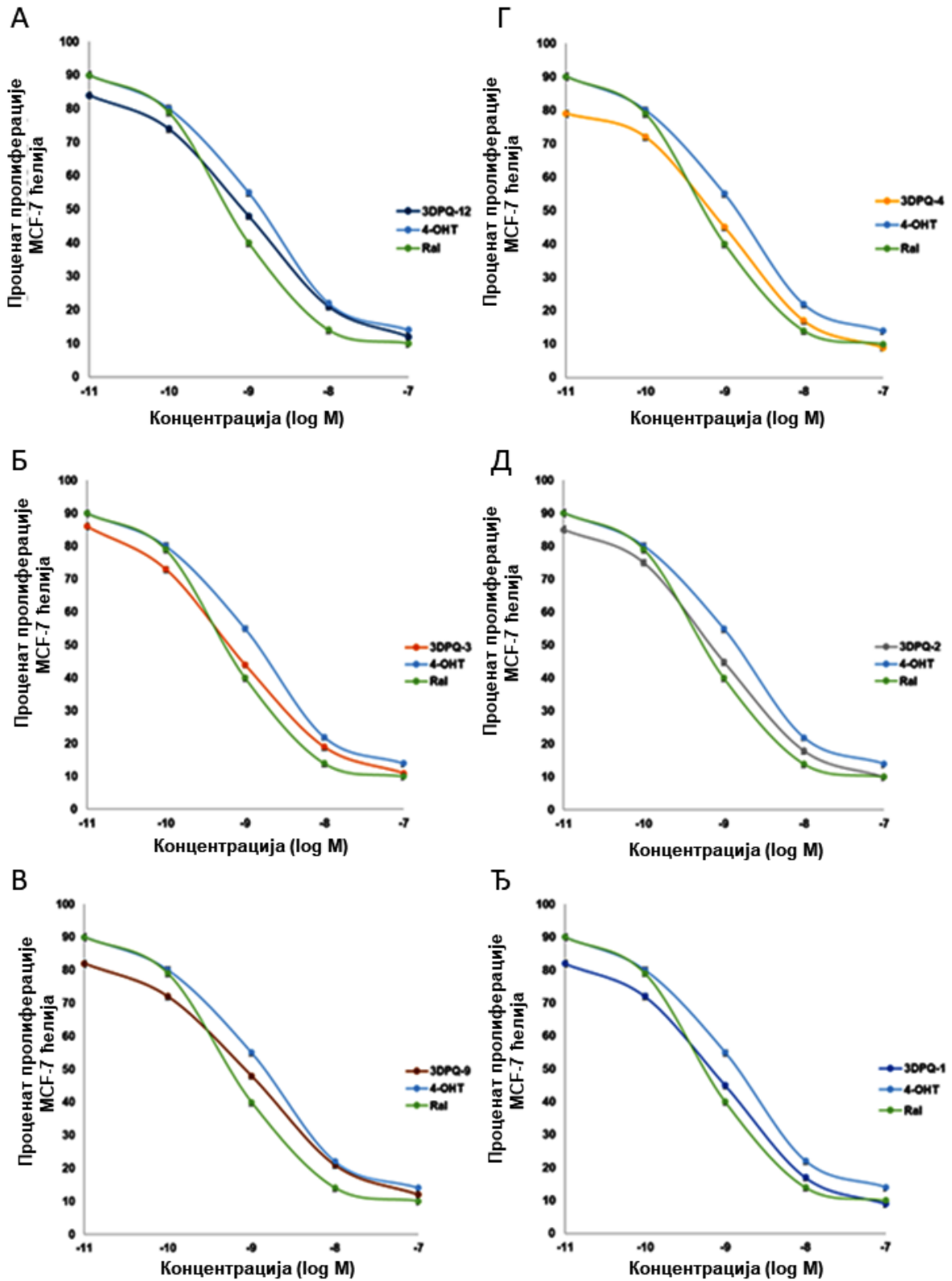
ДМ189А, активност 1,16 пута већа у односу на **Ral**) и **ЗDPQ-11** (Додатни материјал IV: Слика ДМ186Б, Табела 3.34, Додатни материјал IV: Слика ДМ189Б, активност 1,06 пута већа у односу на **Ral**), формирала су помоћу 1,2-дихидроизохинолина односно 1-(2-хлороетил)пиролидина стерне интеракције са изобутил групом Н12 Leu536 и водоничне везе слабијег интензитета са Н3 Asp351 ($d_{\text{HВ}} = 3,922$ и $3,136 \text{ \AA}$) преко атома азота, што је довело до смањења активности. Надаље, присуство прстена пиперидина (**ЗDPQ-10**, Додатни материјал IV: Слика ДМ186АВ, Табела 3.34, Додатни материјал IV: Слика ДМ189В, активност 1,45 пута већа у односу на **4-ОНТ**), пиролидин-2,5-диона (**ЗDPQ-5**, Додатни материјал IV: Слика ДМ186Г, Табела 3.34, Додатни материјал IV: Слика ДМ189Г, активност 1,38 пута већа у односу на **4-ОНТ**), декахидро-1,8-нафтиридина (**ЗDPQ-8**, Додатни материјал IV: Слика ДМ186Д, Табела 3.34, Додатни материјал IV: Слика ДМ189Д, активност 1,38 пута већа у односу на **4-ОНТ**) и 6,7-дихидро-5H-пироло[3,4-b] пиридина (**ЗDPQ-6**, Додатни материјал IV: Слика ДМ186Ђ, Табела 3.34, Додатни материјал IV: Слика ДМ189Ђ, активност 1,33 пута већа у односу на **4-ОНТ**) довело је до смањења активности због немогућности грађења водоничне везе са Н3 Asp351.

Антипролиферативна активност синтетисаних једињења ЗDPQ-1 до ЗDPQ-12 против ER α (+)- и ER α (-)-зависних ћелијских линија рака дојке

Синтетисана једињења су потом посматрана као антипролиферативни агенси против MCF-7 (Слика 3.44, Додатни материјал IV: Слика ДМ190, Табела 3.35), односно MDA-MB-231 (Додатни материјал IV: Сlike ДМ191-ДМ192, Табела 3.35) ћелијских линија, као и у смислу способности да индукују деградацију ER α у MCF-7 ћелијама (енг. ER α downregulation) (Табела 3.35) односно да антагонирају прогестеронски рецептор (енг. progesterone receptor, PR).

SERM фармакологија једињења, антиципирана биоактивним конформацијама, експериментално је потврђења одсуством способности једињења да изазову деградацију ER α . Такође, није уочен ни антагонизам PR (Табела 3.35). Због тога је даљи фокус био на антипролиферативној активности где је чак осам једињења показало антипролиферативну активност против MCF-7 ћелијских линија бољу или упоредиву са **Ral** (Табела 3.35).

Резултати и дискусија



Слика 3.44. Антипролиферативна активност једињења 3DPQ-12 (А); 3DPQ-3 (Б); 3DPQ-9 (В); 3DPQ-4 (Г); 3DPQ-2 (Д); 3DPQ-1 (Ђ) против MCF-7 ћелијске линије

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 3.35. Антипролиферативна активност синтетисаних деривата **3DPQ-1** до **3DPQ-12** и индекс селективности у односу на хормон-зависне MCF-7 ћелијске линије канцера дојке и хормон-независне MDA-MB-231 ћелијске линије канцера дојке, антипролиферативна активност у односу на нормалне MRC-5 ћелијске линије хуманих фибробласта плућа, супресија одговора ER α на хормонски стимулус унутар MCF-7 ћелијских линија, односно антагонитам у односу на PR унутар MCF-7 ћелијских линија, као и антиканцерогена активност против Ishikawa ћелијских линија ендометријалног аденокарцинома.

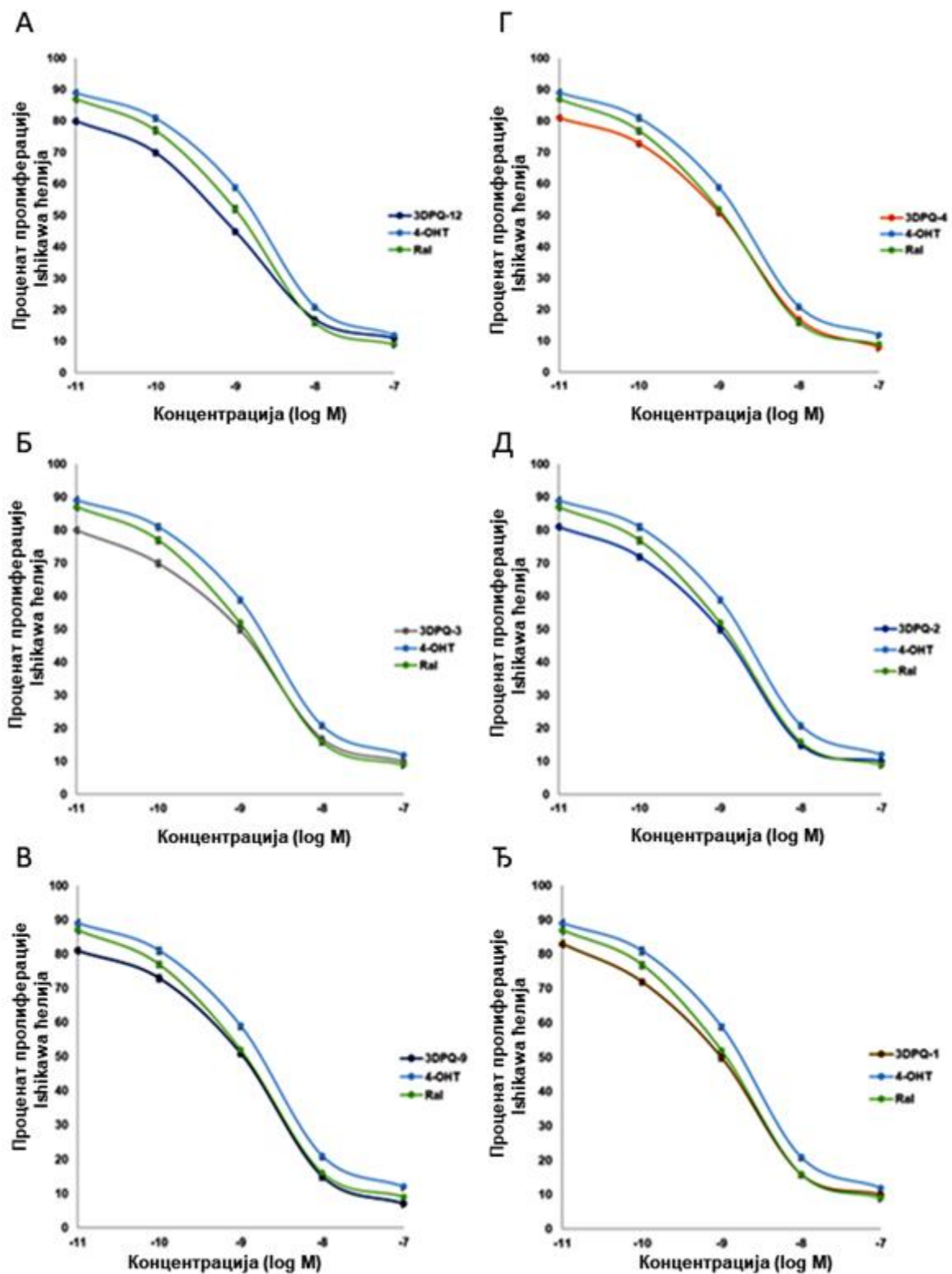
Јед.	MCF-7 ^a (IC ₅₀ nM)	MDA-MB-231 ^b (IC ₅₀ nM)	SI ^B	MRC-5 ^r (IC ₅₀ nM)	MCF-7 DR ^a (IC ₅₀ nM)	PR MCF-7 ^b (IC ₅₀ nM)	Ishikawa ^c (IC ₅₀ nM)
3DPQ-1	0,76±0,24 ^{ж,‡§}	72,44±0,32 ^{‡§}	95,31 ^{‡§}	>100	>100	>100	0,94±0,36 ^{§,‡§}
3DPQ-2	0,73±0,42 ^{‡§}	72,42±0,47 ^{‡§}	99,20 ^{‡§}	>100	>100	>100	0,99±0,35 [‡]
3DPQ-3	0,61±0,56 ^{‡§}	86,63±0,68 ^{‡§}	142,02 ^{‡§}	>100	>100	>100	0,84±0,74 ^{‡§}
3DPQ-4	0,64±0,15 ^{‡§}	67,31±0,34 ^{‡§}	105,17 ^{‡§}	>100	>100	>100	0,92±0,43 ^{‡§}
3DPQ-5	1,02±0,64 ^{‡§}	52,64±0,69 ^{‡§}	51,61 ^{‡§}	>100	>100	>100	1,42±0,32 ^{‡§}
3DPQ-6	1,14±0,49 ^{‡§}	52,31±0,46 ^{‡§}	45,89 ^{‡§}	>100	>100	>100	1,46±0,43 ^{‡§}
3DPQ-7	0,78±0,52 ^{‡§}	51,96±0,68 ^{‡§}	66,61 ^{‡§}	>100	>100	>100	1,74±0,43 ^{‡§}
3DPQ-8	1,06±0,45 ^{‡§}	42,56±0,35 ^{‡§}	40,15 ^{‡§}	>100	>100	>100	1,98±0,32 ^{‡§}
3DPQ-9	0,62±0,15 ^{‡§}	81,63±0,42 ^{‡§}	131,66 ^{‡§}	>100	>100	>100	0,89±0,24 ^{‡§}
3DPQ-10	0,97±0,34 ^{‡§}	41,97±0,32 ^{‡§}	42,27 ^{‡§}	>100	>100	>100	1,55±0,42 ^{‡§}
3DPQ-11	0,81±0,22 ^{‡§}	67,12±0,54 ^{‡§}	82,86 ^{‡§}	>100	>100	>100	1,37±0,47 ^{‡§}
3DPQ-12	0,56±0,11 ^{‡§}	82,84±0,61 ^{‡§}	147,93 ^{‡§}	>100	>100	>100	0,77±0,43 ^{‡§}
E₂³	НД ^п	НД	НД	НД	НД	НД	НД
4-ОHT.^и	1,19±0,57 [§]	37,10±0,45 [§]	31,18 [§]	>10	>100	>100	1,29±0,43 [§]
Ral.^ј	0,90±0,19 [‡]	93,41±0,48 [‡]	103,97 [‡]	>10	>100	>100	0,97±0,35 [‡]
Контрола^к	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД

^aКонцентрација која спречава раст 50% MCF-7 ћелијских линија; ^bКонцентрација која спречава раст 50% MDA-MB-231 ћелијских линија; ^BИндекс селективности (енг. selectivity index, SI) према ћелијским линијама: [IC₅₀(MDA-MB-231)]/[IC₅₀(MCF-7)] зарад дефинисања антипролиферативног ефекта било дизајнираних једињења или референтних једињења; ^rКонцентрација која спречава раст 50% MRC-5 ћелијских линија (ћелијских линија хуманих фибробласта плућа, као позитивне контроле); ^аСупресија одговора ER α на хормонски стимулус мерена унутар MCF-7 ћелијских линија; ^бАнтагонизам прогестерон рецептора одређен је као биомаркер за антагонизам ER α унутар MCF-7 ћелијских линија; ^сКонцентрација која спречава раст 50% Ishikawa ћелијских линија; ^жРезултати су представљени као средња вредност±стандардна девијација; ³17 β -естрадиол; ^и4-хидроксиатамоксифен (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОHT**); ^јРалоксифен (енг. **Raloxifene, Ral**); ^к0.9% NaCl; ^пНије дефинисано. *p < 0,05 када се пореди са контролном групом; [†]p < 0,05 када се пореди са **E₂**; [‡]p < 0,05 када се пореди са **4-ОHT**; [§]p < 0,05 када се пореди са **Ral**.

Једињење **3DPQ-12** (Слика 3.44А, Табела 3.35) било је најмоћнији инхибитор раста ћелија MCF-7 са IC₅₀ вредношћу једнаком 560 pM и одличним индексом селективности у односу на MDA-MB-231 ћелијске линије од 147,93. Значајну антипролиферацију против тратираних ћелијских линија (1,11 пута и 1,09 пута слабију од **3DPQ-12**) заједно са индексима селективности (131,66 и 142,02) такође су показали

Резултати и дискусија

и **3DPQ-3** (Слика 3.44Б, Табела 3.35) односно **3DPQ-9** (Слика 3.44В, Табела 3.35), респективно, деривати који су били 1,43 пута и 1,46 пута активнији од **Ral**.



Слика 3.45. Антипролиферативна активност једињења **3DPQ-12** (А); **3DPQ-3** (Б); **3DPQ-9** (В); **3DPQ-4** (Г); **3DPQ-2** (Д); **3DPQ-1** (Ђ) против Ishikawa ћелијских линија.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Једињење **3DPQ-4** (Слика 3.44Г, Табела 3.35) испољило је активност упоредиву са претходна два са добром селективношћу ($SI = 105,17$), ипак 1,14 пута мању у односу на **3DPQ-12** и 1,39 пута бољу од **Ral**. Даље, **3DPQ-2** (Слика 3.44Д, Табела 3.35, 1,21 пута активнији у односу на **Ral**), **3DPQ-1** (Слика 3.44Ђ, Табела 3.35, 1,17 пута активнији у односу на **Ral**), **3DPQ-7** (Додатни материјал IV: Слика 190А, Табела 3.35, 1,14 пута активнији у односу на **Ral**) и **3DPQ-11** (Додатни материјал IV: Слика 190Б, Табела 3.35, 1,10 пута активнији у односу на **Ral**) показала су антипролиферацију између 730 и 810 pM, али са нижим вредностима SI.

Антипролиферативна активност синтетисаних једињења 3DPQ-1 до 3DPQ-12 против ER α (+)-зависних канцера ендометријума

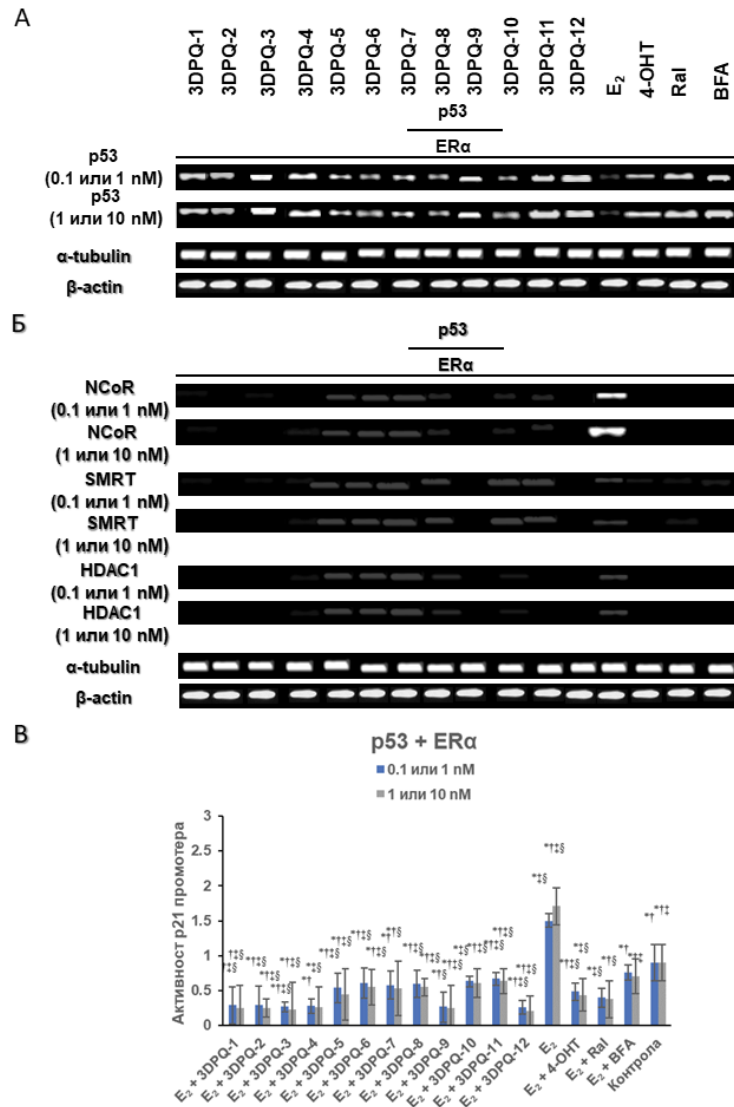
SERM фармакологија је често повезана са стимулацијом пролиферације ендометријалних ћелија и повећањем учесталости ендометријалног канцера (енг. endometrial cancer, EC). Због тога су овде синтетисана једињења са SERM фармакологијом тестирана против Ishikawa ћелијских линија ендометријалног аденокарцинома (Табела 3.35, Слика 3.45, Додатни материјал IV: Сlike ДМ193) испољавајући значајну антипролиферацију и добру активност против ендометријалне хиперплазије, указујући на одсуство тенденције да се изазове ендометријални канцер.

Утицај синтетисаних антагониста ER α 3DPQ-1 до 3DPQ-12 на процесе сигналне трансдукције унутар MCF-7 ћелијских линија

Испољена антипролиферативна активност против MCF-7 ћелијских линија била је повод за дефинисање механизма испољавања исте. **BFA** је познат као изазивач стреса на нивоу ендоплазматичног ретикулума унутар MCF-7 ћелијских линија, односно као стимулатор повећане експресије p53, главног супресора рака дојке [367]. Ипак, у целуларним условима ER α се везује за p53, што резултује инхибицијом транскрипционе регулације помоћу p53, заустављањем ћелијског циклуса посредством p53, те апоптозом [368], што намеће питање: да ли су једињења **3DPQ-1** до **3DPQ-12** стимулисала апоптозу MCF-7 ћелијских линија смањењем способности ћелије да регрутује ER α и стимулацијом трансактивације p53? Да би се добили одговори на ова питања, коришћени су конвенционални, односно секвенцијални ChIP тестови специфични са локализоване процесе (Слика 3.46), не би ли се дефинисали механизми

Резултати и дискусија

помоћу којих је $ER\alpha$, антагонизован од стране **3DPQ-1** до **3DPQ-12**, утицао су на транскрипциону активацију $p21$ гена (односно прототипа циљаног гена за $p53$) из посредство $p53$ [368].



Слика 3.46. Регрутација транскрипционих ко-репресора од стране $ER\alpha$ у циљу репресије транскрипционе активације посредоване преко $p53$. (А) ChIP и секвенцијални ChIP тестови изведени су на MCF-7 ћелијама након администрације **3DPQ-1** до **3DPQ-12** у концентрацијама од 0,1 и 1 nM (за **3DPQ-5**, **3DPQ-6** и **3DPQ-8** концентрације су биле 1 и 10 nM) са прајмерима специфичним за $p53$ место везивања промотера $p21$. Примарни ChIP је изведен са анти- $p53$ антителима, а имунопреципитат је подвргнут другом ChIP експерименту са анти- $ER\alpha$ антителима; (Б) Имунопреципитат из $ER\alpha$ ChIP затим је подвргнут трећем ChIP експерименту са антителима против NCoR, SMRT и HDAC1 антителима; (В) qChIP је изведен за анализу $ER\alpha$ - $p53$ интеракције на $p21$ промотеру у MCF-7 ћелијама након администрације једињења **3DPQ-1** до **3DPQ-12**. Ћелије су узгајане у медијуму са FBS-ом обложеним декстраном третираним угљеником током 4 дана и третиране са E_2 (1 и 10 nM) са или без **3DPQ-1** до **3DPQ-12** током 3 сата.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Експериментално, сва једињења осим **ЗDPQ-5**, **ЗDPQ-6** и **ЗDPQ-8** поново су администрирана на MCF-7 ћелијским линијама у концентрацијама од 0,1 и 1 nM (односно граничним концентрацијама у чијем су се опсегу налазиле IC₅₀ вредности једињења против MCF-7 ћелијских линија, Табела 3.35) (за означена једињења концентрације су биле 1 и 10 nM). Након адисије прајмера специфичних за везивно место p53 унутар p21 промотера, хроматин из екстраката MCF-7 ћелијских линија био је имунопреципитиран анти-p53 антителима и поново имунопреципитиран анти-ER α антителима, након чега се дошло до закључка да је до експресије p53 дошло након што је ER α антагонизован администриваним једињењима (Слика 3.46А). Финална рунда имунопреципитације извршена је помоћу NCoR и SMRT ко-репресора, јер су **ЗDPQ-1** до **ЗDPQ-12** као антиестрогени могли да стимулишу њихово везивање за ER α , праћено регрутовањем HDAC ензима, што би резултовало репресијом транскрипције. Ипак, како се NCoR, SMRT и HDAC1 нису везали за p21 промотер када је ER α био искључен (Слика 3.46Б), дошло се до закључка да су комплекси ER α -**ЗDPQ-1** до ER α -**ЗDPQ-12**, супротно понашању ER α , стимулисали транскрипциону активацију посредовану преко p53 без регрутовања поменутих ко-репресора.

Коначно, квантитативна ChIP (qChIP) анализа дефинисала је способност једињења **ЗDPQ-1** до **ЗDPQ-12** да утичу на афинитет везивања ER α за p53. Супротно способности E₂, једињења **ЗDPQ-1** до **ЗDPQ-12** омеала су интеракције рецептора са p21 промотером (Слика 3.46В): једињења **ЗDPQ-1** до **ЗDPQ-12** стимулисала су транскрипциону активност p53 и апоптозу MCF-7 ћелијских линија. Највећа стопа активности промотера p53 индукована је након примене **ЗDPQ-12**, **ЗDPQ-3** и **ЗDPQ-9**, 0,65 и 0,55 пута, 0,68 и 0,61 пута, односно 0,68 пута и 0,66 пута виша од оне коју је изазвао **Ral** у нижој, односно вишој концентрацији (Слика 3.46В). Једињење **ЗDPQ-4** био је сличне активности као **ЗDPQ-9**, испољавајући 0,70 и 0,68 пута већу активност од **Ral**, респективно, док су **ЗDPQ-2** и **ЗDPQ-1** испољили једнаку активност, 0,73 и 0,66 пута већу од **Ral** (Слика 3.46В).

Ефекти синтетисаних једињења ЗDPQ-1 до ЗDPQ-12 на цитотоксичност и ћелијски циклус MCF-7 ћелијских линија

Резултати антипролиферације MCF-7 ћелијских линија услед повећане експресије p53/p21 подстакли су даљу анализу ћелијског циклуса MCF-7 ћелија током апоптозе и након администрације испитивних једињења у истим концентрацијама као

Резултати и дискусија

за сигналну трансдукцију (Табела 3.36, Слика 3.47, Додатни материјал IV: Сlike ДМ194-ДМ204). Једињења су зауставила раст MCF-7 ћелија у G₀/G₁ фази, односно фази између недељења, пост митозе (означене као G₀) и репликације DNA (означене као G₁). Застој у G₀/G₁ фази праћен је смањењем S фазе, што је указало да су једињења зауставила пролиферацију MCF-7 ћелијских линија пре репликације DNA индуковане транскрипцијом машинеријом. Резултати су били у корелацији са претходним сазнањима да једињења са SERM фармакологијом блокирају напредовање ћелијског циклуса MCF-7 ћелија у G₀/G₁ фази. Вреди напоменути да је за сва једињења, аплицирана у обе концентрације, допринос G₀/G₁ фазе у застоју дељења MCF-7 ћелија био већи од 70%.

Табела 3.36. Ефекти синтетисаних једињења **3DPQ-1** до **3DPQ-12** на ћелијски циклус MCF-7 ћелијских линија.

Јед. Фаза	Ћелијски циклус (%)					
	G ₀ /G ₁ ^{а,б}		S ^в		G ₂ /M ^{г,д}	
Конц. (nM)	0,1 (1) ^б	1 (10) ^б	0,1 (1)	1 (10)	0,1 (1)	1 (10)
3DPQ-1	72,62±2,47 ^{е*†‡§}	72,62±2,47 ^{е*†‡§}	9,98±1,65 ^{*†‡§}	10,69±1,42 ^{*†‡§}	17,40±3,63 ^{*†‡§}	14,24±2,54 ^{*†‡§}
3DPQ-2	73,64±5,32 ^{*†‡§}	73,64±5,32 ^{*†‡§}	11,88±0,87 ^{*†‡§}	12,59±1,57 ^{*†‡§}	14,48±2,54 ^{*†‡§}	11,32±3,25 ^{*†‡§}
3DPQ-3	72,99±1,32 ^{*†‡§}	72,99±1,32 ^{*†‡§}	8,98±1,64 ^{*†‡§}	9,69±0,94 ^{*†‡§}	18,03±1,65 ^{*†‡§}	14,87±2,43 ^{*†‡§}
3DPQ-4	77,78±3,54 ^{*†‡§}	77,78±3,54 ^{*†‡§}	7,20±2,88 ^{*†‡§}	7,91±1,54 ^{*†‡§}	15,02±4,23 ^{*†‡§}	11,86±3,43 ^{*†‡§}
3DPQ-5	71,78±0,67 ^{*†‡§}	71,78±0,67 ^{*†‡§}	9,21±1,95 ^{*†‡§}	9,92±0,76 ^{*†‡§}	19,01±3,55 ^{*†‡§}	15,85±4,43 ^{*†‡§}
3DPQ-6	70,52±1,53 ^{*†‡§}	70,52±1,53 ^{*†‡§}	13,27±2,64 ^{*†‡§}	13,98±1,33 ^{*†‡§}	16,21±3,25 ^{*†‡§}	14,05±2,43 ^{*†‡§}
3DPQ-7	73,25±2,54 ^{*†‡§}	73,25±2,54 ^{*†‡§}	14,06±1,58 ^{*†‡§}	14,77±1,46 ^{*†‡§}	12,69±2,64 ^{*†‡§}	9,53±3,54 ^{*†‡§}
3DPQ-8	72,39±1,43 ^{*†‡§}	72,39±1,43 ^{*†‡§}	12,50±1,22 ^{*†‡§}	13,21±2,15 ^{*†‡§}	15,11±2,56 ^{*†‡§}	11,95±2,45 ^{*†‡§}
3DPQ-9	71,47±0,99 ^{*†‡§}	71,47±0,99 ^{*†‡§}	12,97±1,65 ^{*†‡§}	13,68±1,74 ^{*†‡§}	15,56±2,65 ^{*†‡§}	10,40±3,54 ^{*†‡§}
3DPQ-10	71,96±1,43 ^{*†‡§}	71,96±1,43 ^{*†‡§}	11,96±2,41 ^{*†‡§}	12,67±2,46 ^{*†‡§}	16,08±1,56 ^{*†‡§}	12,92±4,32 ^{*†‡§}
3DPQ-11	72,53±0,47 ^{*†‡§}	72,53±0,47 ^{*†‡§}	13,31±1,66 ^{*†‡§}	14,02±1,43 ^{*†‡§}	14,16±2,13 ^{*†‡§}	11,00±3,43 ^{*†‡§}
3DPQ-12	77,83±0,92 ^{*†‡§}	77,83±0,92 ^{*†‡§}	16,96±1,23 ^{*†‡§}	17,67±1,32 ^{*†‡§}	5,21±2,54 ^{*†‡§}	2,05±1,43 ^{*†‡§}
E₂^ж	17,34±0,35 ^{*†‡§}	17,34±0,35 ^{*†‡§}	28,15±0,52 ^{*†‡§}	29,52±0,46 ^{*†‡§}	54,51±0,57 ^{*†‡§}	45,14±0,33 ^{*†‡§}
4-ОТН.^з	57,22±0,37 ^{*†‡§}	57,22±0,37 ^{*†‡§}	18,76±0,41 ^{*†‡§}	21,14±0,25 ^{*†‡§}	24,02±0,53 ^{*†‡§}	15,60±0,15 ^{*†‡§}
Ral.^и	59,14±0,54 ^{*†‡§}	59,14±0,54 ^{*†‡§}	15,83±0,53 ^{*†‡§}	16,37±0,46 ^{*†‡§}	25,03±0,35 ^{*†‡§}	17,11±0,46 ^{*†‡§}
Контрола^ј	32,32±0,31 ^{†,‡,§}		34,43±0,11 ^{†,‡,§}		33,25±0,31 ^{†,‡,§}	

^аСтања мировања ћелије: G₀ - ћелија је напустила циклус и престала да се дели;

^бЋелијска интерфаза (тј. синтеза): G₁ - повећање величине ћелија (припрема за биосинтезу DNA); ^вЋелијска интерфаза (тј. синтеза): S - репликација DNA; ^гЋелијска интерфаза (тј. синтеза): G₂ - период између биосинтезе DNA и митозе, ћелија наставља да расте; ^дСтања подела ћелија: M - раст ћелија престаје, долази до поделе;

^жКонцентрација једињења у nM администрирана на MCF-7 ћелијским линијама;

^еРезултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација. ^ж17β-естрадиол;

^з4-хидрокситамоксифен (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОТН**); ^иРалоксифен (енг. **Raloxifene, Ral**); ^ј0,9% NaCl. *p < 0,05 у поређењу са контролном групом; †p < 0,05 у поређењу са E₂; ‡p < 0,05 у поређењу са 4-ОТН; §p < 0,05 у поређењу са Ral.

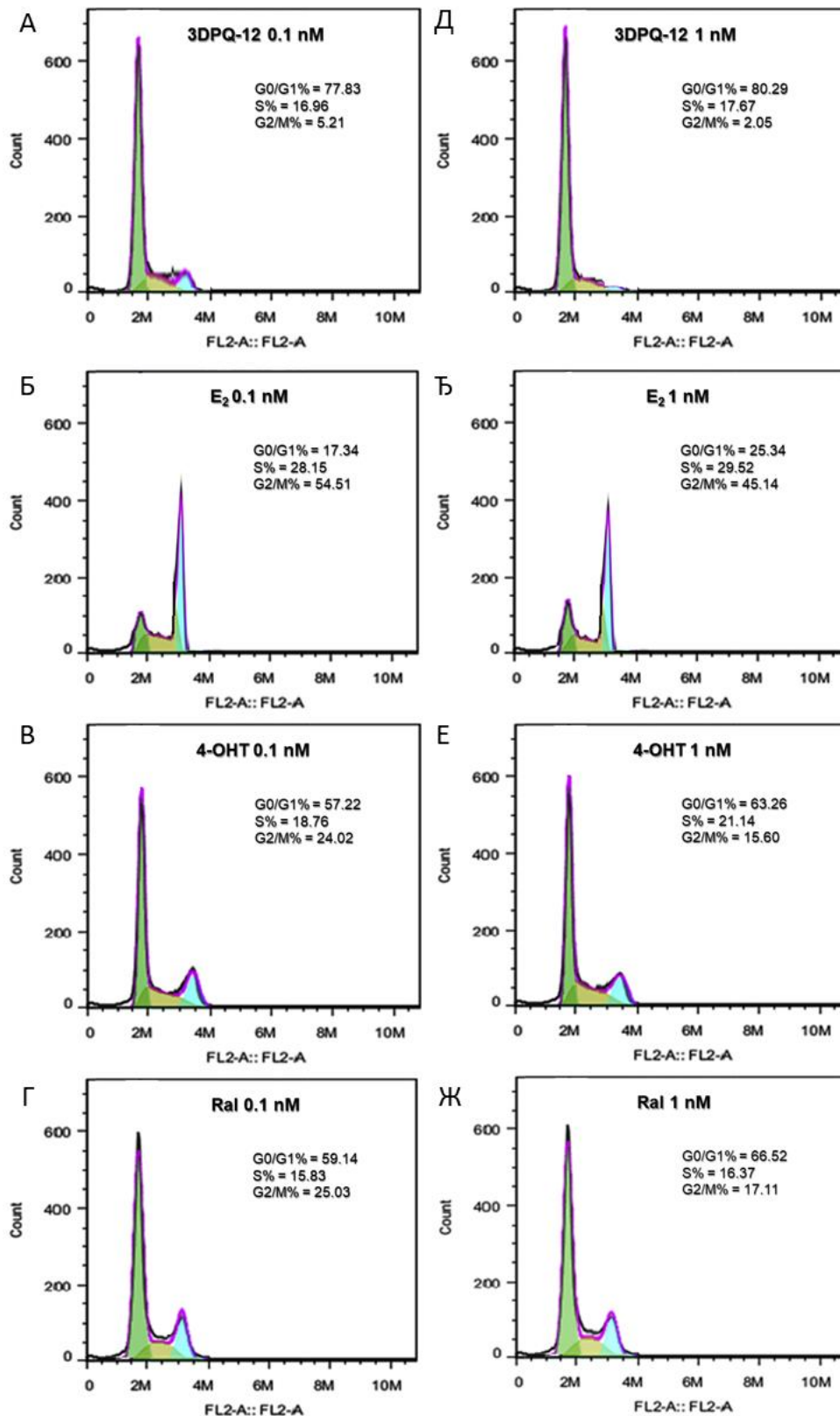
Докторска дисертација Незрине Куртановић

Дистрибуција **3DPQ-12** (Табела 3.36, Сlike 3.47А и 3.47Е) и, изненађујуће, **3DPQ-4** (Табела 3.36, Додатни материјал IV: Сlike ДМ196А и ДМ196Е) унутар ћелијског циклуса највише је утицала је пролиферацију ћелија, достигавши 77 и 80% доприноса G₀/G₁ фазе након апликације једињења у концентрацији од 0,1 односно 1 nM, респективно. С друге стране, **3DPQ-3** (Табела 3.36, Додатни материјал IV: Сlike ДМ194А и ДМ194Е), **3DPQ-9** (Табела 3.36, Додатни материјал IV: Сlike ДМ195А и ДМ195Е), **3DPQ-2** (Табела 3.36, Додатни материјал IV: Сlike ДМ197А и ДМ197Е) и **3DPQ-1** (Табела 3.36, Додатни материјал IV: Сlike ДМ198А и ДМ198Е) блокирали су циклус MCF-7 ћелијских линија у почетној фази између 71 и 76%. Индукција апоптозе и заустављање ћелијског циклуса могу бити кључни механизам помоћу којег су испитивани антипролиферативни агенси инхибирали пролиферацију MCF-7 ћелија, што је било и очекивано ако се корелира са антипролиферативном активношћу једињења и способношћу да се индукује експресија p53.

In vivo скрининг једињења **3DPQ-1** до **3DPQ-12** против рака дојке

Захваљујући испољеној фармакологији, неколико водећих једињења у овом делу студије, попут **3DPQ-12**, **3DPQ-3**, **3DPQ-9**, **3DPQ-4**, **3DPQ-2** и **3DPQ-1**, даље су подвргнути *in vivo* скринингу да бу се утврдио њихов утицај на туморигенезу дојке (Табела 3.37). Експериментлано, одрасле женке пацова Wistar соја третиране су *i.p.* са MNU у концентрацији од 50 mg/kg bwt да би се индуковао рак дојке, након чега су водећа једињења аплицирана *per os* у две дозе 5 и 50 mg/kg bwt. Једињења су процењивана у смислу периода латенције, учесталости тумора и запремине тумора. Тако, период латенције био је најдужи код животиња третираних са **3DPQ-12**, **3DPQ-3** и **3DPQ-9**, 12 до 15 недеља у зависности од примењене концентрације, праћен малим бројем ћелија рака оптерећењем и запремином, надјачавајући ефикасност **Ral** (Табела 3.37). Водеће једињење **3DPQ-4** индуковало је период латенције између 9 и 12 недеља. Преостала водећа једињења, **3DPQ-2** и **3DPQ-1**, била су незнатно мање ефикасни супресори тумора, са периодом латенције између 7 до 12 недеља, вичим бројем ћелија тумора и запремином, али још увек моћнији антиганцерогени агенси од **Ral**. Наравно, то да су једињења безбедна за администрацију потврђено је каталитичком активношћу ензима јетре и редокс статусом (Додатни материјал IV: Табеле ДМ14 и ДМ15), где нису откривена значајна оштећења.

Резултати и дискусија



Слика 3.47. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-12** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-12** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Табела 3.37. Ефекти синтетисаних једињења на туморигенези млечних жлезда и фармакокинетичке студије.

Јед.	Доза (mg/kg)	log D _{7,4} ^а	Латенција ^б тумора (недеља)	Оптерећење ^в тумором (недеља)	Запремина ^г тумора (mm ³)	РВР ^д (%)	CL ^ђ <i>in vivo</i>	БИО ^е
3DPQ-1	5	1,94 ^{‡,l}	9 [*]	3,38±0,31 ^{*†l}	1,09±0,23 ^{*†‡l}	1.33 ^{‡l}	60 ^{‡l}	91
	50		12 ^{*†}	2,04±0,35 ^{*†§±}	0,68±0,35 ^{*†§±}	1.22 ^{§±}	69 ^{§±}	94
3DPQ-2	5	1,99 ^{‡,l}	9 [*]	3,34±0,57 ^{*†l}	0,96±0,41 ^{*†‡l}	1.15 ^{‡l}	59 ^{‡l}	92
	50		12 ^{*†}	1,98±0,45 ^{*†§±}	0,69±0,23 ^{*†§±}	1.24 ^{§±}	64 ^{§±}	94
3DPQ-3	5	2,07 ^{‡,l}	12 ^{*†‡}	2,18±0,69 ^{*†‡l}	0,78±0,43 ^{*†‡l}	1.34 ^{‡l}	66 ^{‡l}	90
	50		15 ^{*†§}	1,16±0,64 ^{*†§±}	0,66±0,21 ^{*†§±}	1.47 ^{§±}	71 ^{§±}	93
3DPQ-4	5	1,88 ^{‡,l}	10 ^{*†}	2,39±0,56 ^{*†‡l}	0,98±0,31 ^{*†‡l}	1.23 ^{‡l}	64 ^{‡l}	90
	50		14 ^{*†}	1,33±0,15 ^{*†§±}	0,41±0,23 ^{*†§±}	1.51 ^{§±}	76 ^{§±}	93
3DPQ-9	5	2,02 ^{‡,l}	12 ^{*†‡}	2,28±0,47 ^{*†‡l}	0,77±0,32 ^{*†‡l}	1.28 ^{‡l}	62 ^{‡l}	94 [‡]
	50		15 ^{*†§}	1,14±0,65 ^{*†§±}	0,40±0,43 ^{*†§±}	1.31 ^{§±}	78 ^{§±}	97
3DPQ-12	5	2,06 ^{‡,l}	12 ^{*†‡}	2,24±0,54 ^{*†‡l}	0,67±0,22 ^{*†‡l}	1.24 ^{‡l}	63 ^{‡l}	93 [‡]
	50		15 ^{*†§}	0,94±0,35 ^{*†§±}	0,34±0,11 ^{*†§±}	1.31 ^{§±}	71 ^{§±}	96
4-ОТН.³	5	3,64 ^l	7 [*]	3,36±0,38 ^{*†l}	1,88±0,35 ^{*†l}	1.85	35	88 ^l
	50		10 ^{*†}	3,22±0,21 ^{*†±}	1,35±0,63 ^{*†±}	2.52 [±]	42	94
Ral.^и	5	2,39 [‡]	8 [*]	3,11±0,47 ^{*†‡}	1,67±0,31 ^{*†‡}	1.85	36	93 [‡]
	50		13 ^{*†}	2,91±0,22 ^{*†§}	1,41±0,54 ^{*†§}	1.90 [§]	42	96
MNU^ј	50	НД	5 ^{*†‡§l±}	4,55±0,15 ^{*†§l±}	4,48±0,54	НД	НД	НД
К^к		НД	0 ^{†,‡,§,l,±}	0 ^{†,‡,§,l,±}	0 ^{†,‡,§,l,±}	НД	НД	НД

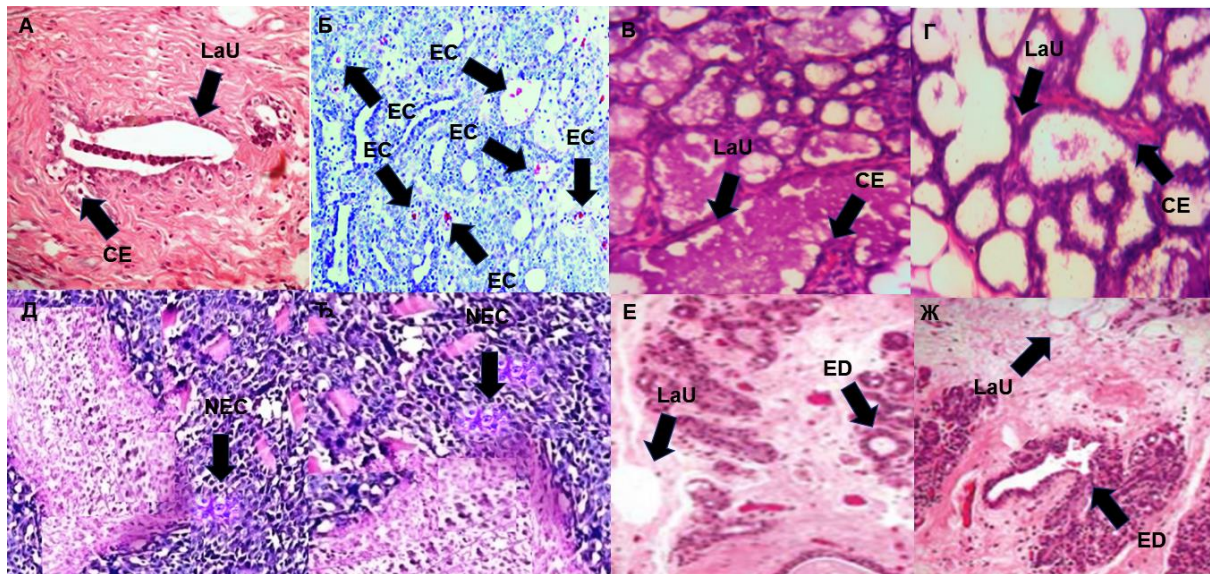
^аПросечна липофилност добијена из концентрационог опсега 5, 10, 20, 30, 40 и 50 mg/kg bwt добијена методом мешања ерленмајера (енг. shake-flask methodology); ^бВреме протекло од тренутка излагања пацова MNU до откривања канцера дојке); ^вБрој ћелија карцинома; ^гЗапремина узорка; ^дВезивање за протеине плазме (енг. plasma protein binding, РРВ) на 37°C; ^ђУнутрашњи клиренс (енг. Intrinsic clearance) *in vivo*; ^еБиорасположивост једињења; ^жРезултати су приказани као средња вредност±стандардна девијација; ^з **4-хидрокситамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОТН**); ^и **Ралоксифен** (енг. **Raloxifene, Ral**); ^јМетил нитрозоуреа (енг. methyl nitrosourea, MNU); ^к0,9% NaCl. *p < 0,05 када се пореди са негативном контролом; †p < 0,05 када се пореди са MNU у концентрацији од 50 mg/kg bwt; ‡p < 0,05 када се пореди са **4-ОТН** у концентрацији од 5 mg/kg bwt; §p < 0,05 када се пореди са **4-ОТН** у концентрацији од 50 mg/kg bwt; l p < 0,05 када се пореди са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg bwt; ±p < 0,05 када се пореди са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg bwt.

Након оралне апликације на пацовима, **3DPQ-12, 3DPQ-3, 3DPQ-9, 3DPQ-4, 3DPQ-2** и **3DPQ-1** показали су добре фармакокинетичке профиле (Табела 3.37), са оптималним афинитетом за везивање за протеине плазме. Релативно низак *in vivo* клиренс указао је да није дошло до оштећења хепатоцита, што је било у корелацији са резултатима ниске каталитичке активности ензима јетре и свеукупног редокс статуса (Додатни материјал IV: Табеле ДМ14 и ДМ15). Свеукупно добра орална изложеност примећена је код свих једињења, заједно са повољном биорасположивошћу. Након

Резултати и дискусија

оралне апликације на пацовима, **3DPQ-12**, **3DPQ-3**, **3DPQ-9**, **3DPQ-4**, **3DPQ-2** и **3DPQ-1** показали су добре фармакокинетичке профиле (Табела 3.37), са оптималним афинитетом за везивање за протеине плазме. Релативно низак *in vivo* клиренс указао је да није дошло до оштећења хепатоцита, што је било у корелацији са резултатима ниске каталитичке активности ензима јетре и свеукупног редокс статуса (Додатни материјал IV: Табеле ДМ14 и ДМ15). Свеукупно добра орална изложеност примећена је код свих једињења, заједно са повољном биорасположивошћу.

Утицај водећих једињења на ткиво рака дојке сагледан је након њихове администрације на животињама са канцером изазваним од стране **MNU** (Слика 3.48 и Додатни материјал IV: Сlike ДМ205-ДМ209).



Слика 3.48. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-12** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-12** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОHT** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОHT** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.

Докторска дисертација Незрине Куртановић

Тако, у поређењу са нормалним патолошким налазом (код животиња третираних са физиолошким раствором), који се огледао у фотомикрографима са лобулоалвеоларном јединицом и кубоидним епителијарним ћелијама (Слика 3.48А), администрација **MNU** изазвала је формирање дукталног карцинома млечне жлезде и масивну пролиферацију неопластичних епителијарних ћелија (Слика 3.49Б), промене пронађене унутар терминалне дуктално-лобуларне јединице које су формирале дискретне кластере са морфологијом у облику канала. Супротно томе, апликација водећих једињења била је безбедна у обе концентрације, неутралишући промене које су настале након третмана са **MNU**, ако је веровати пронађеним лобулоалвеоларним јединицама и кубоидним епителијарним ћелијама (видети фотомикрографе за **3DPQ-4a**, Слика 3.48В и 3.48Г, односно за остала једињења као Додатни материјал IV: Сlike ДМ205-ДМ209). Водећа једињења показала су се безбеднијим од **4-ОНТ**, који је изазвао озбиљнију некрозу (Слика 3.48Д и 3.48Ђ), односно **Ral**, који је изазвао стварање екстралобуларних канала (Слика 3.48Е и 3.48Ж).

Резултати и дискусија

Закључак

4

Резултати приложене докторске дисертације пример су протокола рационалног дизајна лекова чији је циљ био откривање нових моћних и селективних антагониста ER α , који су одмах синтетисани и испитани као агенси у лечењу рака дојке у *in vitro* и *in vivo* условима. Показано је да је масивна примена SB и LB техника на експериментално одређеним биоактивним конформацијама ER α изванредан приступ за рационални дизајн нових биоактивних једињења.

Представљени SB 3-D QSAR, COMBINER и 3-D фармакофорни модели, добијени из експериментално одређених биоактивних конформација парцијалних агониста, мешовитих агониста/антагониста (SERMs) и потпуних антагониста (SERDs) ER α , ко-кристализованих било у природним или мутираним рецепторима, упарени са молекулским доковањем и поравњањем заснованим на структури лиганда, показали су се ефикасним алатима са одличном способношћу предвиђања биоактивности током процеса дизајна нових молекула, те су коришћени за описивање биолошке активности против ER α у физиолошким условима геномског директног и индиректног пута. Оно што треба посебно истаћи јесте да су модели генерисани поштујући принцип изражене хемијске разноликости, коришћењем тренинг сета сачињеног од структурно различитих једињења. Анализа 3-D QSAR, COMBINER и 3-D фармакофорних модела пружила је смернице како разликовати антагонисте од парцијалних агониста, указала је на структурне аспекте повезане са селективношћу према ER α и дефинисала молекуларне детерминанте пожељне у структури једињења са SERM фармакологијом да окупира природно хормонско окружење и да у перспективи активира искључење базалне транскрипционе машинерије покренуте естрогеном.

Надаље, 3-D QSAutogrid/R модели у комбинацији са Vina/Obconformer/Open3DALIGN програмима, односно Py-CoMFA/Py-ComBinE модели у комбинацији са Py-Docking (Smina; vinarDO)/Py-ConfSearch-Py-Align (Balloon/ShaEP), те PHASE модели у комбинацији са Glide/FLA (алатима који су показали највећу тачност приликом репродукције кристалних структура лиганда, базиране на структури рецептора и самих лиганда), коришћени су као драгоцени алати за дизајнирање 12 нових SERMs на бази кумарина, проистеклих из 3-D QSAutogrid/R методологије, названих **3DQ-1a** до **3DQ-1e**, 6 нових кумаринских SERMs проистеклих из Py-CoMFA и Py-ComBinE методологија, означених као **CBE-1** до **CBE-6**, као и 12 нових деривата брeфeлдина А (**BFA**), као резултат апликације PHASE 3-D фармакофорних и 3-D QSAR студија, означених као **3DPQ-1** до **3DPQ-12**, који су развијени након виртуелног скенирања датасетова из National Cancer Institute и оптимизације **BFA**. Сва дизајнирана

једињења последично су синтетисана и биохемијски испитана као антагонисти ER α и потенцијални супресанти рака дојке.

Од одређивања антагонистичког потенцијала против ER α , до елаборације антипролиферативне активности у ER α (+) ћелијским линијама рака дојке, укључујући утицај на унутрашње механизме развоја карцинома (на нивоу Raf-1/MAPK/ERK или p53 сигналне трансдукције) и геномске директне и индиректне путеве транскрипције карцинома дојке, сви дизајнирани и синтетисани поготци имали су запажен биопотенцијал у пикомоларном до наномоларном опсегу.

Активност једињења **3DQ-4a, 3DQ-2a, 3DQ-1a, 3DQ-1b, 3DQ-2b, 3DQ-3b, CBE-4, CBE-5, CBE-3, 3DPQ-12, 3DPQ-3, 3DPQ-9, 3DPQ-4, 3DPQ-2 и 3DPQ-1** потврђена је након администрације на лабораторијским животињама из Wistar соја, такође испољавајући повољне фармакокинетичке профиле. Закључно, **3DQ-4a, 3DQ-2a, 3DQ-1a, 3DQ-1b, 3DQ-2b, 3DQ-3b, CBE-4, CBE-5, CBE-3, 3DPQ-12, 3DPQ-3, 3DPQ-9, 3DPQ-4, 3DPQ-2 и 3DPQ-1** могу се сматрати кандидатима за клиничка испитивања као будућност клиничке терапије рака дојке са SERM фармакологијом.

Литература

5

1. Lowe, J. S.; Anderson, P. G. *Stevens & Lowe's human histology* 4th ed. Elsevier (2015).
2. Lee, T. J.; Noh, H. J.; Kim, E. K.; Eom, J. S. Reducing donor site morbidity when reconstructing the nipple using a composite nipple graft. *Arch. Plast. Surg.* 39, 384–389 (2012).
3. Cancer Information Summaries -
NCI.<https://www.cancer.gov/publications/pdq/information-summaries>.
4. Zucca-Matthes, G.; Urban, C.; Vallejo, A. Anatomy of the nipple and breast ducts. *Gland Surg.* 5, 32 (2016).
5. Spear, S. L.; Schaffner, A. D.; Jespersen, M. R.; Goldstein, J. A. Donor-site morbidity and patient satisfaction using a composite nipple graft for unilateral nipple reconstruction in the radiated and nonradiated breast. *Plast. Reconstr. Surg.* 127, 1437–1446 (2011).
6. Matt, M.; Ziemian, J. Human anatomy coloring book. 43, Barnes & Noble (1982).
7. Hassiotou, F.; Geddes, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin. Anat.* 26, 29–48 (2013).
8. Mills, S. E. Histology for pathologists. Lippincott Williams & Wilkins, (2012).
9. Rucker, E. B. Mammary glands : Anatomy, development and diseases. Nova Biomedical, 2014.
10. Mills, D.; Gordon, E. J.; Casano, A.; Lahti, S. M.; Nguyen, T.; Preston, A.; Tondre, J.; Wu, K.; Yanase, T.; Chan, H.; Chia, D.; Esfandiari, M.; Himmel, T.; Love, S. M. The physiology of the normal human breast: an exploratory study. *J. Physiol. Biochem.* 67, 621–627 (2011).
11. Pandya, S.; Moore, R. G. Breast development and anatomy. *Clin. Obstet. Gynecol.* 54, 91–95 (2011).
12. Figueroa, J. D.; Pfeiffer, R. M.; Patel, D. A.; Linville, L.; Brinton, L. A.; Gierach, G. L.; Yang, X. R.; Papathomas, D.; Visscher, D.; Mies, C.; Degnim, A. C.; Anderson, W. F.; Hewitt, S.; Khodr, Z. G.; Clare, S. E.; Storniolo, A. M.; Sherman, M. E. Terminal duct lobular unit involution of the normal breast: implications for breast cancer etiology. *J. Natl. Cancer Inst.* 106, (2014).
13. Hall, J. M.; McDonnell, D. P. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol. Interv.* 5, 343–357 (2005).
14. Ng, H. W.; Perkins, R.; Tong, W.; Hong, H. Versatility or promiscuity: the estrogen receptors, control of ligand selectivity and an update on subtype selective ligands. *Int. J.*

- Environ. Res. Public Heal.* 11, 8709–8742 (2014).
15. Yaşar, P.; Ayaz, G.; User, S. D.; Güpür, G.; Muyan, M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reprod. Med. Biol.* 16, 4–20 (2017).
 16. Ponglikitmongkol, M.; Green, S.; Chambon, P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J.* 7, 3385–3388 (1988).
 17. Sand, P.; Luckhaus, C.; Schlurmann, K.; Götz, M.; Deckert, J. Untangling the human estrogen receptor gene structure. *J. Neural Transm.* 109, 567–583 (2002).
 18. Koš, M.; Reid, G.; Denger, S.; Gannon, F. Minireview: Genomic organization of the human ER α gene promoter region. *Mol. Endocrinol.* 15, 2057–2063 (2001).
 19. Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J.; Fried, G.; Nordenskjöld, M.; Gustafsson, J. Å. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 4258–4265 (1997).
 20. Ogawa, S.; Inoue, S.; Watanabe, T.; Hiroi, H.; Orimo, A.; Hosoi, T.; Ouchi, Y.; Muramatsu, M. The complete primary structure of human estrogen receptor β (hER β) and its heterodimerization with ER α *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 122–126 (1998).
 21. Shiau, A. K.; Barstad, D.; Radek, J. T.; Meyers, M. J.; Nettles, K. W.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A.; Agard, D. A.; Greene, G. L. Structural characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism. *Nat. Struct. Biol.* 2002 9 5, 359–364 (2002).
 22. Marino, M.; Galluzzo, P.; Ascenzi, P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr. Genomics* 7, 497 (2006).
 23. Ali, S.; Coombes, R. C. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 271–281 (2000).
 24. Fuentes, N.; Silveyra, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 116, 135 (2019).
 25. Sakkiah, S.; Wang, T.; Zou, W.; Wang, Y.; Pan, B.; Tong, W.; Hong, H. Endocrine disrupting chemicals mediated through binding androgen receptor are associated with *Diabetes mellitus*. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* Dec 23, 25 (2017).
 26. Ruenitz, P. C. Female sex hormones, contraceptives, and fertility drugs. *Burger's Med.*

- Chem. Drug Discov.* 219–264 (2010).
27. Dewick, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 3rd ed. Wiley (2002).
 28. Stingl, J. Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. *Horm. Cancer* 2, 85–90 (2011).
 29. Johnson, G. P.; Jonas, K. C. Mechanistic insight into how gonadotropin hormone receptor complexes direct signaling. *Biol. Reprod.* 102, 773–783 (2020).
 30. Katzenellenbogen, B. S.; Choi, I.; Delage-Mourroux, R.; Ediger, T. R.; Martini, P. G. V.; Montano, M.; Sun, J.; Weis, K.; Katzenellenbogen, J. A. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 279–285 (2000).
 31. Gamulin, E.; Samardžija, M.; Butković, I.; Pleadin, J. Biochemical mechanisms of sex hormones synthesis in domestic mammals. *Veterinarska stanica*, 49 (6) (2018).
 32. Khonsary, S. A. Guyton and Hall: Textbook of medical physiology. *Surg. Neurol. Int.* 8, 275 (2017).
 33. Dell'acqua, G.; Richards, A.; Julie Thornton, M. The potential role of nutraceuticals as an adjuvant in breast cancer patients to prevent hair loss induced by endocrine therapy. *Nutrients* 12, 1–24 (2020).
 34. Musa, M. A.; Cooperwood, J. S.; Khan, M. O. F. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. *Curr. Med. Chem.* 15, 2664 (2008).
 35. Miki, Y.; Iwabuchi, E.; Ono, K.; Sasano, H.; Ito, K. Exploring protein–protein interaction in the study of hormone-dependent cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 19, (2018).
 36. Dahlman-Wright, K.; Cavailles, V.; Fuqua, S. A.; Jordan, V. C.; Katzenellenbogen, J. A.; Korach, K. S.; Maggi, A.; Muramatsu, M.; Parker, M. G.; Gustafsson, J. Å. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 773–781 (2006).
 37. Zhao, C.; Dahlman-Wright, K.; Gustafsson, J. Å. Estrogen signaling *via* estrogen receptor β . *J. Biol. Chem.* 285, 39575–39579 (2010).
 38. Acconcia, F.; Marino, M. Steroid hormones: Synthesis, secretion, and transport. In: Belfiore, A.; LeRoith, D. (eds) *Principles of endocrinology and hormone action. Endocrinology*. Springer, 1-31 (2016).
 39. Leung, Y. K.; Mak, P.; Hassan, S.; Ho, S. M. Estrogen receptor (ER)- β isoforms: A key to understanding ER- β signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13162–13167 (2006).

40. Ramakrishnan, R.; Khan, S. A.; Badve, S. Morphological changes in breast tissue with menstrual cycle. *Mod. Pathol.* 2002 1512 15, 1348–1356 (2002).
41. Alex, A.; Bhandary, E.; McGuire, K. P. Anatomy and physiology of the breast during pregnancy and lactation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1252, 3–7 (2020).
42. Turashvili, G.; Bouchal, J.; Burkadze, G.; Kolar, Z. Mammary gland development and cancer. *Cesk Patol.* 41, 94-101 (2005).
43. Jameera Begam, A.; Jubie, S.; Nanjan, M. J. Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: A critical review. *Bioorg. Chem.* 71, 257–274 (2017).
44. Cowley, S. M.; Hoare, S.; Mosselman, S.; Parker, M. G. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J. Biol. Chem.* 272, 19858–19862 (1997).
45. Lonard, D. M.; Lanz, R. B.; O'Malley, B. W. Nuclear receptor coregulators and human disease. *Endocrine Reviews* vol. 28 575–587 (2007).
46. Honda, A.; Kamata, S.; Akahane, M.; Machida, Y.; Uchii, K.; Shiiyama, Y.; Habu, Y.; Miyawaki, S.; Kaneko, C.; Oyama, T.; Ishii, I. Functional and structural insights into human PPAR α/δ /subtype selectivity of bezafibrate, fenofibric acid, and pemafibrate. *Int. J. Mol. Sci.* 23, (2022).
47. McEwan, I. J. Nuclear receptors: one big family. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 505, 3–18 (2009).
48. Nagy, L.; Schwabe, J. W. R. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 29 317–324 (2004).
49. Sonoda, J.; Pei, L.; Evans, R. M. Nuclear receptors: Decoding metabolic disease. *FEBS Letters* vol. 582 2–9 (2008).
50. Kallenberger, B. C.; Love, J. D.; Chatterjee, V. K.; Schwabe, J. W. A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. *Nat. Struct. Biol.* 10, 136-140 (2003).
51. Mangelsdorf, D.J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schütz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; Evans, R. M. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83, 835–839 (1995).
52. Mangelsdorf, D. J; Evans, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* vol. 83 841–850 (1995).
53. Chawta, A.; Repa, J. J.; Evans, R. M.; Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptors and lipid

- physiology: Opening the X-files. *Science* vol. 294 1866–1870 (2001).
54. Mullican, S. E.; DiSpirito, J. R.; Lazar, M. A. The orphan nuclear receptors at their 25th year reunion. *J. Mol. Endocrinol.* 51, T115 (2013).
 55. Itoh, T.; Fairall, L.; Amin, K.; Inaba, Y.; Szanto, A.; Balint, B. L.; Nagy, L.; Yamamoto, K.; Schwabe, J. W. R. Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 924–931 (2008).
 56. Raghuram, S.; Stayrook, K.R.; Huang, P.; Rogers, P.M.; Nosie, A.K.; McClure, D.B.; Burris, L.L.; Khorasanizadeh, S.; Burris, T.P.; Rastinejad, F. Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERBalpha and REV-ERBbeta. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1207–1213 (2007).
 57. Pardee, K. I.; Xu, X.; Reinking, J.; Schuetz, A.; Dong, A.; Liu, S.; Zhang, R.; Tiefenbach, J.; Lajoie, G.; Plotnikov, A. N.; Botchkarev, A.; Krause, H. M.; Edwards A. The structural basis of gas-responsive transcription by the human nuclear hormone receptor REV-ERB β . *PLoS Biol.* 7, 0384–0398 (2009).
 58. Clarke, R. B.; Howell, A.; Potten, C. S.; Anderson E. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res.* 15, 4987-4991 (1997).
 59. Rastinejad, F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Current Opinion in Structural Biology* vol. 11 33–38 (2001).
 60. Greschik, H.; Wurtz, J. M.; Sanglier, S.; Bourguet, W.; Van Dorsselaer, A.; Moras, D.; Renaud, J. P. Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol. Cell* 9, 303–313 (2002).
 61. Papoutsis, Z.; Zhao, C.; Putnik, M.; Gustafsson, J. Å.; Dahlman-Wright, K. Binding of estrogen receptor α/β heterodimers to chromatin in MCF-7 cells. *J. Mol. Endocrinol.* 43, 65–72 (2009).
 62. Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 26 384–390 (2001).
 63. Li, Y.; Lambert, M. H.; Xu, H. E. Activation of nuclear receptors: A perspective from structural genomics. *Structure* vol. 11 741–746 (2003).
 64. Wurtz, J. M.; Bourguet, W.; Renaud, J. P.; Vivat, V.; Chambon, P.; Moras, D.; Gronemeyer, H. A. A canonical structure for the ligand binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* 3, 87–94 (1996).

65. de Lera, A. R.; Bourguet, W.; Altucci, L.; Gronemeyer, H. Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 6 811–820 (2007).
66. Ruff, M.; Gangloff, M.; Wurtz, J. M.; Moras, D. Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure–function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res.* 2, 353 (2000).
67. Farooq, A. Structural and functional diversity of estrogen receptor ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 1372–1384 (2015).
68. Kumar, R.; Zakharov, M. N.; Khan, S. H.; Miki, R.; Jang, H.; Toraldo, G.; Singh, R.; Bhasin, S.; Jasuja, R. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J. Amino Acids* 2011, 1–7 (2011).
69. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohli, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nat.* 2021 5967873 596, 583–589 (2021).
70. Varadi, M.; Anyango, S.; Deshpande, M.; Nair, S.; Natassia, C.; Yordanova, G.; Yuan, D.; Stroe, O.; Wood, G.; Laydon, A.; Židek, A.; Green, T.; Tunyasuvunakool, K.; Petersen, S.; Jumper, J.; Clancy, E.; Green, R.; Vora, A.; Lutfi, M.; Figurnov, M.; Cowie, A.; Hobbs, N.; Kohli, P.; Kleywegt, G.; Birney, E.; Hassabis, D.; Velankar S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein–sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 50, D439–D444 (2022).
71. Schwabe, J. W. R.; Chapman, L.; Finch, J. T.; Rhodes, D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75, 567–578 (1993).
72. Freedman, L. P.; Luisi, B. F. On the mechanism of DNA binding by nuclear hormone receptors: a structural and functional perspective. *J. Cell. Biochem.* 51, 140–150 (1993).
73. Díaz Chico, B. N.; Bosch, D. N.; Díaz Chico, J. C.; Escriche, E. E. Molecular mechanisms of estrogen action in target tissues. *Sel. Estrogen Recept. Modul. A New Brand Multitarg.*

- Drugs* 2–47 (2006).
74. Wu, Y. L.; Yang, X.; Ren, Z.; McDonnell, D. P.; Norris, J. D.; Willson, T. M.; Greene, G. L. Structural basis for an unexpected mode of SERM-mediated ER antagonism. *Mol. Cell* 18, 413–424 (2005).
 75. Shagufta, Ahmad, I.; Mathew, S.; Rahman, S. Recent progress in selective estrogen receptor downregulators (SERDs) for the treatment of breast cancer. *RSC Med. Chem.* 11, 438 (2020).
 76. Wärnmark, A.; Treuter, E.; Gustafsson, J. Å.; Hubbard, R. E.; Brzozowski, A. M.; Pike, A. C. W. Interaction of transcriptional intermediary factor 2 nuclear receptor box peptides with the coactivator binding site of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 21862–21868 (2002).
 77. Allen, W. J.; Balius, T. E.; Mukherjee, S.; Brozell, S. R.; Moustakas, D. T.; Lang, P. T.; Case, D. A.; Kuntz, I. D.; Rizzo, R. C. DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. *J. Comput. Chem.* 36, 1132 (2015).
 78. Manas, E. S.; Unwalla, R. J.; Xu, Z. B.; Malamas, M. S.; Miller, C. P.; Harris, H. A.; Hsiao, C.; Akopian, T.; Hum, W. T.; Malakian, K.; Wolfrom, S.; Bapat, A.; Bhat, R. A.; Stahl, M. L.; Somers, W. S.; Alvarez, J. C. Structure-based design of estrogen receptor- β selective ligands. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15106–15119 (2004).
 79. Manas, E. S.; Xu, Z. B.; Unwalla, R. J.; Somers, W. S. Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor-beta using X-ray crystallography and computational methods. *Structure* 12, 2197–2207 (2004).
 80. Blizzard, T.A.; Dininno, F.; Morgan, J. D.; Chen, H. Y.; Wu, J. Y.; Kim, S.; Chan, W.; Birzin, E. T.; Yang, Y. T.; Pai, L. Y.; Fitzgerald, P. M.; Sharma, N.; Li, Y.; Zhang, Z.; Hayes, E. C.; Dasilva, C. A.; Tang, W.; Rohrer, S. P.; Schaeffer, J. M.; Hammond, M. L. Estrogen receptor ligands. Part 9: Dihydrobenzoxathiin SERAMs with alkyl substituted pyrrolidine side chains and linkers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 107–113 (2005).
 81. Renaud, J.; Bischoff, S.F.; Buhl, T.; Floersheim, P.; Fournier, B.; Geiser, M.; Halleux, C.; Kallen, J.; Keller, H.; Ramage, P. Selective estrogen receptor modulators with conformationally restricted side chains. Synthesis and structure-activity relationship of ER α -selective tetrahydroisoquinoline ligands. *J. Med. Chem.* 48, 364–379 (2005).
 82. Tan, Q.; Blizzard, T.A.; Morgan, J.D.; Birzin, E.T.; Chan, W.; Yang, Y.T.; Pai, L.Y.; Hayes,

- E.C.; Dasilva, C.A.; Warriar, S.; Yudkovitz, J.; Wilkinson, H. A.; Sharma, N.; Fitzgerald, P. M.; Li, S.; Colwell, L.; Fisher, J. E.; Adamski, S.; Reszka, A. A.; Kimmel, D.; DiNinno, F.; Rohrer, S. P.; Freedman, L. P.; Schaeffer, J. M.; Hammond, M. L. Estrogen receptor ligands. Part 10: Chromanes: old scaffolds for new SERAMs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 1675–1681 (2005).
83. Kong, E. H.; Heldring, N.; Gustafsson, J. Å.; Treuter, E.; Hubbard, R. E.; Pike, A. C. W. Delineation of a unique protein–protein interaction site on the surface of the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3593 (2005).
84. Dykstra, K. D.; Guo, L.; Birzin, E. T.; Chan, W.; Yang, Y. T.; Hayes, E. C.; DaSilva, C. A.; Pai, L. Y.; Mosley, R. T.; Kraker, B.; Fitzgerald, P. M.; DiNinno, F.; Rohrer, S. P.; Schaeffer, J. M.; Hammond, M. L. Estrogen receptor ligands. Part 16: 2-Aryl indoles as highly subtype-selective ligands for ER α . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 2322–2328 (2007).
85. Shiau, A. K.; Barstad, D.; Loria, P. M.; Cheng, L.; Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927–937 (1998).
86. Rodriguez, A. L.; Tamrazi, A.; Collins, M. L.; Katzenellenbogen, J. A. Design, synthesis, and *in vitro* biological evaluation of small molecule inhibitors of estrogen receptor alpha coactivator binding. *J. Med. Chem.* 47, 600–611 (2004).
87. Renaud, J.; Bischoff, S. F.; Buhl, T.; Floersheim, P.; Fournier, B.; Halleux, C.; Kallen, J.; Keller, H.; Schlaeppli, J. M.; Stark, W. Estrogen receptor modulators: Identification and structure-activity relationships of potent ER α -selective tetrahydroisoquinoline ligands. *J. Med. Chem.* 46, 2945–2957 (2003).
88. Hsieh, R. W.; Rajan, S. S.; Sharma, S. K.; Greene, G. L. Molecular characterization of a B-ring unsaturated estrogen: Implications for conjugated equine estrogen components of premarin. *Steroids* 73, 59 (2008).
89. Nettles, K. W.; Bruning, J. B.; Gil, G.; Nowak, J.; Sharma, S. K.; Hahm, J. B.; Kulp, K.; Hochberg, R. B.; Zhou, H.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S.; Kim, Y.; Joachmiak, A.; Greene, G. L. NF κ B selectivity of estrogen receptor ligands revealed by comparative crystallographic analyses. *Nat. Chem. Biol.* 4, 241–247 (2008).
90. Dai, S. Y.; Chalmers, M. J.; Bruning, J.; Bramlett, K. S.; Osborne, H. E.; Montrose-Rafizadeh, C.; Barr, R. J.; Wang, Y.; Wang, M.; Burris, T. P.; Dodge, J. A.; Griffin, P. R.

- Prediction of the tissue-specificity of selective estrogen receptor modulators by using a single biochemical method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7171–7176 (2008).
91. Delfosse, V.; Grimaldi, M.; Pons, J. L.; Boulahtouf, A.; Le Maire, A.; Cavailles, V.; Labesse, G.; Bourguet, W.; Balaguer, P. Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 14930–14935 (2012).
 92. Osz, J.; Brélivet, Y.; Peluso-Iltis, C.; Cura, V.; Eiler, S.; Ruff, M.; Bourguet, W.; Rochel, N.; Moras, D. Structural basis for a molecular allosteric control mechanism of cofactor binding to nuclear receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, (2012).
 93. Delfosse, V.; Grimaldi, M.; Cavailles, V.; Balaguer, P.; Bourguet, W. Structural and functional profiling of environmental ligands for estrogen receptors. *Environ. Health Perspect.* 122, 1306–1313 (2014).
 94. Delfosse, V.; Maire, A.; Le, Balaguer, P.; Bourguet, W. A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 88 (2015).
 95. Zheng, Y.; Zhu, M.; Srinivasan, S.; Nwachukwu, J. C.; Cavett, V.; Min, J.; Carlson, K. E.; Wang, P.; Dong, C.; Katzenellenbogen, J. A.; Nettles, K. W.; Zhou, H.-B. Development of selective estrogen receptor modulator (SERM)-like activity through an indirect mechanism of estrogen receptor antagonism: defining the binding mode of 7-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-ene scaffold core ligands. *ChemMedChem* 7, 1094–1100 (2012).
 96. Huang, P.; Chandra, V.; Rastinejad, F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: Insights into physiology and therapeutics. *Ann. Review Physiol.* 72, 247–272 (2009).
 97. Tora, L.; White, J.; Brou, C.; Tasset, D.; Webster, N.; Scheer, E.; Chambon, P. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59, 477–487 (1989).
 98. Metzger, D.; Ali, S.; Bornert, J. M.; Chambon, P. Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J. Biol. Chem.* 270, 9535–9542 (1995).
 99. Bocquel, M. T.; Kumar, V.; Stricker, C.; Chambon, P.; Gronemeyer, H. The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res.* 17, 2581 (1989).

100. Tasset, D.; Tora, L.; Fromental, C.; Scheer, E.; Chambon, P. Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell* 62, 1177–1187 (1990).
101. Kraus, W. L.; Mcinerney, E. M.; Katzenellenbogen, B. S. Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 12314–12318 (1995).
102. Benecke, A.; Chambon, P.; Gronemeyer, H. Synergy between estrogen receptor α activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep.* 1, 151 (2000).
103. Yi, P.; Bhagat, S.; Hilf, R.; Bambara, R. A.; Muyan, M. Differences in the abilities of estrogen receptors to integrate activation functions are critical for subtype-specific transcriptional responses. *Mol. Endocrinol.* 16, 1810–1827 (2002).
104. Kumar, R.; Litwack, G. Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. *Steroids* 74, 877 (2009).
105. Wärnmark, A.; Wikström, A.; Wright, A. P. H.; Gustafsson, J. Å.; Härd, T. The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured *in vitro* and show different TBP binding properties. *J. Biol. Chem.* 276, 45939–45944 (2001).
106. Rajbhandari, P.; Finn, G.; Solodin, N. M.; Singarapu, K. K.; Sahu, S. C.; Markley, J. L.; Kadunc, K. J.; Ellison-Zelski, S. J.; Kariagina, A.; Haslam, S. Z.; Lu, K. P.; Alarid, E. T. Regulation of estrogen receptor α N-terminus conformation and function by peptidyl prolyl isomerase pin1. *Mol. Cell. Biol.* 32, 445 (2012).
107. Klinge, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* 29, 2905–2919 (2001).
108. Lin, C. Y.; Vega, V. B.; Thomsen, J. S.; Zhang, T.; Say, L. K.; Xie, M.; Kuo, P. C.; Lipovich, L.; Barnett, D. H.; Stossi, F.; Yeo, A.; George, J.; Kuznetsov, V. A.; Lee, Y. K.; Charn, T. H.; Palanisamy, N.; Miller, L. D.; Cheung, E.; Katzenellenbogen, B. S.; Ruan, Y.; Bourque, G.; Wei C. L.; Liu, E. T. Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS Genet.* 3, 0867–0885 (2007).
109. Huang, J.; Li, X.; Hilf, R.; Bambara, R. A.; Muyan, M. Molecular basis of therapeutic strategies for breast cancer. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 5, 379–396 (2005).

110. Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L.; Scanlan, T. S.; Shiau, A. K.; Uht, R. M.; Webb, P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 311–317 (2000).
111. Safe, S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam. Horm.* 62, 231–252 (2001).
112. Björnström, L.; Sjöberg, M. Mutations in the estrogen receptor DNA-binding domain discriminate between the classical mechanism of action and cross-talk with Stat5b and activating protein 1 (AP-1). *J. Biol. Chem.* 277, 48479–48483 (2002).
113. Cheung, E.; Acevedo, M. L.; Cole, P. A.; Kraus, W. L. Altered pharmacology and distinct coactivator usage for estrogen receptor-dependent transcription through activating protein-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 559 (2005).
114. Mal, R.; Magner, A.; David, J.; Datta, J.; Vallabhaneni, M.; Kassem, M.; Manouchehri, J.; Willingham, N.; Stover, D.; Vandeusen, J.; Sardesai, S.; Williams, N.; Wesolowski, R.; Lustberg, M.; Ganju, R. K.; Ramaswamy, B.; Cherian, M. A. Estrogen receptor beta (ER β): A ligand activated tumor suppressor. *Front. Oncol.* 10, 2151 (2020).
115. Fanning, S.W.; Mayne, C.G.; Dharmarajan, V.; Carlson, K.E.; Martin, T.A.; Novick, S.J.; Toy, W.; Green, B.; Panchamukhi, S.; Katzenellenbogen, B.S.; Tajkhorshid, E.; Griffin, P. R.; Shen, Y.; Chandarlapaty, S.; Katzenellenbogen, J. A.; Greene, G. L. Estrogen receptor alpha somatic mutations Y537S and D538G confer breast cancer endocrine resistance by stabilizing the activating function-2 binding conformation. *Elife* 5, (2016).
116. Lees, J. A.; Fawell, S. E.; White, R.; Parker, M. G. A 22-amino-acid peptide restores DNA-binding activity to dimerization-defective mutants of the estrogen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5529 (1990).
117. Pike, A. C. W.; Brzozowski, A. M.; Hubbard, R. E. A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 261–268 (2000).
118. Tetel, M. J. Nuclear receptor coactivators: Essential players in steroid hormone action in brain and behavior. *J. Neuroendocrinol.* 21, 229 (2009).
119. Stenoien, D. L.; Patel, K.; Mancini, M. G.; Dutertre, M.; Smith, C. L.; O'Malley, B. W.; Mancini, M. A. FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nat. Cell Biol.* 3, 15–23 (2001).
120. Muyan, M.; Callahan, L. M.; Huang, Y.; Lee, A. J. The ligand-mediated nuclear mobility and interaction with estrogen responsive elements of estrogen receptors are subtype-

- specific. *J. Mol. Endocrinol.* 49, 249 (2012).
121. Marino, M.; Ascenzi, P.; Acconcia, F. S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids* 71, 298–303 (2006).
 122. Acconcia, F.; Ascenzi, P.; Fabozzi, G.; Visca, P.; Marino, M. S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 878–883 (2004).
 123. Galluzzo, P.; Caiazza, F.; Moreno, S.; Marino, M. Role of ERbeta palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocr. Relat. Cancer* 14, 153–167 (2007).
 124. Marino, M.; Ascenzi, P. Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 73, 853–858 (2008).
 125. Pedram, A.; Razandi, M.; Sainson, R. C. A.; Kim, J. K.; Hughes, C. C.; Levin, E. R. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 282, 22278–22288 (2007).
 126. Echeverria, P. C.; Picard Didier, D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 641–649 (2010).
 127. Lombardi, M.; Castoria, G.; Migliaccio, A.; Barone, M. V.; Di Stasio, R.; Ciociola, A.; Bottero, D.; Yamaguchi, H.; Appella, E.; Auricchio, F. Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *J. Cell Biol.* 182, 327 (2008).
 128. Giraldi, T.; Giovannelli, P.; Di Donato, M.; Castoria, G.; Migliaccio, A.; Auricchio, F. Steroid signaling activation and intracellular localization of sex steroid receptors. *J. Cell Commun. Signal.* 4, 161 (2010).
 129. Kumar, P.; Wu, Q.; Chambliss, K. L.; Yuhanna, I. S.; Mumby, S. M.; Mineo, C.; Tall, G. G.; Shaul, P. W. Direct interactions with G α i and G β γ mediate nongenomic signaling by estrogen receptor α . *Mol. Endocrinol.* 21, 1370–1380 (2007).
 130. Galluzzo, P.; Ascenzi, P.; Bulzomi, P.; Marino, M. The nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor alpha-palmitoylation. *Endocrinology* 149, 2567–2575 (2008).
 131. Bentrem, D. J.; Dardes, R. C.; Liu, H.; Macgregor-Schafer, J.; Zapf, J. W.; Jordan, V. C. Molecular mechanism of action at estrogen receptor alpha of a new clinically relevant antiestrogen (GW7604) related to tamoxifen. *Endocrinology* 142, 838–846 (2001).

132. Safe, S.; Kim, K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J. Mol. Endocrinol.* 41, 263–275 (2008).
133. Heldring, N.; Pike, A.; Andersson, S.; Matthews, J.; Cheng, G.; Hartman, J.; Tujague, M.; Ström, A.; Treuter, E.; Warner, M.; Gustafsson, J. A. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* 87, 905–931 (2007).
134. Chen, H.; Lin, R. J.; Xie, W.; Wilpitz, D.; Evans, R. M. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation *via* acetylation of an acetylase. *Cell* 98, 675–686 (1999).
135. Shang, Y.; Hu, X.; DiRenzo, J.; Lazar, M. A.; Brown, M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103, 843–852 (2000).
136. Métivier, R.; Penot, G.; Hübner, M. R.; Reid, G.; Brand, H.; Koš, M.; Gannon, F. Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115, 751–763 (2003).
137. Métivier, R.; Penot, G.; Carmouche, R. P.; Hübner, M. R.; Reid, G.; Denger, S.; Manu, D.; Brand, H.; Koš, M.; Benes, V.; Gannon, F. Transcriptional complexes engaged by apo-estrogen receptor- α isoforms have divergent outcomes. *EMBO J.* 23, 3653 (2004).
138. Reid, G.; Denger, S.; Kos, M.; Gannon, F. Human estrogen receptor- α : regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 821–831 (2002).
139. Green, S.; Kumar, V.; Theulaz, I.; Wahli, W.; Chambon, P. The *N*-terminal DNA-binding ‘zinc finger’ of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J.* 7, 3037–3044 (1988).
140. Mader, S.; Kumar, V.; De Verneuil, H.; Chambon, P. Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nat.* 1989 3386212 338, 271–274 (1989).
141. Schwabe, J. W.; Chapman, L.; Rhodes, D. The oestrogen receptor recognizes an imperfectly palindromic response element through an alternative side-chain conformation. *Structure* 3, 201–213 (1995).
142. Driscoll, M. D.; Sathya, G.; Muyan, M.; Klinge, C. M.; Hilf, R.; Bambara, R. A. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J. Biol. Chem.* 273, 29321–29330 (1998).
143. Schwabe, J. W.; Neuhaus, D.; Rhodes, D. Solution structure of the DNA-binding domain

- of the oestrogen receptor. *Nature*. 348, 458-461 (1990).
144. Tzukerman, M. T.; Esty, A.; Santiso-Mere, D.; Danielian, P.; Parker, M. G.; Stein, R. B.; Pike, J. W.; McDonnell, D. P. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol. Endocrinol.* 8, 21–30 (1994).
 145. Kovács, T.; Szabó-Meleg, E.; Ábrahám, I. M. Estradiol-induced epigenetically mediated mechanisms and regulation of gene expression. *Int. J. Mol. Sci.* 21, (2020).
 146. Kraus, W. L.; Kadonaga, J. T. p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription *via* differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes Dev.* 12, 331 (1998).
 147. Lonard, D. M.; Nawaz, Z.; Smith, C. L.; O'Malley, B. W. The 26S proteasome is required for estrogen receptor- α and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor- α transactivation. *Mol. Cell* 5, 939–948 (2000).
 148. Feng, J.; Chang, H.; Li, E.; Fan, G. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 79, 734–746 (2005).
 149. Mohn, F.; Weber, M.; Rebhan, M.; Roloff, T. C.; Richter, J.; Stadler, M. B.; Bibel, M.; Schübeler, D. Lineage-specific polycomb targets and *de novo* DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol. Cell* 30, 755–766 (2008).
 150. Ung, M.; Ma, X.; Johnson, K. C.; Christensen, B. C.; Cheng, C. Effect of estrogen receptor α binding on functional DNA methylation in breast cancer. *Epigenetics* 9, 523 (2014).
 151. Greer, E. L.; Shi, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 13, 343–357 (2012).
 152. Zhao, Z.; Fan, L.; Fortress, A. M.; Boulware, M. I.; Frick, K. M. Hippocampal histone acetylation regulates object recognition and the estradiol-induced enhancement of object recognition. *J. Neurosci.* 32, 2344–2351 (2012).
 153. Van Der Weijden, V. A.; Flöter, V. L.; Ulbrich, S. E. Gestational oral low-dose estradiol-17 β induces altered DNA methylation of CDKN2D and PSAT1 in embryos and adult offspring. *Sci. Reports* 2018 81 8, 1–12 (2018).
 154. Wang, S.; Li, X.; Zhang, W.; Gao, Y.; Zhang, K.; Hao, Q.; Li, W.; Wang, Z.; Li, M.; Zhang, W.; Zhang, Y.; Zhang, C. Genome-wide investigation of genes regulated by *era* in breast cancer cells. *Molecules* 23, (2018).

155. Feinberg, A. P. The epigenetics of cancer etiology. *Semin. Cancer Biol.* 14, 427–432 (2004).
156. Ito, S.; Shen, L.; Dai, Q.; Wu, S. C.; Collins, L. B.; Swenberg, J. A.; He, C.; Zhang, Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–1303 (2011).
157. Melamed, P.; Yosefzon, Y.; David, C.; Tsukerman, A.; Pnueli, L. Tet enzymes, variants, and differential effects on function. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 22 (2018).
158. Prochnow, C.; Bransteitter, R.; Klein, M. G.; Goodman, M. F.; Chen, X. S. The APOBEC-2 crystal structure and functional implications for the deaminase AID. *Nature* 445, 447–451 (2007).
159. Vasudevan, A. A. J.; Smits, S. H. J.; Höppner, A.; Häussinger, D.; Koenig, B. W.; Münk, C. Structural features of antiviral DNA cytidine deaminases. *Biol. Chem.* 394, 1357–1370 (2013).
160. Conticello, S. G. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol.* 9, 1–10 (2008).
161. Conticello, S. G. Interaction between antibody-diversification enzyme AID and spliceosome-associated factor CTNNB1. *Mol. Cell* 31, 474–484 (2008).
162. Kohli, R. M.; Zhang, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472–479 (2013).
163. Chen, J. Q.; Cammarata, P. R.; Baines, C. P.; Yager, J. D. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1540–1570 (2009).
164. Yager, J. D.; Chen, J. Q. Mitochondrial estrogen receptors-new insights into specific functions. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 89–91 (2007).
165. Hall, J. M.; Couse, J. F.; Korach, K. S. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 36869–36872 (2001).
166. Björnström, L.; Sjöberg, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* 19, 833–842 (2005).
167. Safe, S.; Abdelrahim, M. Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur. J. Cancer* 41, 2438–2448 (2005).
168. Saville, B.; Wormke, M.; Wang, F.; Nguyen, T.; Enmark, E.; Kuiper, G.; Gustafsson, J. Å.;

- Safe, S. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J. Biol. Chem.* 275, 5379–5387 (2000).
169. Patel, H. K.; Bihani, T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacol. Ther.* 186, 1–24 (2018).
 170. Perou, C.M.; Sørile, T.; Eisen, M.B.; Van De Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Ress, C.A.; Pollack, J.R.; Ross, D.T.; Johnsen, H.; Akslen, L.A.; Fluge, O.; Pergamenschikov, A.; Williams, C.; Zhu, S. X.; Lønning, P. E.; Børresen-Dale, A. L.; Brown, P. O.; Botstein, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747–752 (2000).
 171. Orlando, L.; Schiavone, P.; Fedele, P.; Calvani, N.; Nacci, A.; Rizzo, P.; Marino, A.; D'Amico, M.; Sponziello, F.; Mazzoni, E.; Cinefra, M.; Fazio, N.; Maiello, E.; Silvestris, N.; Colucci, G.; Cinieri S. Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 36 Suppl 3, (2010).
 172. Nilsson, S.; Koehler, K. F. Oestrogen receptors and selective oestrogen receptor modulators: Molecular and cellular pharmacology. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96, 15–25 (2005).
 173. Y. Maximov, P.; M. Lee, T.; Craig Jordan, V. The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Curr. Clin. Pharmacol.* 8, 135–155 (2013).
 174. Cole, M. P.; Jones, C. T. A.; Todd, I. D. H. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *Br. J. Cancer* 25, 270–275 (1971).
 175. Ward, H. W. C. Anti-oestrogen therapy for breast cancer: A trial of tamoxifen at two dose levels. *Br. Med. J.* 1, 13 (1973).
 176. Jordan, V. C. The development of tamoxifen for breast cancer therapy: A tribute to the late Arthur L. Walpole. *Breast Cancer Res. Treat.* 11, 197–209 (1988).
 177. Lippman, M. E.; Bolan, G. Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. *Nature* 256, 592–593 (1975).
 178. Allen, K. E.; Clark, E. R.; Jordan, V. C. Evidence for the metabolic activation of non-steroidal antioestrogens: a study of structure-activity relationships. *Br. J. Pharmacol.* 71, 83 (1980).
 179. Jordan, V. C.; Collins, M. M.; Rowsby, L.; Prestwich, G. A monohydroxylated metabolite

- of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J. Endocrinol.* 75, 305–316 (1977).
180. Fisher, B.; Costantino, J. P.; Wickerham, D. L.; Redmond, C. K.; Kavanah, M.; Cronin, W. M.; Vogel, V.; Robidoux, A.; Dimitrov, N.; Atkins, J.; Daly, M.; Wieand, S.; Tan-Chiu, E.; Ford, L.; Wolmark, N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1371–1388 (1998).
 181. Gu, R.; Jia, W.; Zeng, Y.; Rao, N.; Hu, Y.; Li, S.; Wu, J.; Jin, L.; Chen, L.; Long, M.; Chen, K.; Chen, L.; Xiao, Q.; Wu, M.; Song, E.; Su, F. A comparison of survival outcomes and side effects of toremifene or tamoxifen therapy in premenopausal estrogen and progesterone receptor positive breast cancer patients: A retrospective cohort study. *BMC Cancer* 12, 1–10 (2012).
 182. Lorizio, W.; Wu, A. H. B.; Beattie, M. S.; Rugo, H.; Tchu, S.; Kerlikowske, K.; Ziv, E. Clinical and biomarker predictors of side effects from tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* 132, 1107–1118 (2012).
 183. Johnson, M. D.; Zuo, H.; Lee, K.H.; Trebley, J. P.; Rae, J. M.; Weatherman, R. V.; Desta, Z.; Flockhart, D. A.; Skaar, T. C. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-*N*-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* 85, 151–159 (2004).
 184. de Vries Schultink, A. H. M.; Zwart, W.; Linn, S. C.; Beijnen, J. H.; Huitema, A. D. R. Effects of pharmacogenetics on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tamoxifen. *Clin. Pharmacokinet.* 54, 797–810 (2015).
 185. Pike, A. C. W.; Brzozowski, A. M.; Hubbard, R. E.; Bonn, T.; Thorsell, A. G.; Engström, O.; Ljunggren, J.; Gustafsson, J. Å.; Carlquist, M. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J.* 18, 4608–4618 (1999).
 186. Keeton, E. K.; Brown, M. Cell cycle progression stimulated by tamoxifen-bound estrogen receptor-alpha and promoter-specific effects in breast cancer cells deficient in N-CoR and SMRT. *Mol. Endocrinol.* 19, 1543–1554 (2005).
 187. Romano, A.; Adriaens, M.; Kuenen, S.; Delvoux, B.; Dunselman, G.; Evelo, C.; Groothuis, P. Identification of novel ER-alpha target genes in breast cancer cells: gene- and cell-selective co-regulator recruitment at target promoters determines the response to 17beta-

- estradiol and tamoxifen. *Mol. Cell. Endocrinol.* 314, 90–100 (2010).
188. Gottardis, M. M.; Robinson, S. P.; Satyaswaroop, P. G.; Jordan, V. C. Contrasting actions of tamoxifen on endometrial and breast tumor growth in the athymic mouse. *Cancer Res.* 48, 812–815 (1988).
 189. Kallio, S.; Kangas, L.; Blanco, G.; Johansson, R.; Karjalainen, A.; Perilä, M.; Pippo, I.; Sundquist, H.; Södervall, M.; Toivola, R. A new triphenylethylene compound, Fc-1157a. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1986 172 17, 103–108 (1986).
 190. Ye, Q. L.; Zhai, Z. M. Toremifene and tamoxifen have similar efficacy in the treatment of patients with breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *Mol. Biol. Rep.* 41, 751–756 (2014).
 191. Osborne, C. K.; Wiebe, V. J.; McGuire, W. L.; Ciocca, D. R.; Degregorio, M. W. Tamoxifen and the isomers of 4-hydroxytamoxifen in tamoxifen-resistant tumors from breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 10, 304–310 (1992).
 192. Hayes, D. F.; Van Zyl, J. A.; Hacking, A.; Goedhals, L.; Bezwoda, W. R.; Mailliard, J. A.; Jones, S. E.; Vogel, C. L.; Berris, R. F.; Shemano, I. Randomized comparison of tamoxifen and two separate doses of toremifene in postmenopausal patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 13, 2556–2566 (1995).
 193. Gottardis, M. M.; Jordan, V. C. Antitumor actions of keoxifene and tamoxifen in the *N*-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinoma model. *Cancer Res.* 47, 4020–4024 (1987).
 194. Dayan, G.; Lupien, M.; Auger, A.; Anghel, S. I.; Rocha, W.; Croisetière, S.; Katzenellenbogen, J. A.; Mader, S. Tamoxifen and raloxifene differ in their functional interactions with aspartate 351 of estrogen receptor alpha. *Mol. Pharmacol.* 70, 579–588 (2006).
 195. Levenson, A. S.; Wolf, D. M.; Catherino, W. H.; Takei, H.; Craig Jordan, V. Understanding the antiestrogenic actions of raloxifene and a mechanism of drug resistance to tamoxifen. *Breast Cancer* 1998 52 5, 99–106 (1998).
 196. Shang, Y.; Brown, M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295, 2465–2468 (2002).
 197. Vogel, V. G.; Costantino, J. P.; Wickerham, D. L.; Cronin, W. M.; Cecchini, R. S.; Atkins, J. N.; Bevers, T. B.; Fehrenbacher, L.; Pajon, E. R.; Wade, J. L. 3rd; Robidoux, A.;

- Margolese, R. G.; James, J.; Runowicz, C. D.; Ganz, P. A.; Reis, S. E.; McCaskill-Stevens, W.; Ford, L. G.; Jordan, V. C.; Wolmark, N. National surgical adjuvant breast and bowel project. Update of the national surgical adjuvant breast and bowel project study of tamoxifen and raloxifene (STAR) P-2 trial: Preventing breast cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 3, 696–706 (2010).
198. Poulin, R.; Merand, Y.; Poirier, D.; Levesque, C.; Dufour, J. M.; Labrie, F. Antiestrogenic properties of keoxifene, *trans*-4-hydroxytamoxifen, and ICI 164384, a new steroidal antiestrogen, in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 14, 65–76 (1989).
 199. Buzdar, A. U.; Marcus, C.; Holmes, F.; Hug, V.; Hortobagyi, G. Phase II evaluation of Ly156758 in metastatic breast cancer. *Oncology* 45, 344–345 (1988).
 200. Gradishar, W., Glusman, J.; Lu, Y.; Vogel, C.; Cohen, F. J.; Sledge, G. W. Jr. Effects of high dose raloxifene in selected patients with advanced breast carcinoma. *Cancer*. 88, 2047-2053 (2000).
 201. Mizuma, T. Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: A study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10. *Int. J. Pharm.* 378, 140–141 (2009).
 202. Palkowitz, A. D.; Glasebrook, A. L.; Thrasher, K. J.; Hauser, K. L.; Short, L. L.; Phillips, D. L.; Muehl, B. S.; Sato, M.; Shetler, P. K.; Cullinan, G. J.; Pell, T. R.; Bryant, H. U. Discovery and Synthesis of [6-hydroxy-3-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]phenoxy]-2-(4-hydroxyphenyl)]benzo[b] thiophene: A novel, highly potent, selective estrogen receptor modulator. *J. Med. Chem.* 40, 1407–1417 (1997).
 203. Suh, N.; Glasebrook, A. L.; Palkowitz, A. D.; Bryant, H. U.; Burris, L. L.; Starling, J. J.; Pearce, H. L.; Williams, C.; Peer, C.; Wang, Y.; Sporn, M. B. Arzoxifene, a new selective estrogen receptor modulator for chemoprevention of experimental breast cancer. *Cancer Res.* 61, 8412-8415 (2001)
 204. Buzdar, A.; O’Shaughnessy, J.A.; Booser, D.J.; Pippen, J.E.; Jones, S.E.; Munster, P.N.; Peterson, P.; Melemed, A.S.; Winer, E.; Hudis, C. Phase II, randomized, double-blind study of two dose levels of arzoxifene in patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 21, 1007–1014 (2003).

205. Deshmane, V. L.; Krishnamurthy, S.; Melemed, A. S.; Peterson, P.; Buzdar, A. U. Phase III double-blind trial of arzoxifene compared with tamoxifen for locally advanced or metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 25, 4967–4973 (2007).
206. Komm, B. S.; Kharode, Y. P.; Bodine, P. V. N.; Harris, H. A.; Miller, C. P.; Lyttle, C. R. Bazedoxifene acetate: A selective estrogen receptor modulator with improved selectivity. *Endocrinology* 146, 3999–4008 (2005).
207. Wardell, S. E.; Nelson, E. R.; Chao, C. A.; McDonnell, D. P. Bazedoxifene exhibits antiestrogenic activity in animal models of tamoxifen-resistant breast cancer: Implications for treatment of advanced disease. *Clin. Cancer Res.* 19, 2420–2431 (2013).
208. Archer, D. F.; Pinkerton, J. V.; Utian, W. H.; Menegoci, J. C.; De Villiers, T. J.; Kin Yuen, C.; Levine, A. B.; Chines, A. A.; Constantine, G. D. Bazedoxifene, a selective estrogen receptor modulator: effects on the endometrium, ovaries, and breast from a randomized controlled trial in osteoporotic postmenopausal women. *Menopause* 16, 1109–1115 (2009).
209. Wardell, S. E.; Nelson, E. R.; Chao, C. A.; Alley, H. M.; McDonnell, D. P. Evaluation of the pharmacological activities of RAD1901, a selective estrogen receptor degrader. *Endocr. Relat. Cancer* 22, 713–724 (2015).
210. Lu, Y.; Liu, W. Selective estrogen receptor degraders (SERDs): A promising strategy for estrogen receptor positive endocrine-resistant breast cancer. *J. Med. Chem.* 63, 15094–15114 (2020).
211. Nardone, A.; De Angelis, C.; Trivedi, M. V.; Osborne, C. K.; Schiff, R. The changing role of ER in endocrine resistance. *Breast* 24 Suppl 2, S60–S66 (2015).
212. McDonnell, D. P.; Wardell, S. E. The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: Implications for new drug discovery in breast cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 620–628 (2010).
213. Wakeling, A. E, Bowler J. Biology and mode of action of pure antioestrogens. *Drugs. Exp. Clin. Res.* 14, 729-734 (1988).
214. Pike, A. C. W.; Brzozowski, A. M.; Walton, J.; Hubbard, R. E.; Thorsell, A. G.; Li, Y. L.; Gustafsson, J. Å.; Carlquist, M. Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen. *Structure* 9, 145–153 (2001).
215. Wakeling, A. E.; Bowler, J. ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43, 173–177 (1992).

216. Chen, D.; Pace, P. E.; Coombes, R. C.; Ali, S. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1002–1015 (1999).
217. Wijayarathne, A. L.; McDonnell, D. P. The human estrogen receptor- α is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J. Biol. Chem.* 276, 35684–35692 (2001).
218. Hu, X. F.; Veroni, M.; de Luise, M.; Wakeling, A.; Sutherland, R.; Watts, C. K. W.; Zalcberg, J. R. Circumvention of tamoxifen resistance by the pure anti-estrogen ICI 182,780. *Int. J. cancer* 55, 873–876 (1993).
219. Robertson, J. F. R.; Osborne, C. K.; Howell, A.; Jones, S. E.; Mauriac, L.; Ellis, M.; Kleeberg, U. R.; Come, S. E.; Vergote, I.; Gertler, S.; Buzdar, A.; Webster, A.; Morris, C. Fulvestrant versus anastrozole for the treatment of advanced breast carcinoma in postmenopausal women: a prospective combined analysis of two multicenter trials. *Cancer* 98, 229–238 (2003).
220. Robertson, J. F. R.; Lindemann, J.; Garnett, S.; Anderson, E.; Nicholson, R. I.; Kuter, I.; Gee, J. M. W. A good drug made better: the fulvestrant dose-response story. *Clin. Breast Cancer* 14, 381–389 (2014).
221. Harrison, M.; Laight, A.; Clarke, D.; Giles, P.; Yates, Y. Pharmacokinetics and metabolism of fulvestrant after oral, intravenous and intramuscular administration in healthy volunteers. *Eur. J. Cancer Suppl.* 1, S171 (2003).
222. Liu, J.; Zheng, S.; Akerstrom, V. L.; Yuan, C.; Ma, Y.; Zhong, Q.; Zhang, C.; Zhang, Q.; Guo, S.; Ma, P.; Skripnikova, E. V.; Bratton, M. R.; Pannuti, A.; Miele, L.; Wiese, T. E.; Wang, G. Fulvestrant-3 boronic acid (ZB716): An orally bioavailable selective estrogen receptor downregulator (SERD). *J. Med. Chem.* 59, 8134 (2016).
223. Dickens, E.; Ahmed, S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surg.* 36, 134–138 (2018).
224. Willson, T. M.; Henke, B. R.; Momtahan, T. M.; Charifson, P. S.; Batchelor, K. W.; Lubahn, D. B.; Moore, L. B.; Oliver, B. B.; Sauls, H. R.; Triantafillou, J. A.; Wolfe, S. G.; Baer P. G. 3-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl)phenyl]acrylic acid: A non-steroidal estrogen with functional selectivity for bone over uterus in rats. *J. Med. Chem.* 37, 1550–1552 (1994).
225. Dardes, R. C.; O'Regan, R. M.; Gajdos, C.; Robinson, S. P.; Bentrem, D.; De Los Reyes, A.; Jordan, V. C. Effects of a new clinically relevant antiestrogen (GW5638) related to

- tamoxifen on breast and endometrial cancer growth *in vivo*. *Clin Cancer Res.* 8, 1995-2001 (2002).
226. McDonnell, D. P.; Wardell, S. E.; Norris, J. D. Oral selective estrogen receptor downregulators (SERDs), a breakthrough endocrine therapy for breast cancer. *J. Med. Chem.* 58, 4883–4887 (2015).
227. Lai, A.; Kahraman, M.; Govek, S.; Nagasawa, J.; Bonnefous, C.; Julien, J.; Douglas, K.; Sensintaffar, J.; Lu, N.; Lee, K.J.; Aparicio, A.; Kaufman, J.; Qian, J.; Shao, G.; Prudente, R.; Moon, M. J.; Joseph, J. D.; Darimont, B.; Brigham, D.; Grillot, K.; Heyman, R.; Rix, P. J.; Hager, J. H.; Smith, N. D. Identification of GDC-0810 (ARN-810), an orally bioavailable selective estrogen receptor degrader (SERD) that demonstrates robust activity in tamoxifen-resistant breast cancer xenografts. *J. Med. Chem.* 58, 4888–4904 (2015).
228. A study of GDC-0810 versus fulvestrant in postmenopausal women with advanced or metastatic breast cancer resistant to aromatase inhibitor (AI) therapy (HydranGea), ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02569801>.
229. De Savi, C.; Bradbury, R. H.; Rabow, A. A.; Norman, R. A.; De Almeida, C.; Andrews, D. M.; Ballard, P.; Buttar, D.; Callis, R. J.; Currie, G. S.; Curwen, J. O., Davies, C. D., Donald, C. S.; Feron, L. J. L.; Gingell, H.; Glossop, S. C.; Hayter, B. R.; Hussain, S.; Karoutchi, G.; Lamont, S. G.; MacFaul, P.; Moss, T. A.; Pearson, S. E.; Tonge, M.; Walker, G. E.; Weir, H. M.; Wilson, Z. Optimization of a novel binding motif to (*E*)-3-(3,5-difluoro-4-((1*R*,3*R*)-2-(2-fluoro-2-methylpropyl)-3-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-1-yl)phenyl)acrylic Acid (AZD9496), a potent and orally bioavailable selective estrogen receptor downregulator and antagonist. *J. Med. Chem.* 58, 8128–8140 (2015).
230. Weir, H. M.; Bradbury, R. H.; Rabow, A. A.; Buttar, D.; Callis, R. J.; Curwen, J. O.; De Almeida, C.; Ballard, P.; Hulse, M.; Donald, C. S.; Feron, L. J.; Karoutchi, G.; MacFaul, P.; Moss, T.; Norman, R. A.; Pearson, S. E.; Tonge, M.; Davies, G.; Walker, G. E.; Wilson, Z.; Rowlinson, R.; Powell, S.; Sadler, C.; Richmond, G.; Ladd, B.; Pazolli, E.; Mazzola, A. M.; D'Cruz, C.; De Savi, C. AZD9496: an oral estrogen receptor inhibitor that blocks the growth of ER-positive and ESR1-mutant breast tumors in preclinical models. *Cancer Res.* 76, 3307–3318 (2016).
231. AZD9496 First Time in Patients Ascending Dose Study, ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02248090>.

232. Mladenović, M. Korelacija bioloških aktivnosti sintetisanih derivata 4-hidroksikumarina i njihovih fizičko-hemijskih parametara. *Doktorska disertacija*. Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet (2011).
233. Stanković, N. Farmakologija i toksikološki profil novosintetisanih derivata hromana-2,4-diona u funkciji antikoagulativne aktivnosti *in vivo*. *Doktorska disertacija*. Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet (2018).
234. Zhang, T.; Zhong, S.; Hou, L.; Li, T.; Xing, X.J.; Guan, T.; Zhang, J.; Wang, Y. Estrogenic properties of coumarins and meroterpene from the fruits of *Cullen corylifolium*: Experimental and computational studies. *Phytochemistry* 152, 148–153 (2018).
235. Zingue, S.; Michel, T.; Nde, C.B.M.; Njuh, A.N.; Cisilotto, J.; Ndinteh, D.T.; Clyne, C.; Fernandez, X.; Creczynski-Pasa, T.B.; Njamen, D. Estrogen-like and tissue-selective effects of 7-methoxycoumarin from *Ficus umbellata* (Moraceae): An *in vitro* and *in vivo* study. *BMC Complement. Altern. Med.* 17, 1–13 (2017).
236. Bhatia, R.; Rawal, R. K. Coumarin hybrids: Promising scaffolds in the treatment of breast cancer. *Mini. Rev. Med. Chem.* 19, 1443-1458 (2019).
237. Roelens, F.; Huvaere, K.; Dhooge, W.; Van Cleemput, M.; Comhaire, F.; De Keukeleire, D. Regioselective synthesis and estrogenicity of (\pm)-8-alkyl-5,7-dihydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-3,4-dihydrocoumarins. *Eur. J. Med. Chem.* 40, 1042–1051 (2005).
238. Jacquot, Y.; Laios, I.; Cleeren, A.; Nonclercq, D.; Bermont, L.; Refouvelet, B.; Boubekeur, K.; Xicluna, A.; Leclercq, G.; Laurent, G. Synthesis, structure, and estrogenic activity of 4-amino-3-(2-methylbenzyl)coumarins on human breast carcinoma cells. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 2269–2282 (2007).
239. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet* 365, 1687–1717 (2005).
240. Sashidhara, K. V.; Rosaiah, J. N.; Kumar, M.; Gara, R. K.; Nayak, L. V.; Srivastava, K.; Bid, H. K.; Konwar, R. Neo-tanshinlactone inspired synthesis, *in vitro* evaluation of novel substituted benzocoumarin derivatives as potent anti-breast cancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 7127–7131 (2010).
241. Ahmed, N.; Dubuc, C.; Rousseau, J.; Bénard, F.; van Lier, J. E. Synthesis, characterization, and estrogen receptor binding affinity of flavone-, indole-, and furan-estradiol conjugates.

- Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 3212–3216 (2007).
242. Musa, M. A.; Khan, M. O. F.; Cooperwood, J. S. Synthesis and antiproliferative activity of coumarin-estrogen conjugates against breast cancer cell lines. *Lett. Drug Des. Discov.* 6, 133 (2009).
243. Dhawan, S.; Kerru, N.; Awolade, P.; Singh-Pillay, A.; Saha, S. T.; Kaur, M.; Jonnalagadda, S. B.; Singh, P. Synthesis, computational studies and antiproliferative activities of coumarin-tagged 1,3,4-oxadiazole conjugates against MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* 26, 5612–5623 (2018).
244. Mohareb, R. M.; Fleita, D. H.; Sakka, O. K. Novel Synthesis of hydrazide-hydrazone derivatives and their utilization in the synthesis of coumarin, pyridine, thiazole and thiophene derivatives with antitumor activity. *Mol.* 2011, Vol. 16, Pages 16-27 16, 16–27 (2010).
245. Lakshmi Ranganatha, V.; Zameer, F.; Meghashri, S.; Rekha, N. D.; Girish, V.; Gurupadaswamy, H. D.; Khanum, S. A. Design, synthesis, and anticancer properties of novel benzophenone-conjugated coumarin analogs. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 346, 901–911 (2013).
246. Xiao, C. F.; Tao, L. Y.; Sun, H. Y.; Wei, W.; Chen, Y.; Fu, L. W.; Zou, Y. Design, synthesis and antitumor activity of a series of novel coumarin–stilbenes hybrids, the 3-arylcoumarins. *Chinese Chem. Lett.* 21, 1295–1298 (2010).
247. Yang, J.; Liu, G. Y.; Dai, F.; Cao, X. Y.; Kang, Y. F.; Hu, L. M.; Tang, J. J.; Li, X. Z.; Li, Y.; Jin, X. L.; Zhou, B. Synthesis and biological evaluation of hydroxylated 3-phenylcoumarins as antioxidants and antiproliferative agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 6420–6425 (2011).
248. Paul, K.; Bindal, S.; Luxami, V. Synthesis of new conjugated coumarin-benzimidazole hybrids and their anticancer activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 3667–3672 (2013).
249. Wang, Z. C.; Qin, Y. J.; Wang, P. F.; Yang, Y. A.; Wen, Q.; Zhang, X.; Qiu, H. Y.; Duan, Y. T.; Wang, Y. T.; Sang, Y. L.; Zhu, H. L. Sulfonamides containing coumarin moieties selectively and potently inhibit carbonic anhydrases II and IX: design, synthesis, inhibitory activity and 3D-QSAR analysis. *Eur. J. Med. Chem.* 66, 1–11 (2013).
250. Mokale, S. N.; Begum, A.; Sakle, N. S.; Shelke, V. R.; Bhavale, S. A. Design, synthesis and anticancer screening of 3-(3-(substituted phenyl)acryloyl)-2H-chromen-2-ones as selective

- anti-breast cancer agent. *Biomed. Pharmacother.* 89, 966–972 (2017).
251. Nunes, P. S. G.; da Silva, G.; Nascimento, S.; Mantoani, S. P.; de Andrade, P.; Bernardes, E. S.; Kawano, D. F.; Leopoldino, A. M.; Carvalho, I. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel 1,2,3-triazole-quinazolines as antiproliferative agents displaying ERK inhibitory activity. *Bioorg. Chem.* 113, 104982 (2021).
252. Sashidhara, K. V.; Avula, S. R.; Sharma, K.; Palnati, G. R.; Bathula, S. R. Discovery of coumarin-monastrol hybrid as potential antibreast tumor-specific agent. *Eur. J. Med. Chem.* 60, 120–127 (2013).
253. Sabry, N. M.; Mohamed, H. M.; Khattab, E. S. A. E. H.; Motlaq, S. S.; El-Agrody, A. M. Synthesis of 4*H*-chromene, coumarin, 12*H*-chromeno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives and some of their antimicrobial and cytotoxicity activities. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 765–772 (2011).
254. Kumar, A.; Sharma, S.; Maurya, R. A.; Sarkar, J. Diversity oriented synthesis of benzoxanthene and benzochromene libraries *via* one-pot, three-component reactions and their anti-proliferative activity. *J. Comb. Chem.* 12, 20–24 (2010).
255. Brady, H.; Desai, S.; Gayo-Fung, L. M.; Khammungkhune, S.; McKie, J. A.; O'Leary E, Pascasio, L.; Sutherland, M. K.; Anderson, D. W.; Bhagwat, S. S.; Stein, B. Effects of SP500263, a novel, potent antiestrogen, on breast cancer cells and in xenograft models - *Cancer Res.* 62, 1439-1442 (2002).
256. Brady, H.; Doubleday, M.; Gayo-Fung, L.M.; Hickman, M.; Khammungkhune, S.; Kois, A.; Lipps, S.; Pierce, S.; Richard, N.; Shevlin, G.; Sutherland, M. K.; Anderson, D.W.; Bhagwat, S. S.; Stein, B. Differential response of estrogen receptors alpha and beta to SP500263, a novel potent selective estrogen receptor modulator. *Mol. Pharmacol.* 61, 562–568 (2002).
257. Luo, G.; Chen, M.; Lyu, W.; Zhao, R.; Xu, Q.; You, Q.; Xiang, H. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel 3-aryl-4-anilino-2*H*-chromen-2-one derivatives targeting ER α as anti-breast cancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27, 2668–2673 (2017).
258. Luo, G.; Li, X.; Zhang, G.; Wu, C.; Tang, Z.; Liu, L.; You, Q.; Xiang, H. Novel SERMs based on 3-aryl-4-aryloxy-2*H*-chromen-2-one skeleton - A possible way to dual ER α /VEGFR-2 ligands for treatment of breast cancer. *Eur. J. Med. Chem.* 140, 252–273

- (2017).
259. Paek, S. M. Recent synthesis and discovery of Brefeldin A analogs. *Mar. Drugs* 16, 133 (2018).
 260. Lippincott-Schwartz, J.; Yuan, L. C.; Bonifacino, J. S.; Klausner, R. D. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with Brefeldin A: Evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56, 801–813 (1989).
 261. Dinter, A.; Berger, E. G. Golgi-disturbing agents. *Histochem. Cell Biol.* 109, 571–590 (1998).
 262. He, B.; Wang, Y.; Zheng, Y.; Chen, W.; Zhu, Q. Synthesis and cytotoxic evaluation of acylated brefeldin a derivatives as potential anticancer agents. *Chem. Biol. Drug Des.* 82, 307–316 (2013).
 263. Seehafer, K.; Rominger, F.; Helmchen, G.; Langhans, M.; Robinson, D. G.; Özata, B.; Brügger, B.; Strating, J. R. P. M.; Van Kuppeveld, F. J. M.; Klein, C. D. Synthesis and biological properties of novel brefeldin A analogues. *J. Med. Chem.* 56, 5872–5884 (2013).
 264. Argade, A. B.; Haugwitz, R. D.; Devraj, R.; Kozlowski, J.; Fanwick, P. E.; Cushman, M. Highly efficient diastereoselective Michael addition of various thiols to (+)-brefeldin A. *J. Org. Chem.* 63, 273–278 (1998).
 265. Mihović, N.; Tomašević, N.; Matić, S.; Mitrović, M. M.; Kostić, D. A.; Sabatino, M.; Antonini, L.; Ragno, R.; Mladenović, M. Human estrogen receptor α antagonists, part 1: 3-D QSAR-driven rational design of innovative coumarin-related antiestrogens as breast cancer suppressants through structure-based and ligand-based studies. *J. Chem. Inf. Model.* 61, 5028–5053 (2021).
 266. Gao, H.; Katzenellenbogen, J. A.; Garg, R.; Hansch, C. Comparative QSAR analysis of estrogen receptor ligands. *Chem. Rev.* 99, 723–744 (1999).
 267. Gao, H.; Williams, C.; Labute, P.; Bajorath, J. Binary quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis of estrogen receptor ligands. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 39, 164–168 (1999).
 268. Tong, W.; Perkins, R.; Strelitz, R.; Collantes, E. R.; Keenan, S.; Welsh, W. J.; Branham, W. S.; Sheehan, D. M. Quantitative structure-activity relationships (QSARs) for estrogen binding to the estrogen receptor: Predictions across species. *Environ. Health Perspect.* 105, 1116–1124 (1997).

269. Salum, L. de B.; Polikarpov, I.; Andricopulo, A. D. Structural and chemical basis for enhanced affinity and potency for a large series of estrogen receptor ligands: 2D and 3D QSAR studies. *J. Mol. Graph. Model.* 26, 434–442 (2007).
270. Tong, W.; Perkins, R.; Xing, L.; Welsh, W. J.; Sheehan, D. M. QSAR models for binding of estrogenic compounds to estrogen receptor α and β subtypes. *Endocrinology* 138, 4022–4025 (1997).
271. Yu, S. J.; Keenan, S. M.; Tong, W.; Welsh, W. J. Influence of the structural diversity of data sets on the statistical quality of three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) models: predicting the estrogenic activity of xenoestrogens. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1229–1234 (2002).
272. Vedani, A.; Dobler, M.; Lill, M. A. Combining protein modeling and 6D-QSAR. Simulating the binding of structurally diverse ligands to the estrogen receptor. *J. Med. Chem.* 48, 3700–3703 (2005).
273. Kurtanović, N.; Tomašević, N.; Matić, S.; Mitrović, M. M.; Kostić, D. A.; Sabatino, M.; Antonini, L.; Ragno, R.; Mladenović, M. Human estrogen receptor α antagonists, part 2: Synthesis driven by rational design, *in vitro* antiproliferative, and *in vivo* anticancer evaluation of innovative coumarin-related antiestrogens as breast cancer suppressants. *Eur. J. Med. Chem.* 227, 113869 (2022).
274. Silvestri, L.; Ballante, F.; Mai, A.; Marshall, G. R.; Ragno, R. Histone deacetylase inhibitors: structure-based modeling and isoform-selectivity prediction. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 2215–2235 (2012).
275. Anstead, G. M.; Carlson, K. E.; Katzenellenbogen, J. A. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 62, 268–303 (1997).
276. Wolber, G.; Langer, T. LigandScout: 3-D Pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J. Chem. Inf. Model.* 45, 160–169 (2004).
277. Sahayarayan, J. J.; Rajan, K. S.; Vidhyavathi, R.; Nachiappan, M.; Prabhu, D.; Alfarraj, S.; Arokiyaraj, S.; Daniel, A. N. In-silico protein-ligand docking studies against the estrogen protein of breast cancer using pharmacophore-based virtual screening approaches. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 400 (2021).
278. McGregor, M. J.; Muskal, S. M. Pharmacophore fingerprinting. 1. Application to QSAR

- and focused library design. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 39, 569–574 (1999).
279. Accelrys Software Inc.; (2009). Discovery Studio Modeling Environment, Release 2.5.1, San Diego, CA. <http://www.sciencedirect.com/reference/263156>.
280. Liao, C.; Sitzmann, M.; Pugliese, A.; Nicklaus, M. C. Software and resources for computational medicinal chemistry. *Future Med. Chem.* 3, 1057 (2011).
281. Mukherjee, S.; Nagar, S.; Mullick, S.; Mukherjee, A.; Saha, A. Pharmacophore mapping of selective binding affinity of estrogen modulators through classical and space modeling approaches: Exploration of bridged-cyclic compounds with diarylethylene linkage. *J. Chem. Inf. Model.* 47, 475–487 (2007).
282. Mukherjee, S.; Nagar, S.; Mullick, S.; Mukherjee, A.; Saha, A. Pharmacophore mapping of arylbenzothiophene derivatives for MCF cell inhibition using classical and 3D space modeling approaches. *J. Mol. Graph. Model.* 26, 884–892 (2008).
283. Islam, M. A.; Nagar, S.; Das, S.; Mukherjee, A.; Saha, A. Molecular design based on receptor-independent pharmacophore: application to estrogen receptor ligands. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1453–1460 (2008).
284. Brogi, S.; Kladi, M.; Vagias, C.; Papazafiri, P.; Roussis, V.; Tafi, A. Pharmacophore modeling for qualitative prediction of antiestrogenic activity. *J. Chem. Inf. Model.* 49, 2489–2497 (2009).
285. Fang, J.; Shen, J.; Cheng, F.; Xu, Z.; Liu, G.; Tang, Y. Computational Insights into Ligand Selectivity of Estrogen Receptors from Pharmacophore Modeling. *Mol. Inform.* 30, 539–549 (2011).
286. Brogi, S.; Papazafiri, P.; Roussis, V.; Tafi, A. 3D-QSAR using pharmacophore-based alignment and virtual screening for discovery of novel MCF-7 cell line inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 67, 344–351 (2013).
287. Dixon, S. L.; Smondjrev, A. M.; Knoll, E. H.; Rao, S. N.; Shaw, D. E.; Friesner, R. A. PHASE: a new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 20, 647–671 (2006).
288. Schrödinger. <https://www.schrodinger.com>.
289. Muchtaridi, M.; Yusuf, M.; Diantini, A.; Choi, S. B.; Al-Najjar, B. O.; Manurung, J. V.; Subarnas, A.; Achmad, T. H.; Wardhani, S. R.; Wahab, H. A. Potential Activity of

- Fevicordin-A from *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. Seeds as estrogen receptor antagonist based on cytotoxicity and molecular modelling studies. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 7225 (2014).
290. Huang, W.; Wei, W.; Yang, Y.; Zhang, T.; Shen, Z. Discovery of novel selective ER α /ER β ligands by multi-pharmacophore modeling and virtual screening. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 63, 780–791 (2015).
291. Niinivehmas, S. P.; Manivannan, E.; Rauhamäki, S.; Huuskonen, J.; Pentikäinen, O. T. Identification of estrogen receptor α ligands with virtual screening techniques. *J. Mol. Graph. Model.* 64, 30–39 (2016).
292. Islam, M. A.; Patel, D. A.; Rathod, S. G.; Chunarkar, P.; Pillay, T. S. Identification of structural requirements of estrogen receptor modulators using pharmacoinformatics techniques for application to estrogen therapy. *Med. Chem. Res.* 25, 407–421 (2016).
293. Chu, Z.; Li, Y. Designing modified polybrominated diphenyl ether BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-183, and BDE-209 molecules with decreased estrogenic activities using 3D-QSAR, pharmacophore models coupled with resolution V of the 210-3 fractional factorial design and molecular docking. *J. Hazard. Mater.* 364, 151–162 (2019).
294. Yu, E.; Xu, Y.; Shi, Y.; Yu, Q.; Liu, J.; Xu, L. Discovery of novel natural compound inhibitors targeting estrogen receptor α by an integrated virtual screening strategy. *J. Mol. Model.* 25, (2019).
295. Scott, J. S.; Bailey, A.; Davies, R. D. M.; Degorce, S. L.; Macfaul, P. A.; Gingell, H.; Moss, T.; Norman, R. A.; Pink, J. H.; Rabow, A. A.; Roberts, B. Smith, P. D. Tetrahydroisoquinoline phenols: Selective Estrogen receptor downregulator antagonists with oral bioavailability in rat. *ACS Med. Chem. Lett.* 7, 94–99 (2016).
296. Tria, G. S.; Abrams, T.; Baird, J.; Burks, H. E.; Firestone, B.; Gaither, L. A.; Hamann, L. G.; He, G.; Kirby, C. A.; Kim, S.; Lombardo, F.; Macchi, K. J.; McDonnell, D. P.; Mishina, Y.; Norris, J. D.; Nunez, J.; Springer, C.; Sun, Y.; Thomsen, N. M.; Wang, C.; Wang, J.; Yu, B.; Tiong-Yip, C. L.; Peukert, S. Discovery of LSZ102, a potent, orally bioavailable selective estrogen receptor degrader (SERD) for the treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *J. Med. Chem.* 61, 2837–2864 (2018).
297. Mardianingrum, R.; Yusuf, M.; Hariono, M.; Mohd Gazzali, A.; Muchtaridi, M. α -Mangostin and its derivatives against estrogen receptor alpha. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 40,

- 2621–2634 (2022).
298. Hariyanti, H.; Kurmardi, K.; Yanuar, A.; Hayun, H. Ligand based pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies of asymmetrical hexahydro-2*H*-Indazole Analogs of Curcumin (AIACs) to discover novel estrogen receptors alpha (ER α) inhibitor. *Indones. J. Chem.* 21, 137–147 (2020).
 299. Jereva, D.; Fratev, F.; Tsakovska, I.; Alov, P.; Pencheva, T.; Pajeva, I. Molecular dynamics simulation of the human estrogen receptor alpha: contribution to the pharmacophore of the agonists. *Math. Comput. Simul.* 133, 124–134 (2017).
 300. Gangloff, M.; Ruff, M.; Eiler, S.; Duclaud, S.; Wurtz, J.M.; Moras, D. Crystal structure of a mutant hERalpha ligand-binding domain reveals key structural features for the mechanism of partial agonism. *J. Biol. Chem.* 276, 15059–15065 (2001).
 301. Nettles, K. W.; Bruning, J. B.; Gil, G.; O'Neill, E. E.; Nowak, J.; Hughs, A.; Kim, Y.; DeSombre, E. R.; Dilis, R.; Hanson, R. N.; Joachimiak, A.; Greene, G. L. Structural plasticity in the oestrogen receptor ligand-binding domain. *EMBO Rep.* 8, 563–568 (2007).
 302. Vilar, S.; Cozza, G.; Moro, S. Medicinal chemistry and the molecular operating environment (MOE): Application of QSAR and molecular docking to drug discovery. *Curr Top Med Chem.* 8, 1555-1572 (2008).
 303. Munir, A.; Azam, S.; Mehmood, A.; Khan, Z.; Mehmood, A.; Fazal, S. Structure-based pharmacophore modeling, virtual screening and molecular docking for the treatment of ESR1 mutations in breast cancer. *Drug Des. Open Access* 5, 1–10 (2016).
 304. Heldring, N.; Pawson, T.; McDonnell, D.; Treuter, E.; Gustafsson, J. Å.; Pike, A. C. W. Structural insights into corepressor recognition by antagonist-bound estrogen receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 10449–10455 (2007).
 305. Fanning, S. W.; Jeselsohn, R.; Dharmarajan, V.; Mayne, C. G.; Karimi, M.; Buchwalter, G.; Houtman, R.; Toy, W.; Fowler, C. E.; Han, R.; Lainé, M.; Carlson, K. E.; Martin, T. A.; Nowak, J.; Nwachukwu, J. C.; Hosfield, D. J.; Chandarlapaty, S.; Tajkhorshid, E.; Nettles, K. W.; Griffin, P. R.; Shen, Y.; Katzenellenbogen, J. A.; Brown, M.; Greene, G. L. The SERM/SERD basedoxifene disrupts ESR1 helix 12 to overcome acquired hormone resistance in breast cancer cells. *Elife* 7, e37161 (2018).
 306. Muchtaridi, M.; Syahidah, H. N.; Subarnas, A.; Yusuf, M.; Bryant, S. D.; Langer, T. Molecular docking and 3D-pharmacophore modeling to study the interactions of chalcone

- derivatives with estrogen receptor alpha. *Pharmaceuticals (Basel)*. 10, 81 (2017).
307. Muchtaridi, M.; Yusuf, M.; Syahidah, H. N.; Subarnas, A.; Zamri, A.; Bryant, S. D.; Langer, T. Cytotoxicity of chalcone of *Eugenia aquea* Burm F. leaves against T47D breast cancer cell lines and its prediction as an estrogen receptor antagonist based on pharmacophore-molecular dynamics simulation. *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* 12, 33–43 (2019).
308. Herynk, M. H.; Fuqua, S. A. W. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr. Rev.* 25, 869–898 (2004).
309. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* 47, 1739–1749 (2004).
310. Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* 47, 1750–1759 (2004).
311. Sahayarayan, J. J.; Rajan, K. S.; Vidhyavathi, R.; Nachiappan, M.; Prabhu, D.; Alfarraj, S.; Arokiyaraj, S.; Daniel, A .N. In-silico protein-ligand docking studies against the estrogen protein of breast cancer using pharmacophore based virtual screening approaches. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 400–407 (2021).
312. Shylaja, R.; Loganathan, C.; Kabilan, S.; Vijayakumar, T.; Meganathan, C. Synthesis and evaluation of the antagonistic activity of 3-acetyl-2*H*-benzo[g]chromen-2-one against mutant Y537S estrogen receptor alpha via E-Pharmacophore modeling, molecular docking, molecular dynamics, and *in-vitro* cytotoxicity studies. *J. Mol. Struct.* 1224, 129289 (2021).
313. Nwachukwu, J. C.; Srinivasan, S.; Zheng, Y.; Wang, S.; Min, J.; Dong, C.; Liao, Z.; Nowak, J.; Wright, N. J.; Houtman, R.; Carlson, K. E.; Josan, J. S.; Elemento, O.; Katzenellenbogen, J. A.; Zhou, H. B.; Nettles, K. W. Predictive features of ligand-specific signaling through the estrogen receptor. *Mol. Syst. Biol.* 12, 864 (2016).
314. Nwachukwu, J. C.; Srinivasan, S.; Bruno, N. E.; Nowak, J.; Wright, N. J.; Minutolo, F.; Rangarajan, E. S.; IZard, T.; Yao, X. Q.; Grant, B. J.; Kojetin, D. J.; Elemento, O.; Katzenellenbogen, J. A.; Nettles, K. W. Systems structural biology analysis of ligand effects on ER α predicts cellular response to environmental estrogens and anti-hormone therapies. *Cell Chem. Biol.* 24, 35–45 (2017).

315. Srinivasan, S.; Nwachukwu, J.C.; Bruno, N.E.; Dharmarajan, V.; Goswami, D.; Kastrati, I.; Novick, S.; Nowak, J.; Cavett, V.; Zhou, H.B.; Boonmuen, N.; Zhao, Y.; Min, J.; Frasor, J.; Katzenellenbogen, B. S.; Griffin, P. R.; Katzenellenbogen, J. A.; Nettles, K. W. Full antagonism of the estrogen receptor without a prototypical ligand side chain. *Nat. Chem. Biol.* 13, 111–118 (2017).
316. Speltz, T. E.; Fanning, S. W.; Mayne, C. G.; Fowler, C.; Tajkhorshid, E.; Greene, G .L.; Moore, T. W. Stapled peptides with γ -methylated hydrocarbon chains for the estrogen receptor/coactivator interaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 55, 4252–4255 (2016).
317. Kurtanović, N.; Tomašević, N.; Matić, S.; Proia, E.; Sabatino, M.; Antonini, L.; Mladenović, M.; Ragno, R. Human estrogen receptor alpha antagonists, part 3: 3-D pharmacophore and 3-D QSAR guided Brefeldin A hit-to-lead optimization toward new breast cancer suppressants. *Molecules* 27, 2823 (2022).
318. Tanenbaum, D. M.; Wang, Y.; Williams, S. P.; Sigler, P. B. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5998–6003 (1998).
319. Eiler, S.; Gangloff, M.; Duclaud, S.; Moras, D.; Ruff, M. Overexpression, purification, and crystal structure of native ER alpha LBD. *Protein Expr. Purif.* 22, 165–173 (2001).
320. Pavlin, M.; Spinello, A.; Pennati, M. Zaffaroni, N.; Gobbi, S.; Bisi, A.; Colombo, G.; Magistrato, A. A computational assay of estrogen receptor α antagonists reveals the key common structural traits of drugs effectively fighting refractory breast cancers. *Sci. Rep.* 8, 649 (2018).
321. Brogi, S.; Ramalho, T. C.; Kuca, K.; Medina-Franco, J. L.; Valko M. Editorial: In silico methods for drug design and discovery. *Front Chem.* 8, 612 (2020).
322. Srinivasan, S.; Nwachukwu, J. C.; Parent, A. A.; Cavett, V.; Nowak, J.; Hughes, T. S.; Kojetin, D. J.; Katzenellenbogen, J. A.; Nettles, K. W. Ligand-binding dynamics rewire cellular signaling *via* estrogen receptor- α . *Nat. Chem. Biol.* 9, 326–332 (2013).
323. Nwachukwu, J. C.; Srinivasan, S.; Bruno, N. E.; Parent, A. A.; Hughes, T. S.; Pollock, J.A.; Gjyshi, O.; Cavett, V.; Nowak, J.; Garcia-Ordonez, R. D.; Houtman, R.; Griffin, P. R.; Kojetin, D. J.; Katzenellenbogen, J. A.; Conkright, M. D.; Nettles, K. W. Resveratrol modulates the inflammatory response *via* an estrogen receptor-signal integration network. *Elife.* 3, e02057 (2014).

324. Scott, J. S.; Moss, T. A.; Balazs, A.; Barlaam, B.; Breed, J.; Carbajo, R. J.; Chiarparin, E.; Davey, P. R. J.; Delpuech, O.; Fawell, S.; Fisher, D. I.; Gargica, S.; Gangl, E. T.; Grebe, T.; Greenwood, R. D.; Hande, S.; Hatoum-Mokdad, H.; Herlihy, K.; Hughes, S.; Hunt, T. A.; Huynh, H.; Janbon, S. L. M.; Johnson, T.; Kavanagh, S.; Klinowska, T.; Lawson, M.; Lister, A. S.; Marden, S.; McGinnity, D. F.; Morrow, C. J.; Nissink, J. W. M.; O'Donovan, D. H.; Peng, B.; Polanski, R.; Stead, D. S.; Stokes, S.; Thakur, K.; Throner, S. R.; Tucker, M. J.; Varnes, J.; Wang, H.; Wilson, D. M.; Wu, D.; Wu, Y.; Yang, B.; Yang, W. Discovery of AZD9833, a Potent and Orally Bioavailable Selective Estrogen Receptor Degradator and Antagonist. *J. Med. Chem.* 63, 14530–14559 (2020).
325. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612 (2004).
326. Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E. III; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Swails, J.; Goetz, A. W.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R. M.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Salomon-Ferrer, R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman P.A. AMBER 12, 2012, University of California, San Francisco.
327. So, F. V.; Guthrie, N.; Chambers, A. F.; Carroll, K. K. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Lett.* 112, 127–133 (1997).
328. Brožič, P.; Kocbek, P.; Sova, M.; Kristl, J.; Martens, S.; Adamski, J.; Gobec, S.; Lanišnik Rižner, T. Flavonoids and cinnamic acid derivatives as inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 301, 229–234 (2009).
329. Rathelot, P.; Azas, N.; El-Kashef, H.; Delmas, F.; Di Giorgio, C.; Timon-David, P.; Maldonado, J.; Vanelle, P. 1,3-diphenylpyrazoles: synthesis and antiparasitic activities of azomethine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 37, 671–679 (2002).
330. Sun, J.; Huang, Y. R.; Harrington, W. R.; Sheng, S.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S. Antagonists selective for estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 143, 941–947 (2002).

331. Phillips, C.; Roberts, L. R.; Schade, M.; Bazin, R.; Bent, A.; Davies, N. L.; Moore, R.; Pannifer, A. D.; Pickford, A. R.; Prior, S. H.; Read, C. M.; Scott, A.; Brown, D. G.; Xu, B.; Irving, S. L. Design and structure of stapled peptides binding to estrogen receptors. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 9696–9699 (2011).
332. Glu, K. K. Ü.; Inti, H. S.; Özgür, A.; Seçen, H.; Tutar, Y. Synthesis, molecular docking, and antitumoral activity of alnustone-like compounds against estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Turkish J. Chem.* 39, 179–193 (2015).
333. Wu, Y.; Wang, Y.; Zhang, A. Q.; Yu, H. X.; Wang, L. S. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of flavonoids and estrogen receptors based on docking. *Chinese Sci. Bull.* 2010 5515 55, 1488–1494 (2010).
334. Stauffer, S. R.; Huang, Y. R.; Aron, Z. D.; Coletta, C. J.; Sun, J.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A. Triarylpyrazoles with basic side chains: Development of pyrazole-based estrogen receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 151–161 (2001).
335. Fink, B. E.; Mortensen, D. S.; Stauffer, S. R.; Aron, Z. D.; Katzenellenbogen, J. A. Novel structural templates for estrogen-receptor ligands and prospects for combinatorial synthesis of estrogens. *Chem. Biol.* 6, 205–219 (1999).
336. Mladenović, M.; Patsilidakos, A.; Pirolli, A.; Sabatino, M.; Ragno, R. Understanding the molecular determinant of reversible human monoamine oxidase B inhibitors containing 2H-chromen-2-one core: Structure-based and ligand-based derived three-dimensional quantitative structure-activity relationships predictive models. *J. Chem. Inf. Model.* 57, 787–814 (2017).
337. Ballante, F.; Ragno, R. 3-D QSAutogrid/R: An alternative procedure to build 3-D QSAR models. methodologies and applications. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 1674–1685 (2012).
338. Morris, G. M.; Ruth, H.; 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.* 30, 2785–2791 (2009).
339. Ragno, R. www.3d-qsar.com: A web portal that brings 3-D QSAR to all electronic devices—the Py-CoMFA web application as tool to build models from pre-aligned datasets. *J. Comput. Mol. Des.* 2019 339 33, 855–864 (2019).
340. Ragno, R.; Esposito, V.; Di Mario, M.; Masiello, S.; Viscovo, M.; Cramer, R. D. Teaching and learning computational drug design: Student investigations of 3D quantitative structure-

- activity relationships through web applications. *J. Chem. Educ.* 97, 1922–1930 (2020).
341. Ballante, F.; Musmuca, I.; Marshall, G.R.; Ragno, R. Comprehensive model of wild-type and mutant HIV-1 reverse transcriptases. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 26, 907–919 (2012).
 342. Ortiz, A. R.; Pisabarro, M. T.; Gago, F.; Wade, R. C. Prediction of drug binding affinities by comparative binding energy analysis. *J. Med. Chem.* 38, 2681–2691 (1995).
 343. Sabatino, M.; Rotili, D.; Patsilnakos, A.; Forgione, M.; Tomaselli, D.; Alby, F.; Arimondo, P. B.; Mai, A.; Ragno, R. Disruptor of telomeric silencing 1-like (DOT1L): Disclosing a new class of non-nucleoside inhibitors by means of ligand-based and structure-based approaches. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 32, 435–458 (2018).
 344. 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.* 31, 455 (2010).
 345. Lang, P. T.; Brozell, S. R.; Mukherjee, S.; Pettersen, E. F.; Meng, E. C.; Thomas, V.; Rizzo, R. C.; Case, D. A.; James, T. L.; Kuntz, I.D. DOCK 6: combining techniques to model RNA-small molecule complexes. *RNA* 15, 1219–1230 (2009).
 346. Koes, D. R.; Baumgartner, M. P.; Camacho, C. J. Lessons learned in empirical scoring with smina from the CSAR 2011 benchmarking exercise. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1893–1904 (2013).
 347. Korb, O.; Stütze, T.; Exner, T. E. An ant colony optimization approach to flexible protein–ligand docking. *Swarm Intell.* 2007 12 1, 115–134 (2007).
 348. O’Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminform.* 3, 1–14 (2011).
 349. Tosco, P.; Balle, T.; Shiri, F. Open3DALIGN: An open-source software aimed at unsupervised ligand alignment. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 25, 777–783 (2011).
 350. Vainio, M. J.; Johnson, M. S. Generating conformer ensembles using a multiobjective genetic algorithm. *J. Chem. Inf. Model.* 47, 2462–2474 (2007).
 351. Vainio, M. J.; Puranen, J. S.; Johnson, M. S. ShaEP: Molecular overlay based on shape and electrostatic potential. *J. Chem. Inf. Model.* 49, 492–502 (2009).
 352. RDKit. <https://www.rdkit.org/>.
 353. Mladenović, M.; Mihailović, M.; Bogojević, D.; Vuković, N.; Sukdolak, S.; Matić, S.; Nićiforović, N.; Mihailović, V.; Mašković, P.; Vrvic, M. M.; Solujić, S. Biochemical and

- pharmacological evaluation of 4-hydroxychromen-2-ones bearing polar C-3 substituents as anticoagulants. *Eur. J. Med. Chem.* 54, 144–158 (2012).
354. RBVI Home Page. <http://rbvi.ucsf.edu/>.
355. Quiroga, R.; Villarreal, M. A. Vinardo: A scoring function based on autodock vina improves scoring, docking, and virtual screening. *PLoS One* 11, e0155183 (2016).
356. Chemaxon - Software Solutions and Services for Chemistry & Biology. <https://chemaxon.com/>.
357. Ballante, F.; Caroli, A.; Wickersham, R. B.; Ragno, R. Hsp90 inhibitors, part 1: definition of 3-D QSAutogrid/R models as a tool for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 956–969 (2014).
358. Caroli, A.; Ballante, F.; Wickersham, R. B.; Corelli, F.; Ragno, R. Hsp90 inhibitors, part 2: combining ligand-based and structure-based approaches for virtual screening application. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 970–977 (2014).
359. Li, X.; Wu, C.; Lin, X.; Cai, X.; Liu, L.; Luo, G.; You, Q.; Xiang, H. Synthesis and biological evaluation of 3-aryl-quinolin derivatives as anti-breast cancer agents targeting ER α and VEGFR-2. *Eur. J. Med. Chem.* 161, 445–455 (2019).
360. Zhou, H. B.; Sheng, S.; Compton, D. R.; Kim, Y.; Joachimiak, A.; Sharma, S.; Carlson, K. E.; Katzenellenbogen, B. S.; Nettles, K. W.; Greene, G. L.; Katzenellenbogen, J. A. Structure-guided optimization of estrogen receptor binding affinity and antagonist potency of pyrazolopyrimidines with basic side chains. *J. Med. Chem.* 50, 399–403 (2007).
361. Guo, W. Y.; Zeng, S. M.; Deora, G. S.; Li, Q. S.; Ruan, B. F. Estrogen receptor α (ER α)-targeting compounds and derivatives: Recent advances in structural modification and bioactivity. *Curr Top Med Chem.* 19, 1318-1337 (2019).
362. Callis, R.; Rabow, A.; Tonge, M.; Bradbury, R.; Challinor, M.; Roberts, K.; Jones, K.; Walker, G. A. Screening assay cascade to identify and characterize novel selective estrogen receptor downregulators (SERDs). *J. Biomol. Screen.* 20, 748–759 (2015).
363. Baumann, C. K.; Castiglione-Gertsch, M. Clinical use of selective estrogen receptor modulators and down regulators with the main focus on breast cancer. *Minerva Ginecol.* 61, 517-39 (2009).
364. Menna, M.; Fiorentino, F.; Marrocco, B.; Lucidi, A.; Tomassi, S.; Cilli, D.; Romanenghi, M.; Cassandri, M.; Pomella, S.; Pezzella, M.; Del Bufalo, D.; Zeya Ansari, M. S.;

- Tomašević, N.; Mladenović, M.; Viviano, M.; Sbardella, G.; Rota, R.; Trisciuglio, D.; Minucci, S.; Mattevi, A.; Rotili, D.; Mai, A. Novel non-covalent LSD1 inhibitors endowed with anticancer effects in leukemia and solid tumor cellular models. *Eur. J. Med. Chem.* 237, (2022).
365. Scherbakov, A. M.; Zavarzin, I. V.; Vorontsova, S. K.; Hajra, A.; Andreeva, O. E.; Yadykov, A. V.; Levina, I. S.; Volkova, Y. A.; Shirinian, V. Z. Synthesis and evaluation of the antiproliferative activity of benzylidenes of 16-dehydroprogesterone series. *Steroids* 138, 91–101 (2018).
366. Dalvai, M.; Bystricky, K. Cell cycle and anti-estrogen effects synergize to regulate cell proliferation and ER target gene expression. *PLoS One* 5, e11011 (2010).
367. Lin, W. C.; Chuang, Y. C.; Chang, Y. S.; Lai, M. D.; Teng, Y. N.; Su, I. J.; Wang, C. C. C.; Lee, K. H.; Hung, J. H. Endoplasmic reticulum stress stimulates p53 expression through NF- κ B activation. *PLoS One* 7, (2012).
368. Konduri, S. D.; Medisetty, R.; Liu, W.; Kaiparettu, B. A.; Srivastava, P.; Brauch, H.; Fritz, P.; Swetzig, W. M.; Gardner, A. E.; Khan, S. A.; Das, G. M. Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15081–15086 (2010).
369. Green, C. E.; Swezey, R.; Bakke, J.; Shinn, W.; Furimsky, A.; Bejugam, N.; Shankar, G. N.; Jong, L.; Kapetanović, I. M. Improved oral bioavailability in rats of SR13668, a novel anti-cancer agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67, 995–1006 (2011).
370. Mokale, S. N.; Begum, A.; Sakle, N. S.; Shelke, V. R.; Bhavale, S. A. Design, synthesis and anticancer screening of 3-(3-(substituted phenyl)acryloyl)-2H-chromen-2-ones as selective anti-breast cancer agent. *Biomed. Pharmacother.* 89, 966–972 (2017).
371. Stanković, N.; Mladenović, M.; Matic, S.; Stanić, S.; Stanković, V.; Mihailović, M.; Mihailović, V.; Katanić, J.; Boroja, T.; Vuković, N.; Sukdolak, S. Serum albumin binding analysis and toxicological screening of novel chroman-2,4-diones as oral anticoagulants. *Chem. Biol. Interact.* 227, 18–31 (2015).
372. Dirckx, J. H. Armand J. Quick: pioneer and prophet of coagulation research. *Ann. Intern. Med.* 92, 553–558 (1980).
373. Bergmeyer, H. U.; Bowers, G. N. Jr., Horder, M.; Moss, D. W. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of

- enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin Chim Acta*. 70, F19-F29 (1976).
374. IFCC methods for measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 9. IFCC method for alpha-amylase [1,4-alpha-D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1]. International Federation of Clinical Chemistry - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10217640/>.
375. Walters, M. I.; Gerarde, H. W. An ultramicromethod for the determination of conjugated and total bilirubin in serum or plasma. *Microchem. J.* 15, 231–243 (1970).
376. Jendrassik, L.; Grof, P. Vereinfachte photo-metrische methoden zur bestimmung des bilirubins. *Biochemische Zeitschrift*. 297, 81-89 (1938).
377. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77 (1959).
378. Góth, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta*. 196, 143–151 (1991).
379. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358 (1979).
380. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193, 265-275 (1951).
381. Chao, W. R.; Yean, D.; Amin, K.; Green, C.; Jong, L. Computer-aided rational drug design: a novel agent (SR13668) designed to mimic the unique anticancer mechanisms of dietary indole-3-carbinol to block Akt signaling. *J. Med. Chem.* 50, 3412–3415 (2007).
382. Buttar, D.; Colclough, N.; Gerhardt, S.; MacFaul, P.A.; Phillips, S.D.; Plowright, A.; Whittamore, P.; Tam, K.; Maskos, K.; Steinbacher, S.; Steuber, H. A. A combined spectroscopic and crystallographic approach to probing drug–human serum albumin interactions. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 7486–7496 (2010).
383. Soars, M. G.; Grime, K.; Sproston, J. L.; Webborn, P. J. H.; Riley, R. J. Use of hepatocytes to assess the contribution of hepatic uptake to clearance *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.* 35, 859–865 (2007).
384. Tropsha, A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol. Inform.* 29, 476–488 (2010).
385. Stefanachi, A.; Leonetti, F.; Pisani, L.; Catto, M.; Carotti, A. Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. *Molecules* 23, 250 (2018).
386. Belluti, F.; Uliassi, E.; Veronesi, G.; Bergamini, C.; Kaiser, M.; Brun, R.; Viola, A.; Fato,

- R.; Michels, P. A. M.; Krauth-Siegel, R. L.; Cavalli, A.; Bolognesi, M. L. Toward the development of dual-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/trypanothione reductase inhibitors against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *ChemMedChem* 9, 371–382 (2014).
387. Lee, D. S.; Chatterjee, T.; Ban, J.; Rhee, H.; Cho, E. J. Simple synthetic method for the functionalized benzo[c]cinnolines. *ChemistrySelect* 3, 2092–2095 (2018).
388. Stone, I. B.; Jermaks, J.; MacMillan, S. N.; Lambert, T. H. The hydrazine–O₂ redox couple as a platform for organocatalytic oxidation: Benzo[c]cinnoline-catalyzed oxidation of alkyl halides to aldehydes. *Angew. Chemie* 130, 12674–12678 (2018).
389. Yang, L.; Hu, Z.; Luo, J.; Tang, C.; Zhang, S.; Ning, W.; Dong, C.; Huang, J.; Liu, X.; Zhou, H.B. Dual functional small molecule fluorescent probes for image-guided estrogen receptor-specific targeting coupled potent antiproliferative potency for breast cancer therapy. *Bioorg. Med. Chem.* 25, 3531–3539 (2017).
390. Tajbakhsh, M.; Hosseinzadeh, R.; Alinezhad, H.; Ghahari, S.; Heydari, A.; Khaksar, S. Catalyst-free one-pot reductive alkylation of primary and secondary amines and *N,N*-dimethylation of amino acids using sodium borohydride in 2,2,2-trifluoroethanol. *Synthesis (Stuttg.)* 490–496 (2011) doi:10.1055/S-0030-1258384.
391. Banoth, L.; Narayan, T. K.; Pujala, B.; Chakraborti, A. K.; Banerjee, U. C. New chemo-enzymatic synthesis of (*R*)-1-chloro-3-(piperidin-1-yl)propan-2-ol. *Tetrahedron: Asymmetry* 23, 1564–1570 (2012).
392. Chaudhuri, M. K.; Dehury, S. K.; Hussain, S.; Duarah, A.; Gogoi, N.; Lakshmi Kantam, M. 3,5-dimethylpyrazolium fluorochromate(VI)-catalysed oxidation of organic substrates by hydrogen peroxide under solvent-free conditions. *Adv. Synth. Catal.* 347, 1349–1352 (2005).
393. Bora, U.; Chaudhuri, M. K.; Dey, D.; Kalita, D.; Kharmawphlang, W.; Mandal, G.C. 3,5-Dimethylpyrazolium fluorochromate(VI), C₅H₈N₂H[CrO₃F], (DmpzHFC): A convenient new reagent for oxidation of organic substrates. *Tetrahedron* 57, 2445–2448 (2001).
394. Liu, Y.; Yao, B.; Deng, C. L.; Tang, R. Y.; Zhang, X. G.; Li, J. H. Palladium-catalyzed oxidative coupling of trialkylamines with aryl iodides leading to alkyl aryl ketones. *Org. Lett.* 13, 2184–2187 (2011).
395. Ela, M. A.; Issa, D. A.; Mansour, F. H. Convenient synthesis and structural characterization

- of a series of methyl 4-[2-(cyclized amino)ethoxy]benzoate esters as key intermediates in synthesis of selective estrogen receptor modulators. *Med. Chem.* 8, 197-201 (2018)
396. Affini, A.; Hagenow, S.; Živković, A.; Marco-Contelles, J.; Stark, H. Novel indanone derivatives as MAO B/H3R dual-targeting ligands for treatment of Parkinson's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 148, 487–497 (2018).
397. Fang, Z.; Zhou, G.C.; Zheng, S.L.; He, G.L.; Li, J.L.; He, L.; Bei, D. Lithium chloride-catalyzed selective demethylation of aryl methyl ethers under microwave irradiation. *J. Mol. Catal. A Chem.* 274, 16–23 (2007).
398. Hussain, M. K.; Ansari, M. I.; Yadav, N.; Gupta, P. K.; Gupta, A. K.; Saxena, R.; Fatima, I.; Manohar, M.; Kushwaha, P.; Khedgikar, V.; Gautam, J.; Kant, R.; Maulik, P. R.; Trivedi, R.; Dwivedi, A.; Kumar, K. R.; Saxena, A. K.; Hajela, K. Design and synthesis of ER α /ER β selective coumarin and chromene derivatives as potential anti-breast cancer and anti-osteoporotic agents. *RSC Adv.* 4, 8828–8845 (2014).
399. Zhang, M.; Zhang, H. J.; Han, T.; Ruan, W.; Wen, T. Bin. Rh(III)-catalyzed oxidative coupling of benzoic acids with geminal-substituted vinyl acetates: Synthesis of 3-substituted isocoumarins. *J. Org. Chem.* 80, 620–627 (2015).
400. Martin, N.; Runnan, S.; Seung-Yong, C.; Patrick, H. T.; Paul, F. H.; Alfin, D. N. Vaz.; Minor, J. C. Cytochrome P450-catalyzed hydroxylation of mechanistic probes that distinguish between radicals and cations. Evidence for cationic but not for radical intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2677–2686 (2000).
401. Gharpure, S. J.; Sathiyarayanan, A. M.; Jonnalagadda, P. o-Quinone methide based approach to isoflavans: Application to the total syntheses of equol, 3'-hydroxyequol and vestitol. *Tetrahedron Lett.* 49, 2974–2978 (2008).
402. Kozikowski, A. P.; Shum, P. W.; Basu, A.; Lazo, J. S. Synthesis of structural analogues of lyngbyatoxin A and their evaluation as activators of protein kinase C. *J. Med. Chem.* 34, 2420–2430 (1991).
403. Maki, B. E.; Scheldt, K. A. *N*-heterocyclic carbene-catalyzed oxidation of unactivated aldehydes to esters. *Org. Lett.* 10, 4331–4334 (2008).
404. Blakemore, P. R. The modified Julia olefination: alkene synthesis *via* the condensation of metallated heteroarylalkylsulfones with carbonyl compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 2, 2563–2585 (2002).

405. Förster, S.; Persch, E.; Tverskoy, O.; Rominger, F.; Helmchen, G.; Klein, C.; Gönen, B.; Brügger, B. Syntheses and biological properties of Brefeldin analogues. *European J. Org. Chem.* 2011, 878–891 (2011).
406. Haynes, R. K.; Lam, W. W. L.; Yeung, L. L.; Williams, I. D.; Ridley, A. C.; Starling, S. M.; Vonwiller, S. C.; Hambley, T. W.; Lelandais, P. Highly diastereoselective conjugate addition of lithiated γ -crotonolactone (but-2-en-4-olide) to cyclic enones to give *syn*-adducts: Application to a Brefeldin synthesis. *J. Org. Chem.* 62, 4552–4553 (1997).
407. Trost, B. M.; Crawley, M. L. A “chiral aldehyde” equivalent as a building block towards biologically active targets. *Chem. – A Eur. J.* 10, 2237–2252 (2004).
408. Inanaga, J.; Hirata, K.; Saeki, H.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M. A rapid esterification by means of mixed anhydride and its application to large-ring lactonization. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 52, 1989–1993 (1979).
409. Williams, D. R.; Jass, P. A.; Allan Tse, H. L.; Gaston, R. D. Total synthesis of (+)-breynolide. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4552–4554 (1990).
410. He, B.; Wang, Y.; Zheng, Y.; Chen, W.; Zhu, Q. *Chem. Biol. Drug Des.* 82, 307–316 (2013).

A large, stylized pink ribbon symbol is positioned in the center-right of the page. The background features a light-colored pattern of wavy lines in shades of blue, green, and yellow, and a faint illustration of a tree with pink blossoms on the right side.

Додатни материјали

Додатни материјал I
за ДОКТОРСКУ ДИСЕРТАЦИЈУ:
*Антагонисти естроген рецептора α : Рационални
дизајн нових супресаната рака дојке базиран на 3-D
QSAR, COMBINEr и 3-D фармакофорним
студијама*

Садржај

Табела ДМ1. PDB кодови и структуре лигананда естроген рецептора α доступних у Protein Data Bank октобра 2015. године.

Табела ДМ2. Листа проба које се користе за израчунавање MIF.

Табела ДМ3. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за А пробу.

Табела ДМ4. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за С пробу.

Табела ДМ5. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за HD пробу.

Табела ДМ6. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за ОА пробу.

Табела ДМ7. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за N пробу.

Табела ДМ8. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за NA пробу.

Табела ДМ9. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за е пробу.

Табела ДМ10. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за А пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,1 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ11. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за С пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,1 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ12. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за HD пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,2 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ13. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за ОА пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,25 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ14. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за N пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,25 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ15. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за NA пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,25 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ16. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за е пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,45 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ17. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из А пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,7 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ18. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из С пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,7 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ19. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из HD пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,6 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ20. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из OA пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,9 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ21. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из N пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,9 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ22. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из NA пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,9 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ23. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из e пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,7 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

Табела ДМ24. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене rIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из А пробе на PC4 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

Табела ДМ25. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене rIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из А пробе на PC4 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ26. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене rIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из С пробе на PC4 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

Табела ДМ27. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене rIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из С пробе на PC4 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ28. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене rIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из HD пробе на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

Табела ДМ42. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као rRVA помоћу модела генерисаног из N пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ43. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као rRVA помоћу модела генерисаног из N пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ44. Структуре дизајнираних антагониста ER α : X=O or N; Y=OH или NH₂, Z=(=O) или -O-CH₃.

Слика ДМ1. Експерименталне наспрам наспрам прерачунатих (плави квадрати) и предвиђених (црвени кругови) pIC₅₀ вредности добијене након унакрсне валидације LOO приступом за модел генерисан из OA пробе на PC4 (A); LOO приступом за модел генерисан из NA пробе PCs 5 (B); LSO приступом за модел генерисан из OA пробе на PC4 (B); LSO приступом за модел генерисан из NA пробе на PC5 (Г).

Слика ДМ2. Експерименталне наспрам наспрам прерачунатих (плави квадрати) и предвиђених (црвени кругови) pIC₅₀ вредности добијене након унакрсне валидације LOO приступом за модел генерисан из A пробе на PC5 (A); LOO приступом за модел генерисан из C пробе PC4 (B); LSO приступом за модел генерисан из A пробе на PC5 (B); LSO приступом за модел генерисан из C пробе на PC4 (Г).

Слика ДМ3. Мапе *PLS-коэффицијената* (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из N пробе за **1XP6** (A); **1SJ0** (B); **2R6Y** (B); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ4. Мапе *PLS-коэффицијената* (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из N пробе за **1XPC** (A); **2R6W** (B); **2QA8** (B); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ5. Мапе *PLS-коэффицијената* (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из N пробе за **2QA6** (A); **1XQC** (B); **2B1Z** (B); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ6. Мапе *PLS-коэффицијената* (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из A пробе за **1ERR** (A); **3ERD** (B); **1XP1** (B); **1ERE** (Г); **2IOK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ7. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из А пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ8. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из А пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ9. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из А пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ10. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из А пробе за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ11. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из С пробе за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **2IOK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ12. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из С пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ13. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из С пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ14. Мапе *PLS-коефицијената* ($\mathbf{P}_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (\mathbf{L}_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из С пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ15. Мапе *PLS-коефицијената* ($\mathbf{P}_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (\mathbf{L}_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из С пробе за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ16. Мапе *PLS-коефицијената* ($\mathbf{P}_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (\mathbf{L}_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из HD пробе за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **2IOK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ17. Мапе *PLS-коефицијената* ($\mathbf{P}_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (\mathbf{L}_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из HD пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ18. Мапе *PLS-коефицијената* ($\mathbf{P}_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (\mathbf{L}_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из HD пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ19. Мапе *PLS-коефицијената* ($\mathbf{P}_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (\mathbf{L}_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из HD пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ20. Мапе *PLS-коефицијената* ($\mathbf{P}_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (\mathbf{L}_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из HD пробе за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ21. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из ОА пробе за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В), **1ERE** (Г); **2IOK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ22. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из ОА пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ23. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из ОА пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ24. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из ОА пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ25. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из ОА пробе за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ26. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из NA пробе за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **2IOK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ27. Мапе *PLS-коэффицијената* ($P_{PLS-коэффицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из NA пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ28. Мапе *PLS-коефицијената* ($P_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из NA пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ29. Мапе *PLS-коефицијената* ($P_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из NA пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ30. Мапе *PLS-коефицијената* ($P_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из NA пробе за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ31. Мапе *PLS-коефицијената* ($P_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из е пробе за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **2IOK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ32. Мапе *PLS-коефицијената* ($P_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из е пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ33. Мапе *PLS-коефицијената* ($P_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из е пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ34. Мапе *PLS-коефицијената* ($P_{PLS-коефицијенти}$, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из е пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ35. Мапе *PLS-коэффицијената* (*P_{PLS}-коэффицијенти*, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (*L_{ACC}*, позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из е пробе за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ36. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганда ER α помоћу програма Vina: **1L2I** (А); ЕС тамно плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **5AK2** (Б); ЕС тамно плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2IOG** (В); ЕС тамно зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1X7R** (Г); ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1UOM** (Д); ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; и **1GWQ** (Ђ) ЕС сива, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ37. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганда ER α помоћу програма Vina: **1XP6** (А); ЕС браон, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1SJ0** (Б); ЕС тамно плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2R6Y** (В); ЕС светло плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1XP9** (Г); ЕС плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1YIM** (Д); ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; и **1YIN** (Ђ) ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ38. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганда ER α помоћу програма Vina: **1XPC** (А); ЕС сива, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2R6W** (Б); ЕС тамно црвена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2QA8** (В); ЕС наранџаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; и **1R5K** (Г) ЕС тамно зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ39. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганда ER α помоћу програма Vina: **2QA6** (А); ЕС светло плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1XQC** (Б); ЕС светло зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2B1Z** (В); ЕС светло розе, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; и **1X7E** (Г) ЕС жута, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ40. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганада $ER\alpha$ помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру $ER\alpha$, помоћу програмског пара Obconformer/Open3DALIGN: **1L2I** (А); ЕС тамно плава, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **5AK2** (Б); ЕС тамно плава, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **2IOG** (В); ЕС тамно зелена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1X7R** (Г); ЕС љубичаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1UOM** (Д); ЕС љубичаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; и **1GWQ** (Ђ) ЕС сива, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

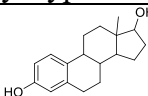
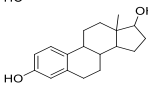
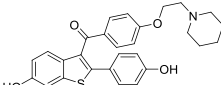
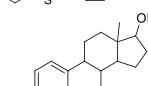
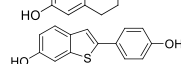
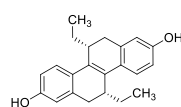
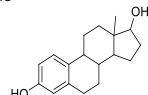
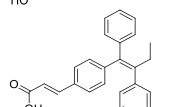
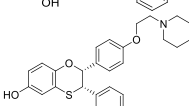
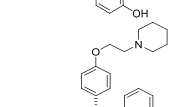
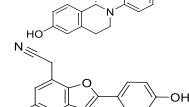
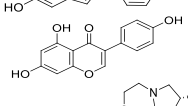
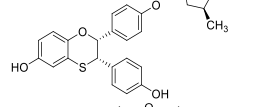
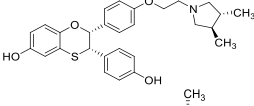
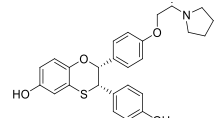
Слика ДМ41. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганада $ER\alpha$ помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру $ER\alpha$, помоћу програмског пара Obconformer/Open3DALIGN: **1XP6** (А); ЕС браон, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCD зелена, RCCA црвена; **1SJ0** (Б); ЕС тамно плава, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **2R6Y** (В); ЕС светло плава, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1XP9** (Г); ЕС плава, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1YIM** (Д); ЕС љубичаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; и **1YIN** (Ђ) ЕС љубичаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

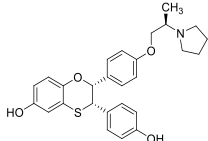
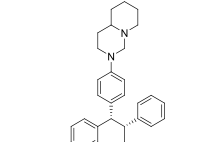
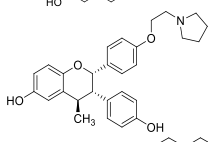
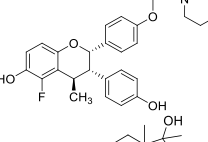
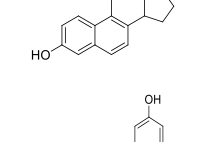
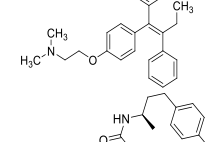
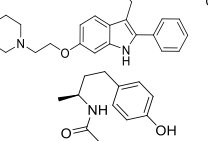
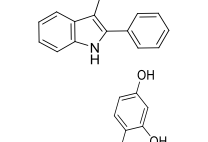
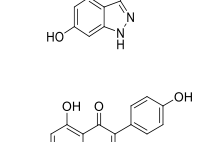
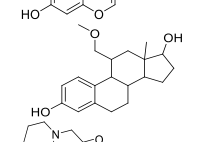
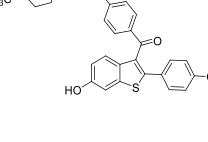

Слика ДМ42. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганада $ER\alpha$ помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру $ER\alpha$, помоћу програмског пара Obconformer/Open3DALIGN: **1XPC** (А); ЕС сива, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **2R6W** (Б); ЕС тамно црвена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **2QA8** (В); ЕС наранџаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; и **1R5K** (Г) ЕС тамно зелена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

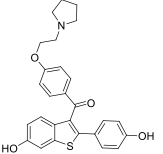
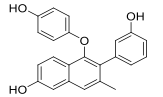
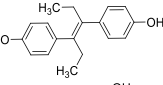
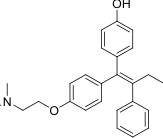
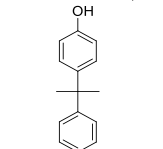
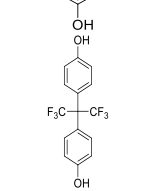
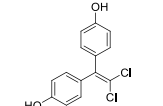
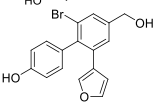
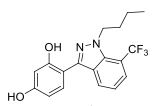
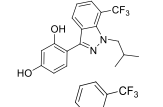
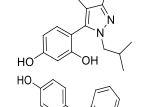
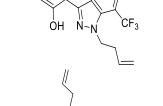
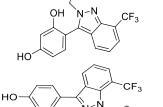
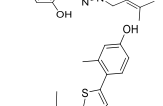
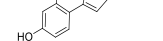
Слика ДМ43. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганада $ER\alpha$ помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру $ER\alpha$, помоћу програмског пара Obconformer/Open3DALIGN: **2QA6** (А); ЕС светло плава, ECRA b светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1XQC** (Б); ЕС светло зелена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **2B1Z** (В); ЕС светло розе, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; и **1X7E** (Г) ЕС жута, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

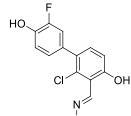
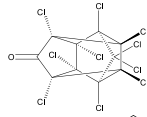
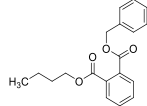
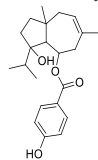
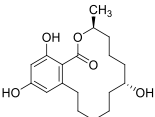
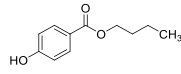
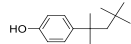
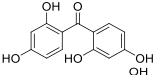
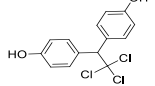
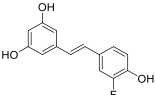
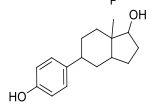
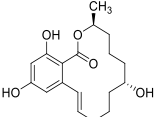
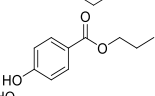
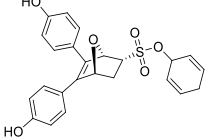
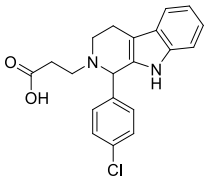
Слика ДМ44. Преклапање између дизајнираних једињења **3DQ-1e** (А); SBC љубичаста, LBC тамно зелена; **3DQ-1c** (Б); SBC црвена, LBC љубичаста; **3DQ-2c** (В); SBC зелена, LBC браон; **3DQ-3a** (Г); SBC браон, LBC плава; **3DQ-1d** (Д); SBC зелена, LBC тамно црвена; **3DQ-2d** (Ђ). SBC наранџаста, LBC жута; и **1ERE**, ЕС плава, унутар ER α активног центра. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом

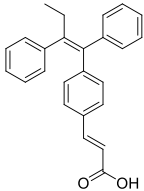
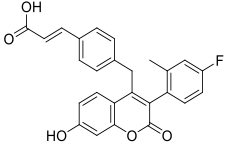
Табела ДМ1. PDB кодови и структуре лиганда естроген рецептора α доступних у Protein Data Bank октобра 2015. године.

PDB	Структура лиганда	pIC_{50}	pK_i	Мутација	Реф.
1A52		9,24	9,79	Не постоји	318
1ERE		9,24	9,79	Не постоји	73
1ERR		9,52	10,50	Не постоји	73
1G50		8,72	6,27	Не постоји	319
1GWQ		5,85	НД ^a	Не постоји	75
1L2I		8,50	8,50	Не постоји	85
1QKU		8,72	6,27	Не постоји	320
1R5K		7,40	НД	Не постоји	74
1SJ0		9,09	НД	Не постоји	76
1UOM		7,70	НД	Не постоји	86
1X7E		5,90	НД	Не постоји	77
1X7R		8,01	НД	Не постоји	78
1XP1		9,30	НД	Не постоји	79
1XP6		9,30	НД	Не постоји	79
1XP9		8,80	НД	Не постоји	79

1XPC		8,70	НД	Не постоји	79
1XQC		7,20	НД	Не постоји	80
1YIM		8,80	НД	Не постоји	81
1YIN		8,80	НД	Не постоји	81
2B1Z		7,10	НД	C381S C417S	87
2BJ4		8,60	10,40	Не постоји	87
2IOG		8,09	НД	Не постоји	83
2IOK		9,00	НД	Не постоји	83
2QA6		7,30	НД	Y537S	88
2QA8		8,01	6,40	Y537Ser	88
2QGT					88
2R6W		8,60	9,40	C381S C417S	89

2R6Y		8,9	9,50	C381S C417S	89
3DT3		НД	НД	Не постоји	84
3ERD		9,48	НД	Не постоји	84
3ERT		НД	9,60	Не постоји	84
3UU7		НД	8,79	Y537S	90
3UUA		НД	8,79	Y537S	90
3UUC		НД	5,70	Не постоји	90
4DMA		НД	5,60	Не постоји	90
4IU1		НД	НД	Не постоји	322
4IV2		НД	НД	Не постоји	322
4IV4		НД	НД	Не постоји	322
4IVY		НД	НД	Не постоји	322
4IW6		НД	НД	Не постоји	322
4IW8		НД	НД	Не постоји	322
4IWC		НД	НД	Не постоји	322

4IWF		НД	НД	Не постоји	322
4MG5		НД	НД	Y537S	322
4MG6		НД	6,00	Y537S	92
4MG7		НД	НД	Y537S	92
4MG8		НД	10,00	Y537S	92
4MG9		НД	6,00	Y537S	92
4MGA		НД	6,00	Y537S	92
4MGC		НД	7,00	Y537S	92
4MGD		НД	6,00	Y537S	92
4PPP		НД	НД	Не постоји	323
4PPS		НД	НД	Не постоји	323
4TUZ		НД	10,00	Y537S	324
4TV1		НД	НД	Y537S	93
4ZN9		НД	9,60	Y537S	94
5AAU		4.86	НД	Не постоји	321

5AAV		9,17	НД	Не постоји	321
5AK2		8,40	10,00	C381S C417S	75

^aНије доступно.

Табела ДМ2. Листа проба које се користе за израчунавање MIF.

Пробни атом	Опис	Физичко-хемијске карактеристике
A	ароматични C	стерне интеракције
C	алифатични (sp^3) C	стерне интеракције
OA	кисеоник акцептор водоничне везе	стерне и електростатичке интеракције
HD	водоник везан за донора водоничне везе	стерне и електростатичке интеракције
NA	азот акцептор водоничне везе	стерне и електростатичке интеракције
N	амидни азот	стерне и електростатичке интеракције
e	наелектрисање	електростатичке интеракције
d	десолватација	стерне и електростатичке интеракције

Табела ДМЗ. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за А пробу.

Проба	Растојање између тачака просторне решетке	PC ^a	r^{2b}	q^{2b}	SDEP ^г
A	0,5	1	0,217	-0,022	1,029
A	0,55	1	0,217	-0,022	1,029
A	0,6	1	0,218	-0,020	1,028
A	0,65	1	0,218	-0,021	1,029
A	0,7	1	0,222	-0,016	1,026
A	0,75	1	0,222	-0,019	1,028
A	0,8	1	0,215	-0,025	1,031
A	0,85	1	0,219	-0,018	1,028
A	0,9	1	0,215	-0,025	1,031
A	0,95	1	0,219	-0,019	1,028
A	1	1	0,217	-0,019	1,028
A	1,05	1	0,219	-0,020	1,029
A	1,1	1	0,213	-0,024	1,031
A	1,15	1	0,224	-0,014	1,026
A	1,2	1	0,218	-0,023	1,030
A	1,25	1	0,222	-0,014	1,025
A	1,3	1	0,212	-0,029	1,033
A	1,35	1	0,213	-0,024	1,030
A	1,4	1	0,208	-0,038	1,038
A	1,45	1	0,214	-0,026	1,032
A	1,5	1	0,212	-0,031	1,034
A	1,55	1	0,216	-0,024	1,030
A	1,6	1	0,223	-0,013	1,025
A	1,65	1	0,214	-0,025	1,031
A	1,7	1	0,225	-0,012	1,025
A	1,75	1	0,216	-0,025	1,031
A	1,8	3	0,767	-0,077	1,057
A	1,85	1	0,198	-0,047	1,042
A	1,9	1	0,213	-0,028	1,033
A	1,95	1	0,218	-0,028	1,033
A	2	1	0,206	-0,038	1,037

^aОптималан број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^BКоефицијент унакрсне валидације. ^гСтандардна девијација грешке предвиђања.

Табела ДМ4. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за С пробу.

Проба	Растојање између тачака просторне решетке	PC ^a	r^{2b}	q^{2b}	SDEP ^г
С	0,5	1	0,217	-0,021	1,029
С	0,55	1	0,217	-0,022	1,029
С	0,6	1	0,219	-0,020	1,028
С	0,65	1	0,218	-0,021	1,029
С	0,7	1	0,222	-0,015	1,026
С	0,75	1	0,222	-0,018	1,028
С	0,8	1	0,215	-0,025	1,031
С	0,85	1	0,222	-0,018	1,028
С	0,9	1	0,215	-0,025	1,031
С	0,95	1	0,220	-0,019	1,028
С	1	1	0,218	-0,019	1,028
С	1,05	1	0,220	-0,020	1,029
С	1,1	1	0,214	-0,024	1,031
С	1,15	1	0,225	-0,014	1,025
С	1,2	1	0,219	-0,023	1,030
С	1,25	1	0,223	-0,013	1,025
С	1,3	1	0,213	-0,029	1,033
С	1,35	1	0,213	-0,024	1,030
С	1,4	1	0,208	-0,038	1,038
С	1,45	1	0,214	-0,026	1,032
С	1,5	1	0,212	-0,030	1,034
С	1,55	1	0,217	-0,023	1,030
С	1,6	1	0,223	-0,013	1,025
С	1,65	1	0,215	-0,024	1,031
С	1,7	1	0,225	-0,012	1,024
С	1,75	1	0,216	-0,025	1,031
С	1,8	3	0,768	-0,075	1,056
С	1,85	1	0,198	-0,047	1,042
С	1,9	1	0,213	-0,028	1,032
С	1,95	1	0,219	-0,028	1,032
С	2	1	0,207	-0,037	1,037

^aОптималан број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^вКоефицијент унакрсне валидације. ^гСтандардна девијација грешке предвиђања.

Табела ДМ5. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за HD пробу.

Проба	Растојање између тачака просторне решетке	PC ^a	r^{2b}	q^{2b}	SDEP ^г
HD	0,5	1	0,249	-0,015	1,026
HD	0,55	1	0,251	-0,013	1,025
HD	0,6	1	0,249	-0,015	1,026
HD	0,65	1	0,252	-0,011	1,024
HD	0,7	1	0,248	-0,016	1,026
HD	0,75	1	0,247	-0,020	1,029
HD	0,8	1	0,241	-0,025	1,031
HD	0,85	1	0,250	-0,013	1,025
HD	0,9	1	0,245	-0,024	1,030
HD	0,95	1	0,257	-0,004	1,020
HD	1	1	0,238	-0,026	1,032
HD	1,05	1	0,249	-0,013	1,025
HD	1,1	1	0,245	-0,017	1,027
HD	1,15	1	0,256	-0,015	1,026
HD	1,2	1	0,254	-0,009	1,023
HD	1,25	1	0,235	-0,025	1,031
HD	1,3	1	0,255	0,000	1,018
HD	1,35	1	0,239	-0,020	1,029
HD	1,4	1	0,805	0,036	1,000
HD	1,45	1	0,244	-0,016	1,026
HD	1,5	1	0,253	-0,014	1,026
HD	1,55	1	0,248	-0,020	1,029
HD	1,6	1	0,279	0,037	1,000
HD	1,65	1	0,253	-0,007	1,022
HD	1,7	1	0,237	-0,038	1,038
HD	1,75	1	0,259	-0,025	1,031
HD	1,8	3	0,237	-0,018	1,028
HD	1,85	1	0,241	-0,013	1,025
HD	1,9	1	0,219	-0,069	1,053
HD	1,95	1	0,246	0,009	1,014
HD	2	1	0,242	0,002	1,017

^aОптималан број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^вКоефицијент унакрсне валидације. ^гСтандардна девијација грешке предвиђања.

Табела ДМ6. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за ОА пробу.

Проба	Растојање између тачака просторне решетке	PC ^a	r^{2b}	q^{2b}	SDEP ^г
ОА	0,5	1	0,230	-0,013	1,025
ОА	0,55	1	0,231	-0,013	1,025
ОА	0,6	1	0,229	-0,015	1,026
ОА	0,65	1	0,231	-0,013	1,025
ОА	0,7	1	0,225	-0,020	1,028
ОА	0,75	1	0,227	-0,019	1,028
ОА	0,8	1	0,230	-0,014	1,025
ОА	0,85	1	0,227	-0,018	1,028
ОА	0,9	1	0,224	-0,019	1,028
ОА	0,95	1	0,229	-0,016	1,026
ОА	1	1	0,230	-0,014	1,026
ОА	1,05	1	0,227	-0,019	1,028
ОА	1,1	1	0,225	-0,020	1,029
ОА	1,15	1	0,224	-0,018	1,027
ОА	1,2	1	0,229	-0,014	1,025
ОА	1,25	1	0,232	-0,020	1,029
ОА	1,3	1	0,229	-0,018	1,027
ОА	1,35	1	0,225	-0,025	1,031
ОА	1,4	1	0,229	-0,017	1,027
ОА	1,45	1	0,218	-0,032	1,035
ОА	1,5	1	0,756	-0,097	1,067
ОА	1,55	1	0,218	-0,025	1,031
ОА	1,6	1	0,215	-0,036	1,037
ОА	1,65	1	0,751	-0,125	1,080
ОА	1,7	1	0,236	0,004	1,017
ОА	1,75	1	0,222	-0,017	1,027
ОА	1,8	3	0,239	-0,013	1,025
ОА	1,85	1	0,217	-0,032	1,034
ОА	1,9	1	0,245	0,012	1,012
ОА	1,95	1	0,229	-0,028	1,032
ОА	2	1	0,220	-0,034	1,036

^aОптималан број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^вКоефицијент унакрсне валидације. ^гСтандардна девијација грешке предвиђања.

Табела ДМ7. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за N пробу.

Проба	Растојање између тачака просторне решетке	PC ^a	r^{2b}	q^{2b}	SDEP ^г
N	0,5	1	0,226	-0,016	1,026
N	0,55	1	0,225	-0,017	1,027
N	0,6	1	0,226	-0,016	1,027
N	0,65	1	0,226	-0,016	1,026
N	0,7	1	0,224	-0,019	1,028
N	0,75	1	0,221	-0,021	1,029
N	0,8	1	0,221	-0,022	1,030
N	0,85	1	0,225	-0,017	1,027
N	0,9	1	0,220	-0,021	1,029
N	0,95	1	0,227	-0,014	1,025
N	1	1	0,225	-0,016	1,026
N	1,05	1	0,223	-0,021	1,029
N	1,1	1	0,217	-0,025	1,031
N	1,15	1	0,223	-0,018	1,028
N	1,2	1	0,222	-0,020	1,028
N	1,25	1	0,229	-0,017	1,027
N	1,3	1	0,219	-0,026	1,031
N	1,35	1	0,214	-0,033	1,035
N	1,4	1	0,221	-0,027	1,032
N	1,45	1	0,211	-0,037	1,037
N	1,5	1	0,211	-0,038	1,038
N	1,55	1	0,217	-0,027	1,032
N	1,6	1	0,217	-0,030	1,034
N	1,65	1	0,729	-0,143	1,089
N	1,7	1	0,236	0,005	1,016
N	1,75	1	0,223	-0,017	1,027
N	1,8	3	0,242	-0,003	1,020
N	1,85	1	0,206	-0,043	1,040
N	1,9	1	0,741	0,103	0,964
N	1,95	1	0,228	-0,026	1,031
N	2	1	0,213	-0,037	1,037

^aОптималан број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^вКоефицијент унакрсне валидације. ^гСтандардна девијација грешке предвиђања.

Табела ДМ8. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за NA пробу.

Проба	Растојање између тачака просторне решетке	PC ^a	r^{2b}	q^{2b}	SDEP ^г
NA	0,5	1	0,226	-0,015	1,026
NA	0,55	1	0,225	-0,016	1,027
NA	0,6	1	0,226	-0,015	1,026
NA	0,65	1	0,226	-0,015	1,026
NA	0,7	1	0,224	-0,018	1,028
NA	0,75	1	0,222	-0,020	1,029
NA	0,8	1	0,222	-0,022	1,029
NA	0,85	1	0,226	-0,016	1,027
NA	0,9	1	0,220	-0,022	1,029
NA	0,95	1	0,228	-0,013	1,025
NA	1	1	0,225	-0,016	1,026
NA	1,05	1	0,225	-0,019	1,028
NA	1,1	1	0,218	-0,024	1,031
NA	1,15	1	0,223	-0,018	1,027
NA	1,2	1	0,222	-0,020	1,028
NA	1,25	1	0,230	-0,016	1,027
NA	1,3	1	0,220	-0,025	1,031
NA	1,35	1	0,215	-0,032	1,035
NA	1,4	1	0,221	-0,027	1,032
NA	1,45	1	0,212	-0,036	1,037
NA	1,5	1	0,213	-0,037	1,037
NA	1,55	1	0,218	-0,025	1,031
NA	1,6	1	0,219	-0,028	1,032
NA	1,65	1	0,218	-0,031	1,034
NA	1,7	1	0,235	0,005	1,016
NA	1,75	1	0,223	-0,016	1,027
NA	1,8	3	0,771	0,005	1,016
NA	1,85	1	0,207	-0,043	1,040
NA	1,9	1	0,729	0,083	0,975
NA	1,95	1	0,227	-0,027	1,032
NA	2	1	0,212	-0,037	1,037

^aОптималан број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^вКоефицијент унакрсне валидације. ^гСтандардна девијација грешке предвиђања.

Табела ДМ9. Анализа оптималног растојања тачака унутар просторне решетке за е пробу.

Проба	Растојање између тачака просторне решетке	PC ^a	r^{2b}	q^{2b}	SDEP ^г
е	0,5	1	0,336	-0,028	1,033
е	0,55	1	0,340	-0,027	1,032
е	0,6	1	0,345	-0,028	1,033
е	0,65	1	0,344	-0,032	1,035
е	0,7	1	0,341	-0,029	1,033
е	0,75	1	0,338	-0,028	1,032
е	0,8	1	0,337	-0,040	1,039
е	0,85	1	0,340	-0,016	1,027
е	0,9	1	0,322	-0,038	1,037
е	0,95	1	0,357	-0,032	1,034
е	1	1	0,323	-0,031	1,034
е	1,05	1	0,328	-0,041	1,039
е	1,1	1	0,323	-0,008	1,023
е	1,15	1	0,363	-0,014	1,025
е	1,2	1	0,307	-0,041	1,039
е	1,25	1	0,337	0,018	1,009
е	1,3	1	0,317	-0,046	1,042
е	1,35	1	0,339	-0,037	1,037
е	1,4	1	0,365	-0,039	1,038
е	1,45	1	0,333	-0,060	1,048
е	1,5	1	0,287	-0,053	1,045
е	1,55	1	0,322	-0,062	1,049
е	1,6	1	0,348	-0,137	1,086
е	1,65	1	0,404	-0,033	1,035
е	1,7	1	0,295	0,021	1,008
е	1,75	1	0,247	-0,081	1,059
е	1,8	3	0,408	-0,018	1,027
е	1,85	1	0,310	-0,023	1,030
е	1,9	1	0,319	-0,018	1,028
е	1,95	1	0,214	-0,025	1,031
е	2	1	0,275	0,004	1,016

^aОптималан број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^вКоефицијент унакрсне валидације. ^гСтандардна девијација грешке предвиђања.

Табела ДМ10. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за А пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,1 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,01	0,05	0,897	1,025	0,225	-0,012
2	5	0,001	0,05	0,689	1,099	0,543	-0,165
3	5	0,002	0,01	0,585	1,14	0,669	-0,252
4	2	0,002	0,01	0,451	1,298	0,804	-0,625
5	2	0,002	0,01	0,318	1,335	0,902	-0,719
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,01	0,05	0,882	1,022	0,221	-0,018
2	5	0,001	0,05	0,631	1,082	0,537	-0,172
3	5	0,002	0,01	0,561	1,127	0,662	-0,261
4	2	0,002	0,01	0,437	1,232	0,884	-0,637
5	2	0,002	0,01	0,326	1,342	0,917	-0,782

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^бМаксимална и минимална вредност енергије. ^вНулирање ниских вредности енергија. ^гМинимална стандардна девијација. ^дСтандардна девијација прорачуна. ^бСтандардна девијација грешке предвиђања. ^еКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ11. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за С пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,1 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,05	0,897	1,025	0,225	-0,012
2	5	0,008	0,05	0,689	1,099	0,543	-0,165
3	5	0,008	0,01	0,585	1,14	0,669	-0,252
4	2	0,009	0,01	0,451	1,298	0,804	-0,625
5	2	0,01	0,01	0,318	1,335	0,902	-0,719
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,05	0,892	1,032	0,217	-0,017
2	5	0,008	0,05	0,652	1,013	0,531	-0,172
3	5	0,008	0,01	0,531	1,028	0,742	-0,286
4	2	0,009	0,01	0,421	1,372	0,792	-0,622
5	2	0,01	0,01	0,392	1,435	0,982	-0,782

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^бМаксимална и минимална вредност енергије. ^вНулирање ниских вредности енергија. ^гМинимална стандардна девијација. ^дСтандардна девијација прорачуна. ^бСтандардна девијација грешке предвиђања. ^еКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ12. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за HD пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,2 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,035	0,865	1,000	0,279	0,037
2	5	0,01	0,035	0,620	1,054	0,629	-0,071
3	5	0,01	0,05	0,466	1,055	0,790	-0,074
4	5	0,01	0,035	0,337	1,084	0,890	-0,132
5	5	0,01	0,04	0,238	1,087	0,945	-0,140
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,035	0,822	1,083	0,221	0,028
2	5	0,01	0,035	0,681	1,312	0,611	-0,096
3	5	0,01	0,05	0,466	1,055	0,790	-0,074
4	5	0,01	0,035	0,225	1,137	0,899	-0,142
5	5	0,01	0,04	0,246	1,231	0,972	-0,156

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^бМаксимална и минимална вредност енергије. ^вНулирање ниских вредности енергија. ^гМинимална стандардна девијација. ^дСтандардна девијација прорачуна. ^бСтандардна девијација грешке предвиђања. ^еКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ13. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за ОА пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,25 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,009	0,05	0,885	1,012	0,245	0,012
2	5	0,007	0,045	0,649	1,006	0,594	0,024
3	4	0,002	0,05	0,527	0,969	0,732	0,094
4	5	0,005	0,05	0,388	1,002	0,855	0,032
5	4	0,006	0,05	0,286	1,032	0,921	-0,027
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,009	0,05	0,861	1,017	0,212	0,003
2	5	0,007	0,045	0,632	1,071	0,567	0,013
3	4	0,002	0,05	0,511	0,989	0,713	0,063
4	5	0,005	0,05	0,342	1,054	0,784	0,026
5	4	0,006	0,05	0,271	1,830	0,863	-0,047

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^бМаксимална и минимална вредност енергије. ^вНулирање ниских вредности енергија. ^гМинимална стандардна девијација. ^дСтандардна девијација прорачуна. ^бСтандардна девијација грешке предвиђања. ^еКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ14. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за N пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,25 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,01	0,05	0,889	1,017	0,238	0,003
2	5	0,01	0,05	0,644	1,030	0,600	-0,022
3	5	0,01	0,05	0,518	0,964	0,741	0,104
4	5	0,007	0,05	0,386	1,003	0,856	0,030
5	5	0,007	0,05	0,273	1,012	0,928	0,012
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,01	0,05	0,854	1,099	0,222	0,017
2	5	0,01	0,05	0,621	1,047	0,672	-0,037
3	5	0,01	0,05	0,507	0,967	0,712	0,097
4	5	0,007	0,05	0,336	1,046	0,842	0,027
5	5	0,007	0,05	0,226	1,124	0,978	0,006

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^бМаксимална и минимална вредност енергије. ^вНулирање ниских вредности енергија. ^гМинимална стандардна девијација. ^дСтандардна девијација прорачуна. ^бСтандардна девијација грешке предвиђања. ^еКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ15. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за NA пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,25 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	1	0,01	0,05	0,9	1,032	0,219	-0,028
2	1	0,01	0,05	0,686	1,117	0,547	-0,203
3	1	0,01	0,05	0,55	1,098	0,709	-0,163
4	1	0,01	0,045	0,425	1,090	0,826	-0,146
5	3	0,01	0,05	0,338	1,077	0,890	-0,118
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^г	SDEC ^д	SDEP ^б	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	1	0,01	0,05	0,837	1,026	0,221	-0,029
2	1	0,01	0,05	0,645	1,003	0,535	-0,257
3	1	0,01	0,05	0,502	1,012	0,465	-0,173
4	1	0,01	0,045	0,383	1,024	0,807	-0,174
5	3	0,01	0,05	0,315	1,065	0,835	-0,159

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^бМаксимална и минимална вредност енергије. ^вНулирање ниских вредности енергија. ^гМинимална стандардна девијација. ^дСтандардна девијација прорачуна. ^бСтандардна девијација грешке предвиђања. ^еКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ16. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за е пробу са растојањем тачака унутар просторне решетке од 2,45 Å коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^b	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,05	0,855	1,008	0,295	0,021
2	5	0,004	0,05	0,598	1,114	0,655	-0,196
3	5	0,01	0,05	0,466	1,125	0,791	-0,221
4	1	0,01	0,005	0,351	1,205	0,881	-0,401
5	1	0,01	0,005	0,264	1,191	0,933	-0,368
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^b	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,05	0,817	1,013	0,265	0,007
2	5	0,004	0,05	0,534	1,126	0,624	-0,245
3	5	0,01	0,05	0,427	1,137	0,724	-0,246
4	1	0,01	0,005	0,316	1,256	0,813	-0,467
5	1	0,01	0,005	0,256	1,421	0,956	-0,378

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bМаксимална и минимална вредност енергије. ^cНулирање ниских вредности енергија. ^dМинимална стандардна девијација. ^eСтандардна девијација прорачуна. ^fСтандардна девијација грешке предвиђања. ^gКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ17. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из А пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,7 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^b	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,01	0,05	0,679	0,830	0,555	0,336
2	5	0,01	0,05	0,558	0,796	0,700	0,389
3	5	0,01	0,05	0,487	0,704	0,771	0,522
4	5	0,01	0,05	0,267	0,559	0,931	0,698
5	5	0,01	0,05	0,357	0,737	0,877	0,477
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^b	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,01	0,05	0,634	0,812	0,555	0,314
2	5	0,01	0,05	0,513	0,756	0,700	0,363
3	5	0,01	0,05	0,431	0,684	0,771	0,502
4	5	0,01	0,05	0,234	0,534	0,931	0,643
5	5	0,01	0,05	0,321	0,712	0,877	0,443

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bМаксимална и минимална вредност енергије. ^cНулирање ниских вредности енергија. ^dМинимална стандардна девијација. ^eСтандардна девијација прорачуна. ^fСтандардна девијација грешке предвиђања. ^gКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ18. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из С пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,7 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^B	MinStd ^f	SDEC ^д	SDEP ^h	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,05	0,633	0,805	0,613	0,374
2	5	0,008	0,05	0,505	0,766	0,754	0,434
3	5	0,008	0,05	0,471	0,688	0,786	0,544
4	5	0,008	0,05	0,250	0,540	0,940	0,719
5	5	0,008	0,05	0,272	0,601	0,928	0,652
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^B	MinStd ^f	SDEC ^д	SDEP ^h	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,05	0,613	0,785	0,613	0,351
2	5	0,008	0,05	0,502	0,745	0,754	0,413
3	5	0,008	0,05	0,454	0,656	0,786	0,532
4	5	0,008	0,05	0,213	0,534	0,940	0,704
5	5	0,008	0,05	0,245	0,593	0,928	0,632

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bМаксимална и минимална вредност енергије. ^BНулирање ниских вредности енергија. ^fМинимална стандардна девијација. ^дСтандардна девијација прорачуна. ^hСтандардна девијација грешке предвиђања. ^eКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ19. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из HD пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,6 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^B	MinStd ^f	SDEC ^д	SDEP ^h	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,035	0,621	0,758	0,628	0,446
2	5	0,008	0,035	0,330	0,531	0,895	0,728
3	5	0,008	0,035	0,227	0,440	0,950	0,813
4	5	0,008	0,035	0,199	0,411	0,962	0,837
5	5	0,008	0,035	0,116	0,360	0,987	0,875
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^B	MinStd ^f	SDEC ^д	SDEP ^h	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,035	0,605	0,731	0,628	0,414
2	5	0,008	0,035	0,246	0,518	0,895	0,714
3	5	0,008	0,035	0,213	0,414	0,950	0,802
4	5	0,008	0,035	0,174	0,396	0,962	0,813
5	5	0,008	0,035	0,104	0,332	0,987	0,856

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bМаксимална и минимална вредност енергије. ^BНулирање ниских вредности енергија. ^fМинимална стандардна девијација. ^дСтандардна девијација прорачуна. ^hСтандардна девијација грешке предвиђања. ^eКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ20. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из ОА пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,9 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^h	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,009	0,05	0,723	0,848	0,497	0,307
2	5	0,009	0,05	0,508	0,705	0,751	0,520
3	5	0,009	0,05	0,425	0,665	0,826	0,573
4	5	0,009	0,05	0,342	0,728	0,887	0,488
5	5	0,009	0,05	0,190	0,526	0,965	0,734
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^h	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,009	0,05	0,711	0,832	0,497	0,295
2	5	0,009	0,05	0,464	0,695	0,751	0,505
3	5	0,009	0,05	0,412	0,612	0,826	0,543
4	5	0,009	0,05	0,313	0,706	0,887	0,413
5	5	0,009	0,05	0,164	0,534	0,965	0,725

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bМаксимална и минимална вредност енергије. ^cНулирање ниских вредности енергија. ^dМинимална стандардна девијација. ^eСтандардна девијација прорачуна. ^fСтандардна девијација грешке предвиђања. ^gКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ21. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из N пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,9 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^h	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,01	0,035	0,650	0,789	0,593	0,399
2	5	0,01	0,035	0,424	0,649	0,827	0,593
3	5	0,01	0,035	0,271	0,524	0,929	0,736
4	5	0,01	0,035	0,221	0,470	0,953	0,787
5	5	0,01	0,035	0,128	0,358	0,984	0,877
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^h	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,01	0,035	0,614	0,711	0,593	0,332
2	5	0,01	0,035	0,414	0,623	0,827	0,536
3	5	0,01	0,035	0,235	0,413	0,929	0,711
4	5	0,01	0,035	0,214	0,432	0,953	0,763
5	5	0,01	0,035	0,065	0,334	0,984	0,813

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bМаксимална и минимална вредност енергије. ^cНулирање ниских вредности енергија. ^dМинимална стандардна девијација. ^eСтандардна девијација прорачуна. ^fСтандардна девијација грешке предвиђања. ^gКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ22. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из NA пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,9 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^b	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,007	0,05	0,773	0,918	0,423	0,187
2	5	0,007	0,05	0,544	0,771	0,714	0,427
3	5	0,007	0,05	0,365	0,637	0,872	0,608
4	5	0,007	0,05	0,377	0,699	0,863	0,528
5	5	0,007	0,05	0,193	0,491	0,964	0,767
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^b	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,007	0,05	0,706	0,906	0,423	0,142
2	5	0,007	0,05	0,513	0,735	0,714	0,363
3	5	0,007	0,05	0,332	0,513	0,872	0,574
4	5	0,007	0,05	0,313	0,562	0,863	0,462
5	5	0,007	0,05	0,156	0,453	0,964	0,732

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bМаксимална и минимална вредност енергије. ^cНулирање ниских вредности енергија. ^dМинимална стандардна девијација. ^eСтандардна девијација прорачуна. ^fСтандардна девијација грешке предвиђања. ^gКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ23. Статистички резултати 3-D QSAutogrid/R модела генерисаних из е пробе на растојању тачака унутар просторне решетке од 1,7 Å након примењивања процедуре симулираног хлађења (SA) на оптимизоване VPO моделе коришћењем leave-one-out (LOO) (горњи део табеле) и leave-some-out (LSO) (доњи део табеле) унакрсне валидације. Оптимални статистички резултати за 3-D QSAutogrid/R моделе су болдирани.

PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^b	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,05	0,647	0,827	0,596	0,341
2	5	0,008	0,05	0,611	0,780	0,640	0,414
3	5	0,008	0,05	0,478	0,735	0,780	0,479
4	5	0,008	0,05	0,252	0,474	0,939	0,783
5	5	0,008	0,05	0,153	0,442	0,978	0,812
PC ^a	CutOff ^b	Zeroing ^b	MinStd ^f	SDEC ^d	SDEP ^b	r ^{2e}	q ² _{LOO} ^ж
1	5	0,008	0,05	0,612	0,801	0,596	0,313
2	5	0,008	0,05	0,542	0,734	0,640	0,371
3	5	0,008	0,05	0,421	0,712	0,780	0,434
4	5	0,008	0,05	0,211	0,417	0,939	0,756
5	5	0,008	0,05	0,131	0,426	0,978	0,793

^aОптимални број принципијелних компоненти/латентних варијабли. ^bМаксимална и минимална вредност енергије. ^cНулирање ниских вредности енергија. ^dМинимална стандардна девијација. ^eСтандардна девијација прорачуна. ^fСтандардна девијација грешке предвиђања. ^gКонвенционални квадратни корелациони коефицијент. ^жКоефицијент унакрсне корелације добијен помоћу leave-one-out методе.

Табела ДМ24. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из А пробе на РС4 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	9,35	-0,11	8,89	0,35
1ERR	9,52	9,62	-0,10	9,01	0,51
1GWQ	5,85	6,47	-0,62	6,96	-1,11
1L2I	8,50	8,70	-0,20	8,91	-0,41
1RK5	7,40	7,64	-0,24	8,13	-0,73
1SJ0	9,09	9,17	-0,08	8,93	0,16
1UOM	7,70	7,59	0,11	7,70	0,00
1X7E	5,90	5,86	0,04	6,45	-0,55
1X7R	8,01	8,19	-0,18	8,34	-0,33
1XP1	9,30	9,3	0,00	8,88	0,42
1XP6	9,30	9,33	-0,03	9,14	0,16
1XP9	8,80	8,5	0,30	8,38	0,42
1XPC	8,70	8,81	-0,11	8,84	-0,14
1XQC	7,20	7,13	0,07	7,41	-0,21
1YIM	8,80	9,01	-0,21	9,21	-0,41
1YIN	8,80	8,77	0,03	9,46	-0,66
2B1Z	7,10	6,89	0,21	6,35	0,75
2BJ4	8,60	8,41	0,19	7,68	0,92
2IOG	8,09	8,05	0,04	8,62	-0,53
2IOK	9,00	8,94	0,06	9,42	-0,42
2QA6	7,30	7,15	0,15	7,27	0,03
2QA8	9,70	8,75	0,95	8,21	1,49
2R6W	8,60	8,58	0,02	8,82	-0,22
2R6Y	8,90	9,07	-0,17	9,05	-0,15
3ERD	9,48	9,75	-0,27	9,06	0,42
5AK2	8,40	8,24	0,16	8,29	0,11

Табела ДМ25. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из А пробе на РС4 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	8,84	0,40	8,05	1,19
1ERR	9,52	9,59	-0,07	8,96	0,56
1GWQ	5,85	6,75	-0,90	7,66	-1,81
1L2I	8,50	8,58	-0,08	9,27	-0,77
1RK5	7,40	7,51	-0,11	8,08	-0,68
1SJ0	9,09	8,68	0,41	8,71	0,38
1UOM	7,70	7,89	-0,19	7,96	-0,26
1X7E	5,90	5,80	0,10	6,83	-0,93
1X7R	8,01	8,03	-0,02	8,13	-0,12
1XP1	9,30	9,10	0,20	9,09	0,21
1XP6	9,30	9,15	0,15	9,26	0,04
1XP9	8,80	8,68	0,12	8,90	-0,10
1XPC	8,70	8,56	0,14	8,75	-0,05
1XQC	7,20	7,38	-0,18	7,73	-0,53
1YIM	8,80	8,81	-0,01	8,83	-0,03
1YIN	8,80	9,17	-0,37	9,57	-0,77
2B1Z	7,10	7,10	0,00	7,38	-0,28
2BJ4	8,60	8,49	0,11	7,81	0,79
2IOG	8,09	8,19	-0,10	8,36	-0,27
2IOK	9,00	9,34	-0,34	9,32	-0,32
2QA6	7,30	6,84	0,46	7,02	0,28
2QA8	9,70	8,64	1,06	7,48	2,22
2R6W	8,60	8,68	-0,08	8,54	0,06
2R6Y	8,90	9,19	-0,29	8,90	0,00
3ERD	9,48	9,98	-0,50	9,45	0,03
5AK2	8,40	8,32	0,08	8,03	0,37

Табела ДМ26. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из С пробе на РС4 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	9,18	0,06	7,98	1,26
1ERR	9,52	9,42	0,10	9,46	0,06
1GWQ	5,85	6,62	-0,77	7,10	-1,25
1L2I	8,50	8,60	-0,10	8,77	-0,27
1RK5	7,40	7,19	0,21	8,18	-0,78
1SJ0	9,09	9,27	-0,18	9,25	-0,16
1UOM	7,70	7,50	0,20	7,66	0,04
1X7E	5,90	5,67	0,23	6,57	-0,67
1X7R	8,01	7,86	0,15	7,96	0,05
1XP1	9,30	9,25	0,05	9,08	0,22
1XP6	9,30	9,31	-0,01	9,12	0,18
1XP9	8,80	8,58	0,22	8,36	0,44
1XPC	8,70	8,72	-0,02	8,71	-0,01
1XQC	7,20	7,33	-0,13	7,63	-0,43
1YIM	8,80	9,15	-0,35	9,22	-0,42
1YIN	8,80	9,22	-0,42	9,55	-0,75
2B1Z	7,10	7,22	-0,12	7,04	0,06
2BJ4	8,60	8,34	0,26	8,05	0,55
2IOG	8,09	8,06	0,03	8,62	-0,53
2IOK	9,00	9,18	-0,18	9,15	-0,15
2QA6	7,30	7,14	0,16	7,16	0,14
2QA8	9,70	9,14	0,56	8,64	1,06
2R6W	8,60	8,58	0,02	8,64	-0,04
2R6Y	8,90	8,91	-0,01	8,79	0,11
3ERD	9,48	9,47	0,01	9,00	0,48
5AK2	8,40	8,36	0,04	8,07	0,33

Табела ДМ27. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из С пробе на РС4 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	8,92	0,32	6,98	2,26
1ERR	9,52	9,22	0,30	8,46	1,06
1GWQ	5,85	5,22	0,63	6,10	-0,25
1L2I	8,50	7,60	0,90	7,77	0,73
1RK5	7,40	7,19	0,21	7,18	0,22
1SJ0	9,09	9,00	0,09	8,25	0,84
1UOM	7,70	6,90	0,80	6,66	1,04
1X7E	5,90	5,17	0,73	5,57	0,33
1X7R	8,01	7,36	0,65	6,96	1,05
1XP1	9,30	8,99	0,31	8,98	0,32
1XP6	9,30	9,10	0,20	9,00	0,3
1XP9	8,80	8,09	0,71	7,36	1,44
1XPC	8,70	7,78	0,92	7,71	0,99
1XQC	7,20	6,33	0,87	6,63	0,57
1YIM	8,80	8,85	-0,05	8,22	0,58
1YIN	8,80	9,02	-0,22	8,55	0,25
2B1Z	7,10	7,00	0,10	6,04	1,06
2BJ4	8,60	8,10	0,50	7,05	1,55
2IOG	8,09	7,66	0,43	7,92	0,17
2IOK	9,00	8,20	0,80	8,15	0,85
2QA6	7,30	6,87	0,43	7,16	0,14
2QA8	9,70	9,02	0,68	7,79	1,91
2R6W	8,60	8,18	0,42	7,64	0,96
2R6Y	8,90	8,11	0,79	7,79	1,11
3ERD	9,48	8,55	0,93	8,70	0,78
5AK2	8,40	7,97	0,43	7,88	0,52

Табела ДМ28. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из HD пробе на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	9,22	0,02	8,58	0,66
1ERR	9,52	9,56	-0,04	9,41	0,11
1GWQ	5,85	6,04	-0,19	6,45	-0,60
1L2I	8,50	8,55	-0,05	8,42	0,08
1RK5	7,40	7,42	-0,02	8,21	-0,81
1SJ0	9,09	9,06	0,03	8,99	0,100
1UOM	7,70	7,68	0,02	7,62	0,08
1X7E	5,90	5,76	0,14	5,95	-0,05
1X7R	8,01	8,30	-0,29	8,42	-0,41
1XP1	9,30	9,26	0,04	9,24	0,06
1XP6	9,30	9,29	0,01	9,33	-0,03
1XP9	8,80	8,85	-0,05	8,98	-0,18
1XPC	8,70	8,70	0,00	8,65	0,05
1XQC	7,20	7,21	-0,01	7,59	-0,39
1YIM	8,80	8,74	0,06	8,82	-0,02
1YIN	8,80	8,86	-0,06	9,03	-0,23
2B1Z	7,10	6,97	0,13	7,10	0,00
2BJ4	8,60	8,50	0,10	8,05	0,55
2IOG	8,09	8,08	0,01	8,20	-0,11
2IOK	9,00	9,00	0,00	9,05	-0,05
2QA6	7,30	7,23	0,07	7,30	0,00
2QA8	9,70	9,37	0,33	8,75	0,95
2R6W	8,60	8,66	-0,06	8,77	-0,17
2R6Y	8,90	8,84	0,06	8,58	0,32
3ERD	9,48	9,64	-0,16	9,13	0,35
5AK2	8,40	8,50	-0,10	8,33	0,07

Табела ДМ29. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из HD пробе на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	8,22	1,02	8,58	0,66
1ERR	9,52	8,56	0,96	8,41	1,11
1GWQ	5,85	7,04	-1,19	5,45	0,40
1L2I	8,50	7,55	0,95	7,42	1,08
1RK5	7,40	6,42	0,98	7,21	0,19
1SJ0	9,09	8,06	1,03	7,99	1,10
1UOM	7,70	6,68	1,02	6,62	1,08
1X7E	5,90	4,76	1,14	5,95	-0,05
1X7R	8,01	9,30	-1,29	7,42	0,59
1XP1	9,30	8,26	1,04	9,24	0,06
1XP6	9,30	8,29	1,01	8,33	0,97
1XP9	8,80	7,85	0,95	8,98	-0,18
1XPC	8,70	7,75	0,95	7,65	1,05
1XQC	7,20	8,21	-1,01	6,59	0,61
1YIM	8,80	9,74	-0,94	7,82	0,98
1YIN	8,80	9,86	-1,06	8,03	0,77
2B1Z	7,10	7,97	-0,87	7,40	-0,3
2BJ4	8,60	7,50	1,10	6,85	1,75
2IOG	8,09	7,08	1,01	7,80	0,29
2IOK	9,00	8,80	0,20	7,05	1,95
2QA6	7,30	9,23	-1,93	6,30	1,00
2QA8	9,70	8,37	1,33	7,79	1,91
2R6W	8,60	7,66	0,94	7,77	0,83
2R6Y	8,90	9,84	-0,94	7,58	1,32
3ERD	9,48	8,64	0,84	8,58	0,90
5AK2	8,40	8,90	-0,50	7,33	1,07

Табела ДМ30. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из ОА пробе на РС4 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	8,68	0,56	7,85	1,39
1ERR	9,52	9,44	0,08	9,05	0,47
1GWQ	5,85	6,77	-0,92	7,49	-1,64
1L2I	8,50	8,86	-0,36	9,06	-0,56
1RK5	7,40	7,37	0,03	8,01	-0,61
1SJ0	9,09	8,87	0,22	8,79	0,30
1UOM	7,70	7,84	-0,14	8,15	-0,45
1X7E	5,90	6,02	-0,12	7,50	-1,60
1X7R	8,01	7,91	0,10	7,70	0,31
1XP1	9,30	9,29	0,01	9,24	0,06
1XP6	9,30	9,00	0,30	8,82	0,48
1XP9	8,80	9,02	-0,22	9,13	-0,33
1XPC	8,70	8,44	0,26	8,29	0,41
1XQC	7,20	7,41	-0,21	7,98	-0,78
1YIM	8,80	9,03	-0,23	9,20	-0,40
1YIN	8,80	9,01	-0,21	9,23	-0,43
2B1Z	7,10	7,03	0,07	7,22	-0,12
2BJ4	8,60	8,37	0,23	7,75	0,85
2IOG	8,09	7,78	0,31	8,54	-0,45
2IOK	9,00	9,04	-0,04	9,07	-0,07
2QA6	7,30	6,80	0,50	6,92	0,38
2QA8	9,70	9,06	0,64	8,07	1,63
2R6W	8,60	8,87	-0,27	8,86	-0,26
2R6Y	8,90	9,06	-0,16	8,95	-0,05
3ERD	9,48	10,08	-0,60	9,66	-0,18
5AK2	8,40	8,23	0,17	8,30	0,10

Табела ДМ31. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из ОА пробе на РС4 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	7,68	1,56	7,85	1,39
1ERR	9,52	8,44	1,08	9,05	0,47
1GWQ	5,85	5,77	0,08	7,49	-1,64
1L2I	8,50	7,86	0,64	9,06	-0,56
1RK5	7,40	6,37	1,03	8,01	-0,61
1SJ0	9,09	7,87	1,22	8,79	0,30
1UOM	7,70	6,84	0,86	8,15	-0,45
1X7E	5,90	5,02	0,88	7,50	-1,60
1X7R	8,01	6,91	1,10	7,70	0,31
1XP1	9,30	8,29	1,01	9,24	0,06
1XP6	9,30	8,70	0,60	8,82	0,48
1XP9	8,80	8,02	0,78	9,13	-0,33
1XPC	8,70	7,44	1,26	8,29	0,41
1XQC	7,20	6,41	0,79	7,98	-0,78
1YIM	8,80	7,03	1,77	9,20	-0,40
1YIN	8,80	8,90	-0,10	9,23	-0,43
2B1Z	7,10	7,23	-0,13	7,22	-0,12
2BJ4	8,60	8,37	0,23	7,75	0,85
2IOG	8,09	6,78	1,31	8,54	-0,45
2IOK	9,00	8,04	0,96	9,07	-0,07
2QA6	7,30	5,80	1,50	6,92	0,38
2QA8	9,70	8,06	1,64	8,07	1,63
2R6W	8,60	8,87	-0,27	8,86	-0,26
2R6Y	8,90	8,06	0,84	8,95	-0,05
3ERD	9,48	9,08	0,40	9,66	-0,18
5AK2	8,40	7,23	1,17	8,30	0,10

Табела ДМ32. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из N пробе на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	9,21	8,81	0,03	0,43
1ERR	9,52	9,42	9,23	0,10	0,29
1GWQ	5,85	6,05	6,54	-0,20	-0,69
1L2I	8,50	8,57	8,67	-0,07	-0,17
1RK5	7,40	7,34	7,64	0,06	-0,24
1SJ0	9,09	9,23	9,16	-0,14	-0,07
1UOM	7,70	7,62	7,52	0,08	0,18
1X7E	5,90	6,05	6,51	-0,15	-0,61
1X7R	8,01	7,88	7,78	0,13	0,23
1XP1	9,30	9,24	9,09	0,06	0,21
1XP6	9,30	9,23	9,06	0,07	0,24
1XP9	8,80	8,84	8,85	-0,04	-0,05
1XPC	8,70	8,82	8,76	-0,12	-0,06
1XQC	7,20	7,35	7,67	-0,15	-0,47
1YIM	8,80	8,73	8,87	0,07	-0,07
1YIN	8,80	8,74	9,31	0,06	-0,51
2B1Z	7,10	6,94	6,94	0,16	0,16
2BJ4	8,60	8,57	8,37	0,03	0,23
2IOG	8,09	7,99	8,00	0,10	0,09
2IOK	9,00	9,08	8,84	-0,08	0,16
2QA6	7,30	7,08	7,20	0,22	0,10
2QA8	9,70	9,48	8,57	0,22	1,13
2R6W	8,60	8,57	8,51	0,03	0,09
2R6Y	8,90	9,03	9,03	-0,13	-0,13
3ERD	9,48	9,79	9,39	-0,31	0,09
5AK2	8,40	8,41	8,39	-0,01	0,01

Табела ДМ33. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из N пробе на РС5 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	8,21	1,03	0,01	9,23
1ERR	9,52	8,42	1,10	0,15	9,37
1GWQ	5,85	7,05	-1,20	0,20	5,65
1L2I	8,50	7,57	0,93	0,07	8,43
1RK5	7,40	6,90	0,50	0,03	7,37
1SJ0	9,09	8,23	0,86	0,05	9,04
1UOM	7,70	8,62	-0,92	0,08	7,62
1X7E	5,90	5,05	0,85	0,15	5,75
1X7R	8,01	6,88	1,13	0,10	7,91
1XP1	9,30	8,24	1,06	0,02	9,28
1XP6	9,30	8,23	1,07	0,01	9,29
1XP9	8,80	7,84	0,96	0,04	8,76
1XPC	8,70	7,82	0,88	0,12	8,58
1XQC	7,20	6,35	0,85	0,02	7,18
1YIM	8,80	7,73	1,07	0,06	8,74
1YIN	8,80	7,74	1,06	0,09	8,71
2B1Z	7,10	5,94	1,16	0,80	6,30
2BJ4	8,60	7,57	1,03	0,07	8,53
2IOG	8,09	6,99	1,10	0,60	7,49
2IOK	9,00	5,08	3,92	0,08	8,92
2QA6	7,30	6,08	1,22	0,10	7,20
2QA8	9,70	8,48	1,22	0,13	9,57
2R6W	8,60	8,57	0,03	0,02	8,58
2R6Y	8,90	8,60	0,30	-0,10	9,00
3ERD	9,48	8,90	0,58	-0,20	9,68
5AK2	8,40	7,41	0,99	-0,09	8,49

Табела ДМ34. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из NA пробе на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	9,20	0,04	8,53	0,71
1ERR	9,52	9,57	-0,05	9,07	0,45
1GWQ	5,85	6,54	-0,69	7,18	-1,33
1L2I	8,50	8,55	-0,05	9,13	-0,63
1RK5	7,40	7,44	-0,04	7,77	-0,37
1SJ0	9,09	8,94	0,15	9,02	0,07
1UOM	7,70	7,66	0,04	7,80	-0,10
1X7E	5,90	5,51	0,39	6,51	-0,61
1X7R	8,01	8,06	-0,05	8,15	-0,14
1XP1	9,30	9,30	0,00	9,19	0,11
1XP6	9,30	9,22	0,08	9,10	0,20
1XP9	8,80	8,77	0,03	8,95	-0,15
1XPC	8,70	8,59	0,11	8,66	0,04
1XQC	7,20	7,27	-0,07	7,97	-0,77
1YIM	8,80	8,81	-0,01	9,00	-0,20
1YIN	8,80	8,78	0,02	9,08	-0,28
2B1Z	7,10	6,92	0,18	6,56	0,54
2BJ4	8,60	8,61	-0,01	8,06	0,54
2IOG	8,09	8,13	-0,04	7,75	0,34
2IOK	9,00	9,20	-0,2	9,22	-0,22
2QA6	7,30	7,15	0,15	7,21	0,09
2QA8	9,70	9,33	0,37	8,74	0,96
2R6W	8,60	8,69	-0,09	8,92	-0,32
2R6Y	8,90	9,06	-0,16	8,80	0,10
3ERD	9,48	9,48	0,00	9,06	0,42
5AK2	8,40	8,49	-0,09	8,07	0,33

Табела ДМ35. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из NA пробе на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	8,20	1,04	7,53	1,71
1ERR	9,52	8,57	0,95	8,07	1,45
1GWQ	5,85	7,54	-1,69	6,18	-0,33
1L2I	8,50	7,55	0,95	8,13	0,37
1RK5	7,40	6,44	0,96	6,77	0,63
1SJ0	9,09	7,94	1,15	8,02	1,07
1UOM	7,70	6,66	1,04	6,8	0,90
1X7E	5,90	4,51	1,39	5,51	0,39
1X7R	8,01	7,06	0,95	7,15	0,86
1XP1	9,30	8,90	0,40	8,19	1,11
1XP6	9,30	8,22	1,08	8,1	1,20
1XP9	8,80	6,77	2,03	7,95	0,85
1XPC	8,70	7,59	1,11	7,66	1,04
1XQC	7,20	6,27	0,93	6,97	0,23
1YIM	8,80	7,81	0,99	8,00	0,80
1YIN	8,80	8,78	0,02	8,08	0,72
2B1Z	7,10	5,92	1,18	5,56	1,54
2BJ4	8,60	7,61	0,99	7,06	1,54
2IOG	8,09	7,67	0,42	6,75	1,34
2IOK	9,00	8,78	0,22	8,22	0,78
2QA6	7,30	6,15	1,15	8,21	-0,91
2QA8	9,70	8,33	1,37	7,74	1,96
2R6W	8,60	7,69	0,91	7,92	0,68
2R6Y	8,90	8,06	0,84	7,80	1,10
3ERD	9,48	8,48	1,00	8,86	0,62
5AK2	8,40	7,70	0,70	7,97	0,43

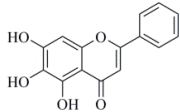
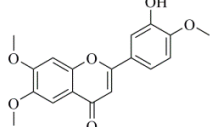
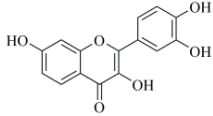
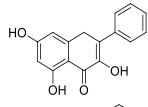
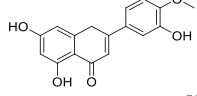
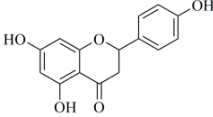
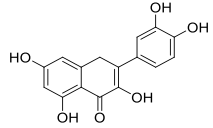
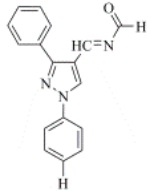
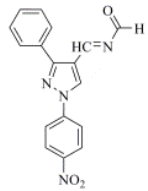
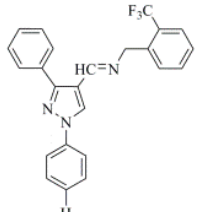
Табела ДМ36. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из е пробе на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

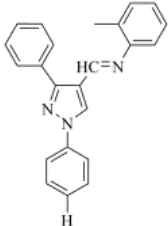
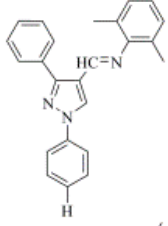
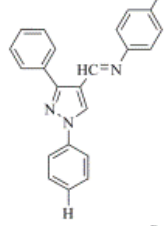
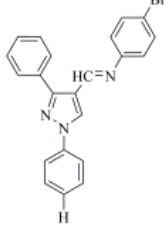
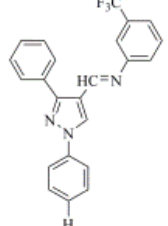
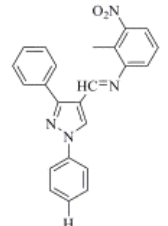
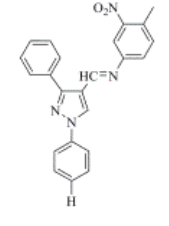
Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	9,32	-0,08	9,24	0,00
1ERR	9,52	9,21	0,31	9,13	0,39
1GWQ	5,85	5,94	-0,09	6,62	-0,77
1L2I	8,50	8,47	0,03	8,09	0,41
1RK5	7,40	7,17	0,23	7,75	-0,35
1SJ0	9,09	9,10	-0,01	9,10	-0,01
1UOM	7,70	7,82	-0,12	7,75	-0,05
1X7E	5,90	5,82	0,08	6,11	-0,21
1X7R	8,01	7,87	0,14	7,60	0,41
1XP1	9,30	9,11	0,19	9,07	0,23
1XP6	9,30	9,47	-0,17	9,54	-0,24
1XP9	8,80	8,89	-0,09	8,90	-0,10
1XPC	8,70	8,76	-0,06	8,75	-0,05
1XQC	7,20	7,21	-0,01	6,92	0,28
1YIM	8,80	8,77	0,03	8,66	0,14
1YIN	8,80	8,84	-0,04	9,01	-0,21
2B1Z	7,10	7,37	-0,27	7,54	-0,44
2BJ4	8,60	8,50	0,10	8,36	0,24
2IOG	8,09	7,90	0,19	8,32	-0,23
2IOK	9,00	8,88	0,12	9,41	-0,41
2QA6	7,30	7,40	-0,10	7,79	-0,49
2QA8	9,70	9,73	-0,03	9,20	0,50
2R6W	8,60	8,89	-0,29	9,27	-0,67
2R6Y	8,90	9,11	-0,21	9,54	-0,64
3ERD	9,48	9,27	0,21	8,18	1,30
5AK2	8,40	8,46	-0,06	8,18	0,22

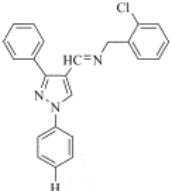
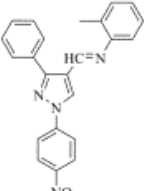
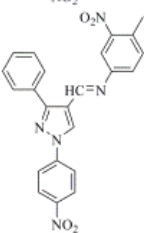
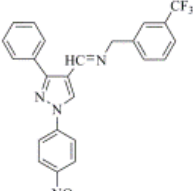
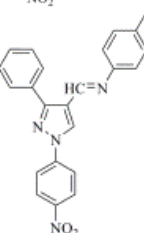
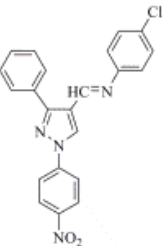
Табела ДМ37. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из е пробе на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунао	Грешка	Прерачунао	Грешка
1ERE	9,24	8,20	1,04	7,53	1,71
1ERR	9,52	8,57	0,95	8,07	1,45
1GWQ	5,85	5,54	0,31	5,18	0,67
1L2I	8,50	7,55	0,95	8,13	0,37
1RK5	7,40	6,44	0,96	8,77	-1,37
1SJ0	9,09	7,94	1,15	7,02	2,07
1UOM	7,70	6,66	1,04	6,80	0,90
1X7E	5,90	4,51	1,39	5,51	0,39
1X7R	8,01	7,06	0,95	7,15	0,86
1XP1	9,30	8,30	1,00	8,19	1,11
1XP6	9,30	8,22	1,08	8,10	1,20
1XP9	8,80	7,77	1,03	7,95	0,85
1XPC	8,70	7,59	1,11	7,66	1,04
1XQC	7,20	6,27	0,93	6,97	0,23
1YIM	8,80	7,81	0,99	8,00	0,80
1YIN	8,80	7,78	1,02	8,08	0,72
2B1Z	7,10	5,92	1,18	5,56	1,54
2BJ4	8,60	7,61	0,99	7,06	1,54
2IOG	8,09	7,13	0,96	6,75	1,34
2IOK	9,00	8,2	0,8	8,22	0,78
2QA6	7,30	6,15	1,15	6,21	1,09
2QA8	9,70	8,33	1,37	7,74	1,96
2R6W	8,60	7,90	0,70	7,92	0,68
2R6Y	8,90	8,80	0,10	7,80	1,10
3ERD	9,48	7,48	2,00	7,06	2,42
5AK2	8,40	7,99	0,41	7,99	0,41

Табела ДМ38. Хемијске структуре, активност и СВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pIC_{50} помоћу модела генерисаног из N пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pIC_{50}	Пред. pIC_{50}		Пред. pIC_{50}		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^b	АЕР ^B	
Бајкалеин		4,71	7,88	3,17	6,89	2,18	327
Еупаторин		5,09	6,78	1,69	6,00	0,91	327
Фисетин		5,38	5,98	0,60	4,89	0,49	328
Галангин		4,81	4,44	0,37	3,89	0,92	328
Хесперетин		4,4	3,99	0,41	3,12	1,28	328
Нарингенин		4,18	4,38	0,20	3,78	0,40	328
Кверцетин		4,76	7,98	3,22	6,56	1,80	328
I11-3a		3,70	8,48	4,78	7,67	3,97	329
I11-3b		3,47	8,28	4,81	7,22	3,75	329
I11-4a10		3,61	7,9	4,29	6,67	3,06	329

I11-4a1a		4,33	7,45	3,12	6,22	1,89	329
I11-4a2		4,13	5,56	1,43	4,45	0,32	329
I11-4a3b		4,25	5,12	0,87	4,68	0,43	329
I11-4a5		5,52	5,00	0,52	3,78	1,74	329
I114a6		4,89	5,67	0,78	4,01	0,88	329
I11-4a7		4,89	5,78	0,89	4,45	0,44	329
I11-4a8		5,40	6,99	1,59	5,78	0,38	329

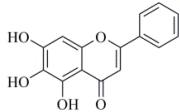
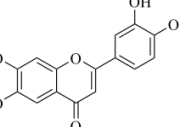
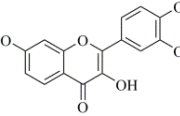
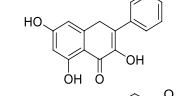
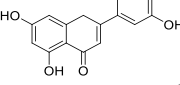
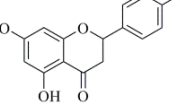
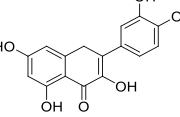
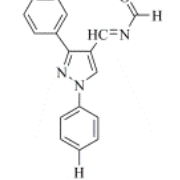
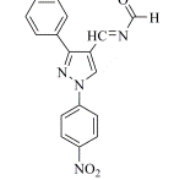
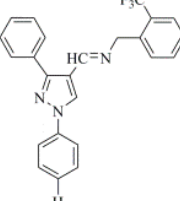
I11-4a9		4,89	7,89	3,00	7,00	2,11	329
I11-4b1		3,58	7,67	4,09	6,99	3,41	329
I11-4b6		3,63	5,22	1,59	4,78	1,15	329
I11-4b7		3,65	4,33	0,68	3,88	0,23	329
I11-4b2		3,58	5,01	1,43	4,99	1,41	329
I11-4b3		3,61	5,33	1,72	4,99	1,38	329

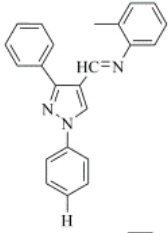
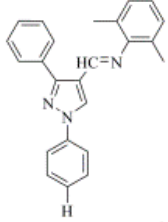
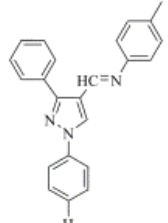
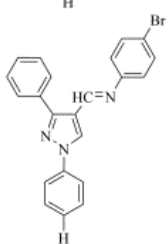
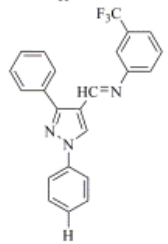
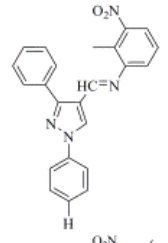
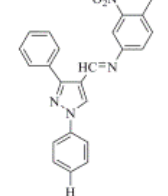
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

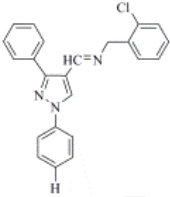
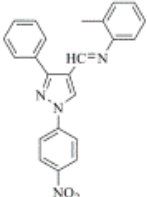
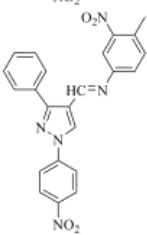
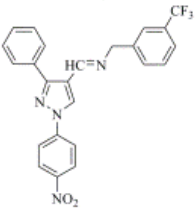
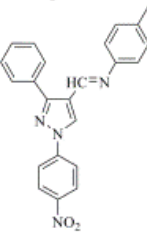
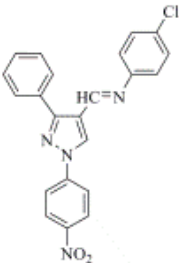
^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ39. Хемијске структуре, активност и ЛВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pIC_{50} помоћу модела генерисаног из N пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pIC_{50}	Пред. pIC_{50}		Пред. pIC_{50}		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^b	АЕР ^B	
Бајкалеин		4,71	7,27	2,56	8,27	3,56	327
Еупаторин		5,09	7,3	2,21	6,35	1,26	327
Фисетин		5,38	7,27	1,89	6,72	1,34	328
Галангин		4,81	7,64	2,83	6,70	1,89	328
Хесперетин		4,4	8,32	3,92	7,38	2,98	328
Нарингенин		4,18	5,13	0,95	4,11	0,07	328
Кверцетин		4,76	6,77	2,01	5,78	1,02	328
I11-3a		3,70	7,07	3,37	6,04	2,34	329
I11-3b		3,47	6,52	3,05	5,46	1,99	329
I11-4a10		3,61	7,48	3,87	6,47	2,86	329

I11-4a1a		4,33	8,03	3,70	7,04	2,71	329
I11-4a2		4,13	8,48	4,35	7,67	3,54	329
I11-4a3b		4,25	5,08	0,83	4,12	0,13	329
I11-4a5		5,52	7,11	1,59	6,23	0,71	329
I11-4a6		4,89	8,47	3,58	7,46	2,57	329
I11-4a7		4,89	8,42	3,53	7,32	2,43	329
I11-4a8		5,40	6,99	1,59	5,88	0,48	329

I11-4a9		4,89	8,76	3,87	7,73	2,84	329
I11-4b1		3,58	6,63	3,05	5,43	1,85	329
I11-4b6		3,63	7,12	3,49	6,22	2,59	329
I11-4b7		3,65	7,71	4,06	6,50	2,85	329
I11-4b2		3,58	6,86	3,28	5,56	1,98	329
I11-4b3		3,61	6,58	2,97	5,25	1,64	329

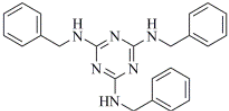
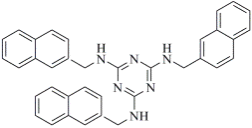
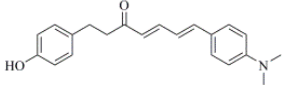
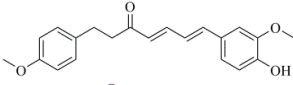
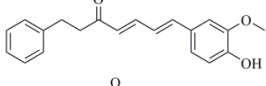
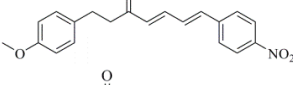
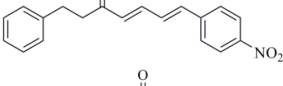
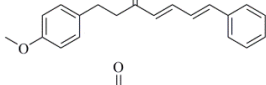
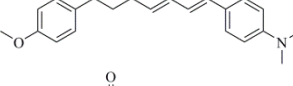
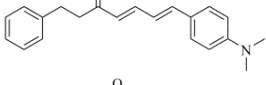
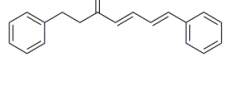
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

⁶LSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^bAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ40. Хемијске структуре, активност и СВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу модела генерисаног из N пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pK_i	Пред. pK_i		Пред. pK_i		Реф.
			LOO ^a	AEP ^B	LSO ^o	AEP ^B	
I3-I1		7,25	9,48	2,23	7,52	0,27	330
I3-I2		9,08	7,79	1,29	7,22	1,86	330
I3-I3		9,23	4,50	4,73	4,12	5,11	330
I3-I4		8,68	8,32	0,36	7,90	0,78	330
I3-I-A1		7,57	7,78	0,21	6,80	0,77	330
I3-I-A2		8,60	7,88	0,72	6,33	2,27	331
I3-I-A3		8,36	6,69	1,68	5,01	3,35	331
I3-I-B		8,49	5,65	2,84	5,17	3,32	331

I4-1c		3,39	8,91	5,52	7,90	4,51	333
I4-1e		4,49	6,61	2,12	5,92	1,43	333
I6-10		3,63	7,36	3,73	6,39	2,76	333
I6-12		5,86	3,88	1,98	3,00	2,86	333
I6-14		6,01	6,22	0,21	5,76	0,25	333
I6-15		5,63	4,94	0,69	3,22	2,41	333
I6-16		6,29	4,83	1,46	3,01	3,28	333
I6-17		5,83	5,24	0,59	4,78	1,05	333
I6-18		5,66	6,82	1,16	4,89	0,77	333
I6-19		6,04	5,55	0,50	4,00	2,04	333
I6-1		6,19	6,01	0,18	5,89	0,30	333

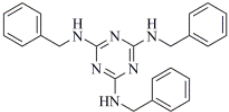
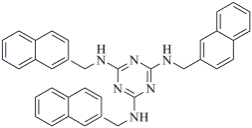
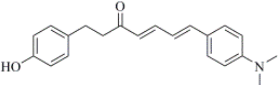
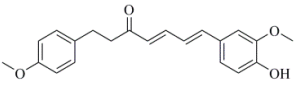
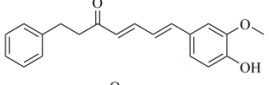
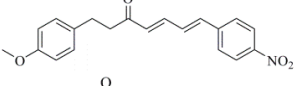
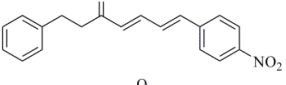
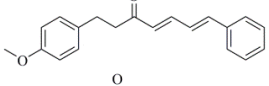
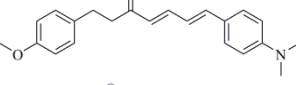
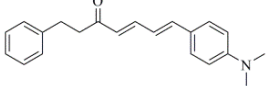
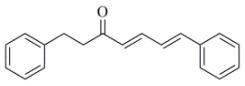
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ41. Хемијске структуре, активност и ЛВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу модела генерисаног из N пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pK_i	Пред. pK_i		Пред. pK_i		Реф.
			LOO ^a	AEP ^B	LSO ^b	AEP ^B	
I3-I1		7,25	8,44	1,19	7,42	0,17	330
I3-I2		9,08	8,78	0,30	7,88	1,2	330
I3-I3		9,23	5,54	3,69	4,99	4,24	330
I3-I4		8,68	9,33	0,65	8,45	0,23	330
I3-I-A1		7,57	8,46	0,89	8,00	0,43	330
I3-I-A2		8,60	8,41	0,19	7,32	1,28	331
I3-I-A3		8,36	8,49	0,13	7,57	0,79	331
I3-I-B		8,49	7,65	0,84	6,57	1,92	331

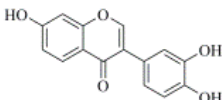
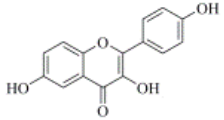
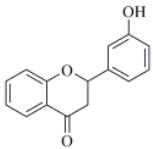
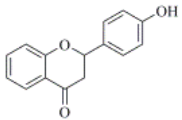
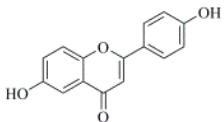
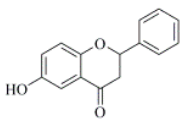
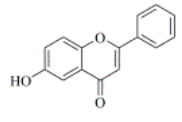
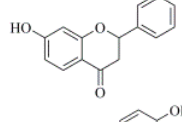
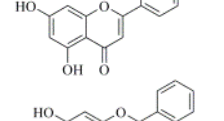
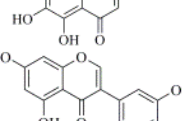

I4-1c		3,39	6,99	3,60	5,90	2,51	333
I4-1e		4,49	7,91	3,42	6,90	2,41	333
I6-10		3,63	8,46	4,83	7,32	3,69	333
I6-12		5,86	4,98	0,88	3,88	1,98	333
I6-14		6,01	6,63	0,62	5,76	0,25	333
I6-15		5,63	6,74	1,11	6,56	0,93	333
I6-16		6,29	4,73	1,56	3,56	2,74	333
I6-17		5,83	7,22	1,39	6,12	0,29	333
I6-18		5,66	7,12	1,46	6,11	0,45	333
I6-19		6,04	6,55	0,51	5,35	0,69	333
I6-1		6,19	7,02	0,83	6,12	0,07	333

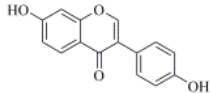
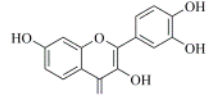
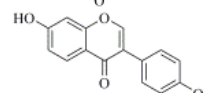
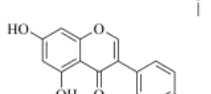
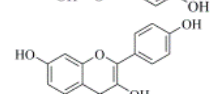
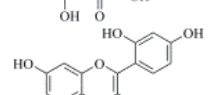
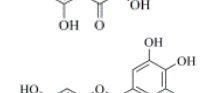
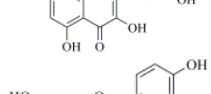
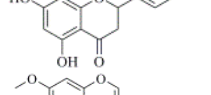
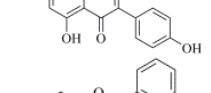
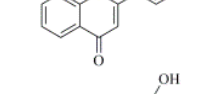
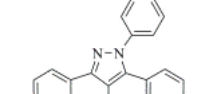
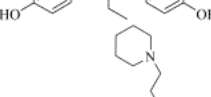
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

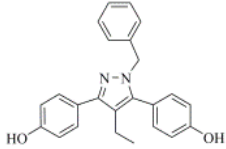
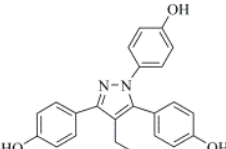
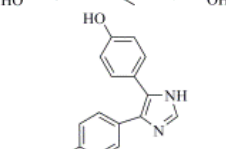
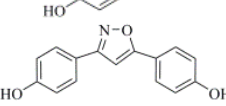
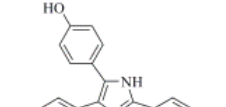
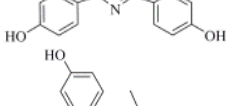
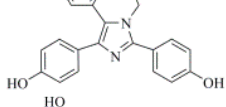
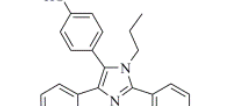
^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^cAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ42. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pRBA помоћу модела генерисаног из N пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pRBA	Пред. pRBA		Пред. pRBA		Реф.
			LOO ^a	AEP ^B	LSO ^b	AEP ^B	
3',4',7-трихидрокси изофлаван		5,35	8,89	3,54	8,89	3,54	333
3,6,4'-трихидрокси флаван		3,35	7,89	4,54	7,89	4,54	333
3'-хидроксифлаванон		5,77	6,78	1,01	6,78	1,01	333
4'-хидроксифлаванон		5,64	5,99	0,35	5,99	0,35	333
6,4'-дихидроксифлаванон		3,82	7,70	3,88	6,78	2,95	333
6-хидроксифлаванон		6,05	7,99	1,95	6,89	0,84	333
6-хидроксифлаванон		6,4	7,74	1,34	6,79	0,39	333
7-хидроксифлаванон		6,72	7,74	1,02	6,67	0,05	333
Апигенин		4,55	6,88	2,33	5,89	1,34	333
Бајкалеин		6,05	6,90	0,85	5,12	0,92	333
Биоканин А		5,37	8,49	3,12	7,99	2,62	333

Диазенин		4,64	8,1	3,46	7,01	2,37	333
Фисетин		5,35	6,97	1,62	6,00	0,65	333
Формонетин		5,89	8,11	2,22	7,78	1,89	333
Генистеин		3,35	7,06	3,71	6,89	3,54	333
Камферол		4,60	7,57	2,97	6,99	2,39	333
Морин		6,35	7,89	1,54	6,89	0,54	333
Мирицетин		5,75	6,55	0,81	5,33	0,41	333
Нарингенин		5,13	6,78	1,65	5,45	0,32	333
Прунетин		5,75	4,55	1,20	3,12	2,63	333
Флавон		5,35	5,89	0,54	4,77	0,58	333
I101		1,45	8,89	7,44	7,67	6,22	334
I102		3,19	8,70	5,52	7,67	4,48	334
I103		3,30	7,85	4,55	6,67	3,37	334

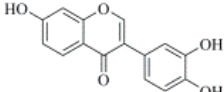
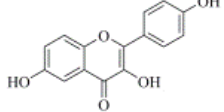
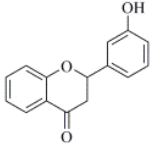
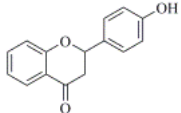
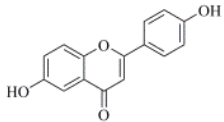
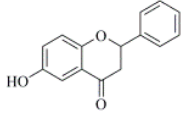
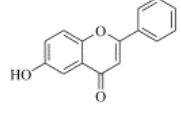
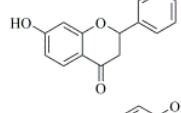
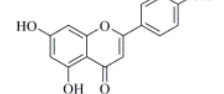
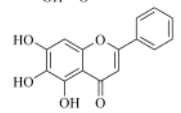
I938c		5,37	8,49	3,12	7,99	2,62	335
I938d		4,64	8,10	3,46	7,01	2,37	335
I93		5,35	6,97	1,62	6,00	0,65	335
I941		5,89	8,11	2,22	7,78	1,89	335
I96a		3,35	7,06	3,71	6,89	3,54	335
I96b		4,60	7,57	2,97	6,99	2,39	335
I96c		6,35	7,89	1,54	6,89	0,54	335
I96d		5,75	6,55	0,81	5,33	0,41	335

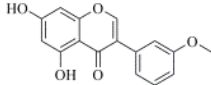
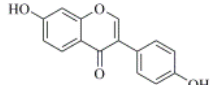
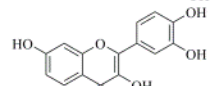
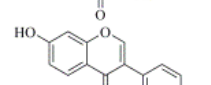
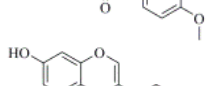
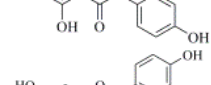
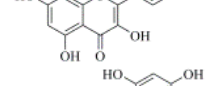
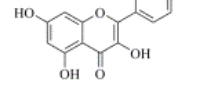
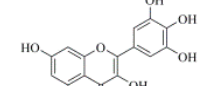
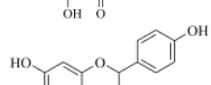
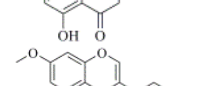
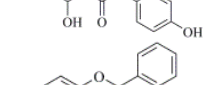
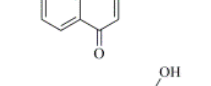
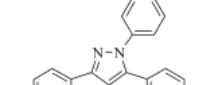
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

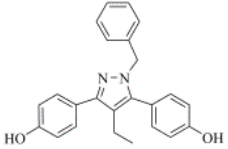
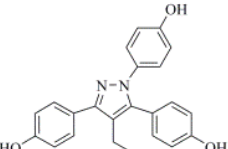
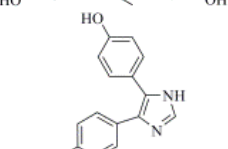
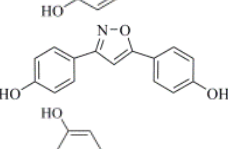
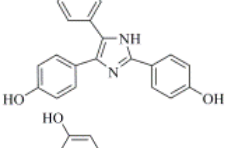
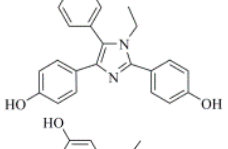
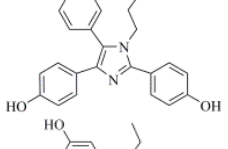
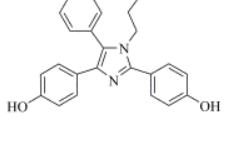
^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ43. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pRBA помоћу модела генерисаног из N пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pRBA	Пред. pRBA		Пред. pRBA		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^b	АЕР ^B	
3',4',7-трихидрокси изофлаван		5,35	5,13	0,22	4,12	1,22	333
3,6,4'-трихидрокси флаван		3,35	7,27	3,93	6,22	2,88	333
3'-хидроксифлаванон		5,77	5,13	0,64	4,24	1,53	333
4'-хидроксифлаванон		5,64	7,27	1,63	6,88	1,25	333
6,4'-дихидроксифлаванон		3,82	7,27	3,45	6,43	2,61	333
6-хидроксифлаванон		6,05	7,27	1,23	6,46	0,41	333
6-хидроксифлаванон		6,4	5,13	1,27	4,56	1,84	333
7-хидроксифлаванон		6,72	5,13	1,59	4,12	2,6	333
Апигенин		4,55	7,27	2,72	6,48	1,93	333
Бајкалеин		6,05	7,27	1,23	6,51	0,47	333

Биоканин А		5,37	7,27	1,91	6,49	1,13	333
Диазенин		4,64	8,37	3,74	7,27	2,64	333
Фисетин		5,35	8,53	3,19	7,55	2,2	333
Формонетин		5,89	7,27	1,39	6,39	0,51	333
Генистеин		3,35	8,20	4,86	7,40	4,06	333
Камферол		4,6	7,27	2,67	6,90	2,31	333
Морин		6,35	7,27	0,93	6,78	0,43	333
Мирицетин		5,75	7,27	1,53	6,99	1,25	333
Нарингенин		5,13	5,13	0,01	4,20	0,92	333
Прунетин		5,75	7,27	1,53	6,34	0,6	333
Флавоон		5,35	6,80	1,46	5,45	0,1	333
I101		1,45	7,27	5,83	6,76	5,32	334
I102		3,19	5,13	1,95	4,11	0,93	334
I103		3,3	7,27	3,97	6,77	3,48	334

I104		3,88	7,27	3,39	6,99	3,12	334
I105		1,94	7,27	5,33	6,88	4,95	334
I912		3,6	7,27	3,67	6,77	3,18	335
I922a		5,35	5,13	0,22	4,12	1,22	335
I922b		3,35	7,27	3,93	6,22	2,88	335
I929		5,77	5,13	0,64	4,24	1,53	335
I931		5,64	7,27	1,63	6,88	1,25	335
I935a		3,82	7,27	3,45	6,43	2,61	335
I935b		6,05	7,27	1,23	6,45	0,41	335
I935c		6,4	5,13	1,27	4,55	1,84	335
I935d		6,72	5,13	1,59	4,12	2,6	335
I938a		4,55	7,27	2,72	6,47	1,93	335
I938b		6,05	7,27	1,23	6,51	0,47	335

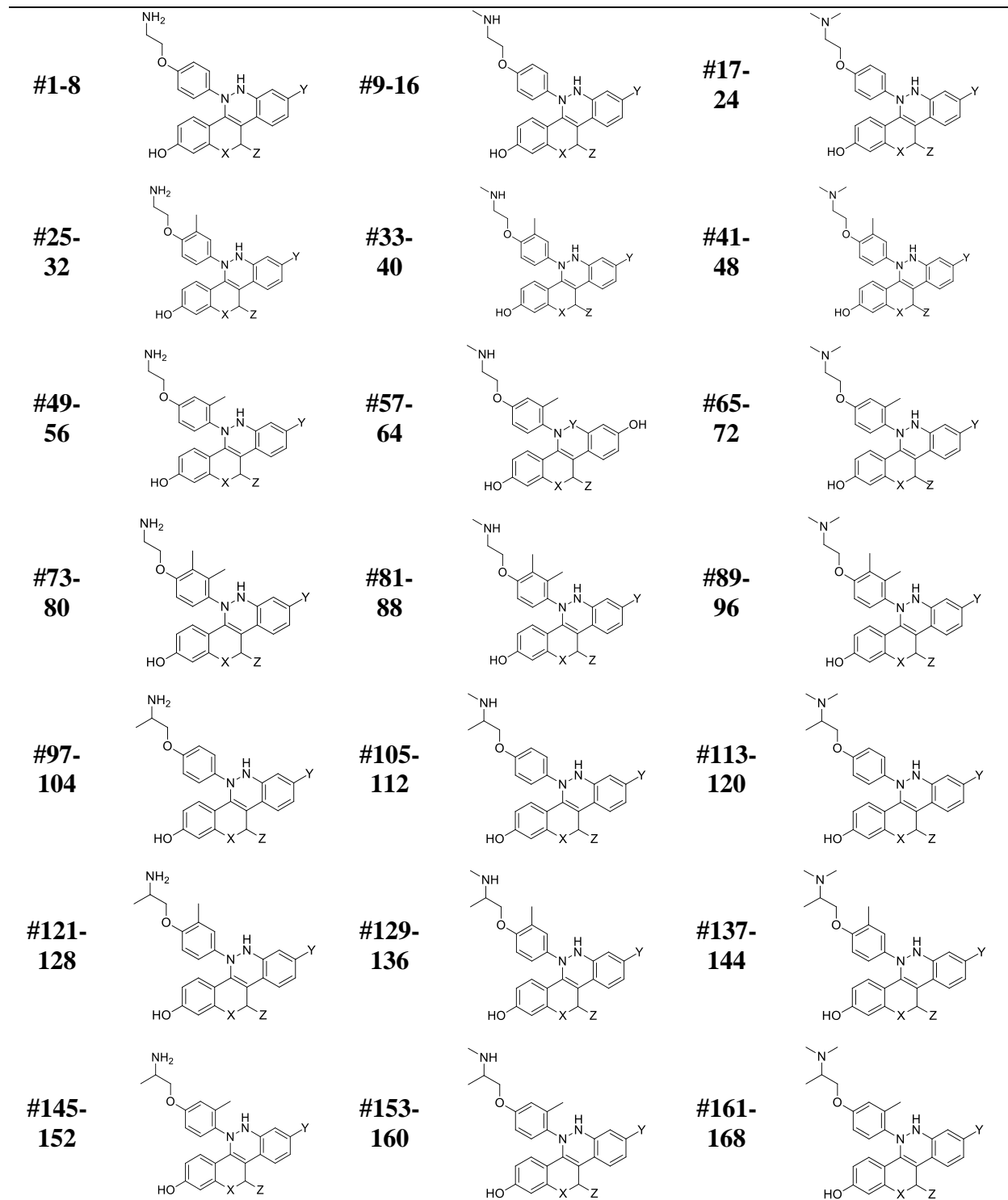
I938c		5,37	7,27	1,91	6,49	1,13	335
I938d		4,64	8,37	3,74	7,27	2,64	335
I93		5,35	8,53	3,19	7,54	2,2	335
I941		5,89	7,27	1,39	6,39	0,51	335
I96a		3,35	8,20	4,86	7,40	4,06	335
I96b		4,6	7,27	2,67	6,90	2,31	335
I96c		6,35	7,27	0,93	6,78	0,43	335
I96d		5,75	7,27	1,53	6,99	1,25	335

^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

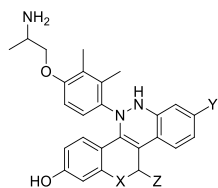
^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

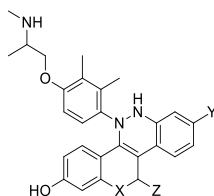
Табела ДМ44. Структуре дизајнираних антагониста ER α : X=O or N; Y=OH или NH₂, Z=(=O) или -O-CH₃.



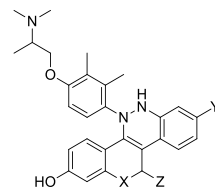
**#169-
176**



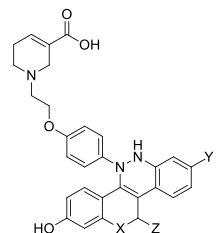
**#177-
184**



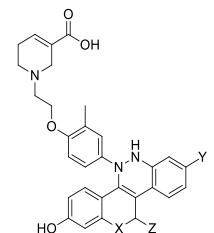
**#186-
192**



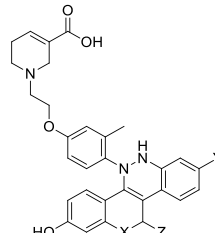
**#193-
200**



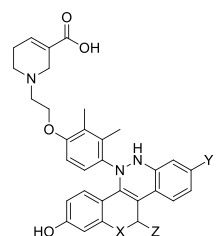
**#201-
208**



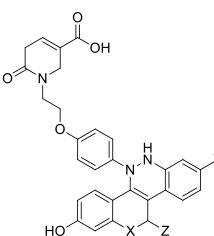
**#209-
216**



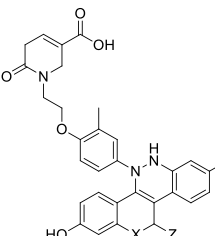
**#217-
224**



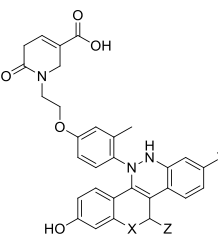
**#225-
232**



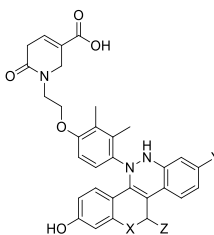
**#233-
240**



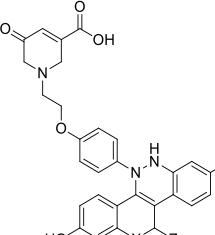
**#241-
248**



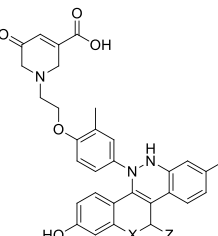
**#249-
256**



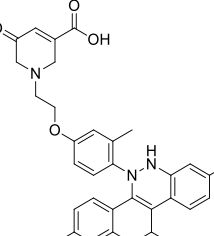
**#256-
264**



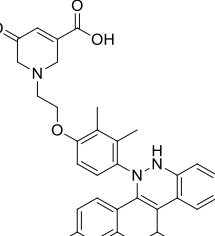
**#265-
272**



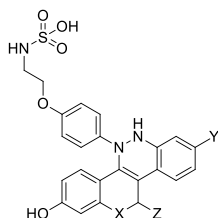
**#273-
280**



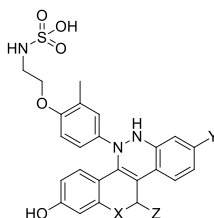
**#281-
288**



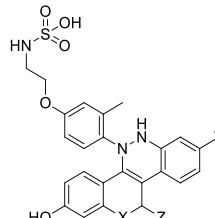
**#289-
296**



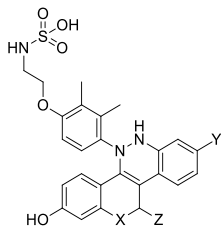
**#297-
304**



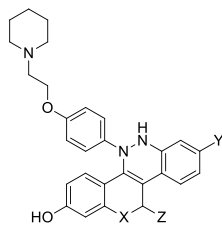
**#305-
312**



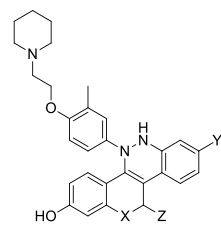
**#313-
320**



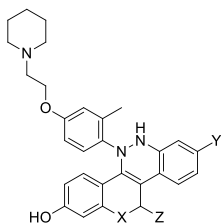
**#321-
328**



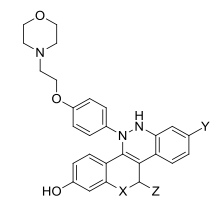
**#329-
336**



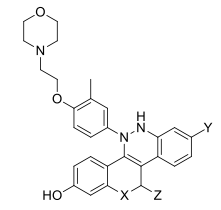
**#337-
344**



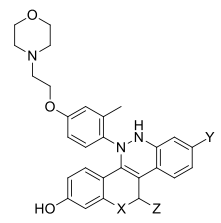
**#345-
352**



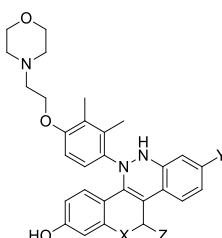
**#353-
360**



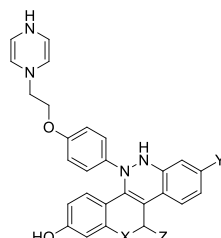
**#361-
368**



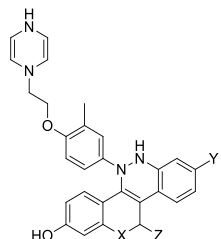
**#369-
376**



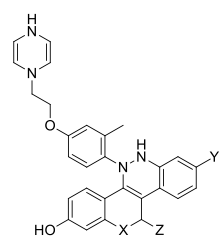
**#377-
384**



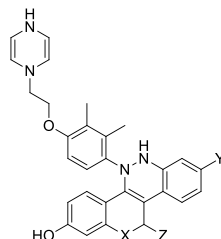
**#384-
392**



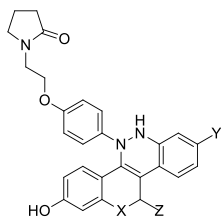
**#393-
400**



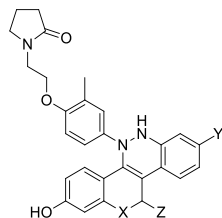
**#401-
408**



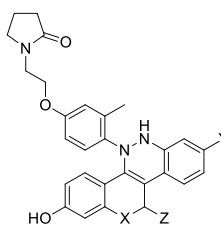
**#409-
416**



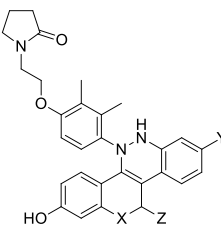
**#417-
424**



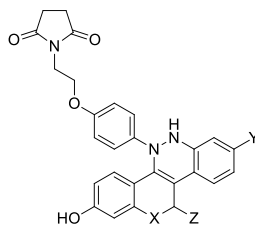
**#425-
432**



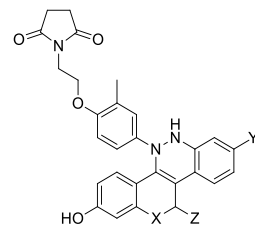
**#433-
440**



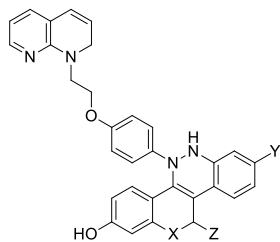
**#441-
448**



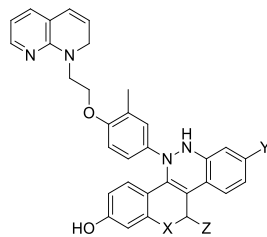
**#449-
456**



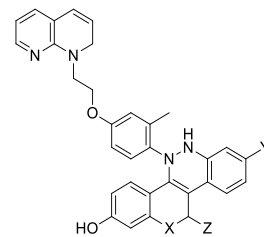
**#601-
608**



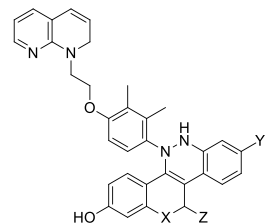
**#609-
616**



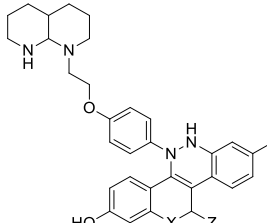
**#617-
624**



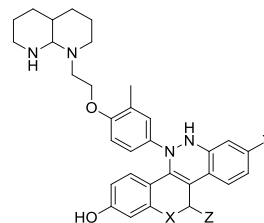
**#625-
632**



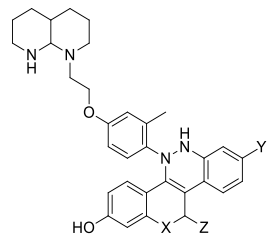
**#633-
640**



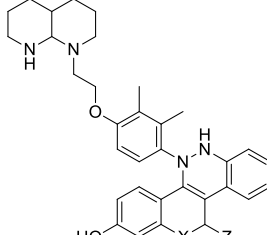
**#641-
648**



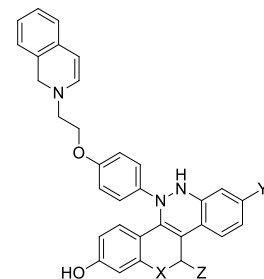
**#649-
656**



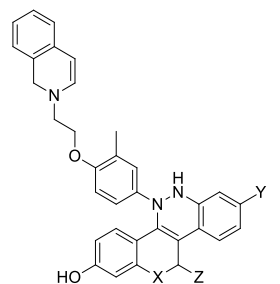
**#657-
664**



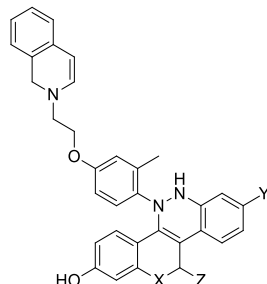
**#665-
672**



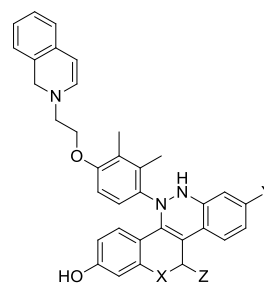
**#673-
680**



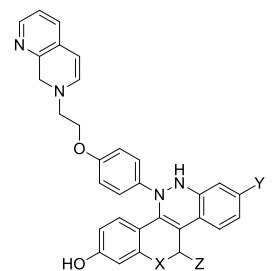
**#681-
688**



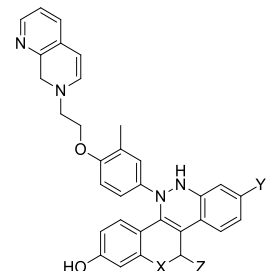
**#689-
696**



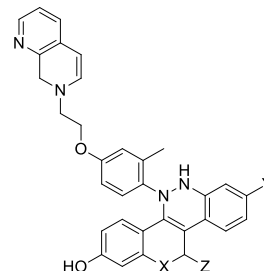
**#697-
704**



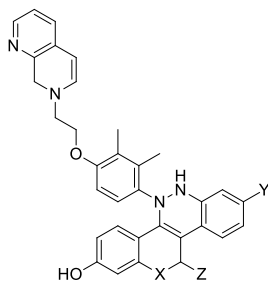
**#705-
712**



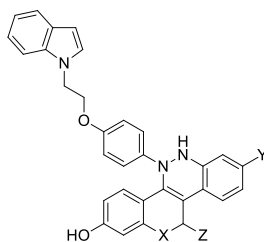
**#713-
720**



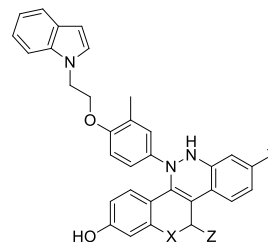
#721-
728



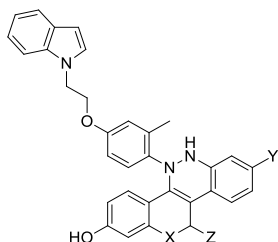
#729-
736



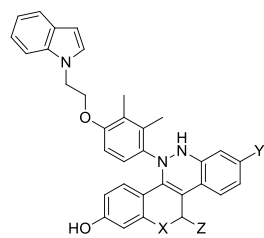
#737-
744



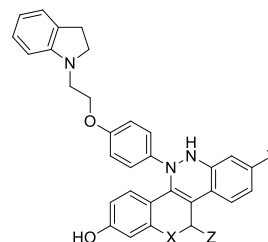
#745-
752



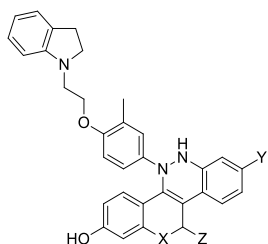
#753-
760



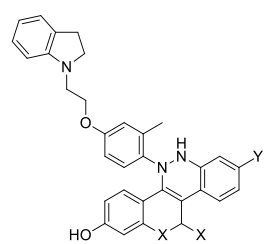
#761-
768



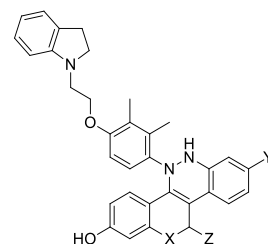
#769-
776



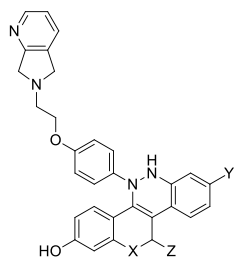
#777-
784



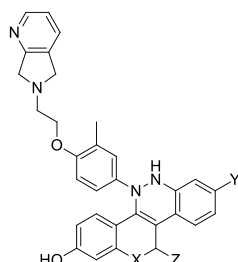
#785-
792



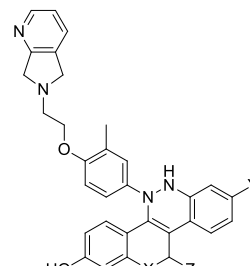
#793-
800



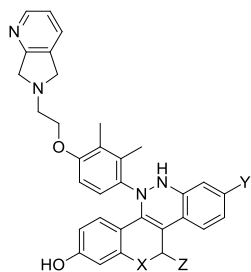
#801-
808



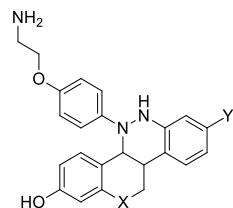
#809-
816



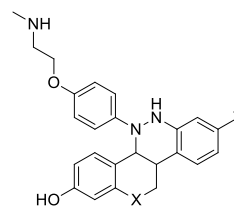
#817-
820



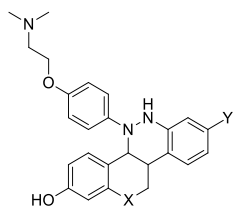
#821-
824



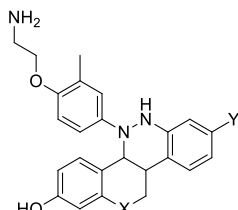
#825-
828



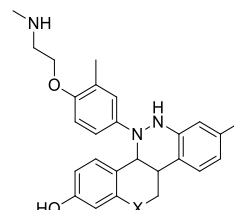
#829-
832



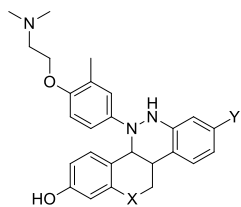
#833-
836



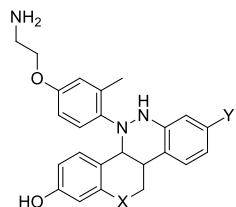
#837-
840



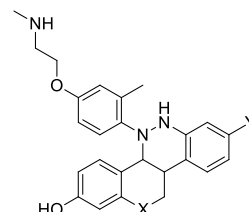
#841-
844



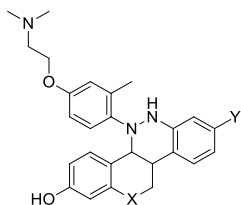
#845-
848



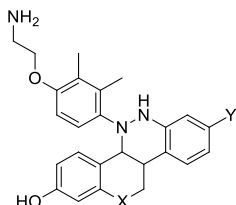
#849-
852



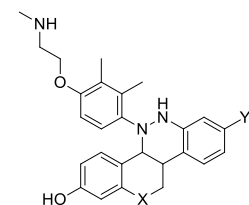
#853-
856



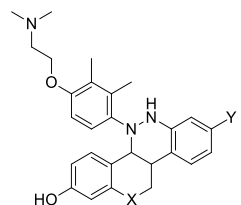
#857-
860



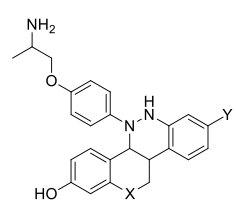
#861-
864



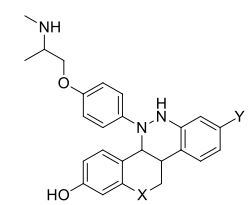
#865-
868



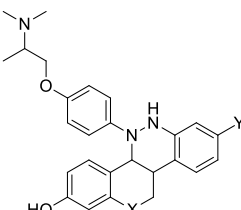
#869-
872



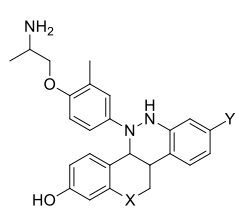
#873-
876



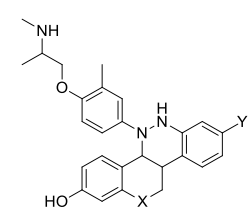
#877-
880



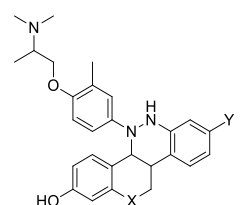
#881-
884



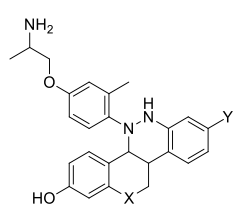
#885-
888



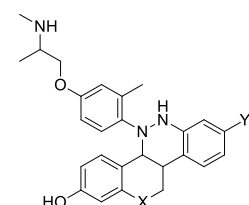
#889-
892



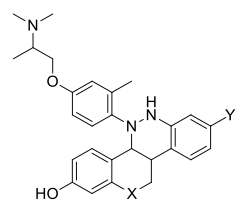
#893-
896



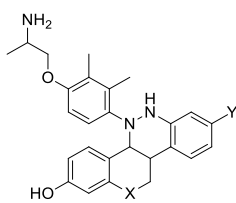
#897-
900



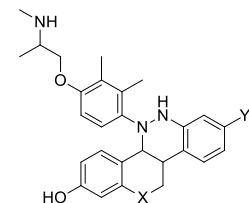
#901-
904



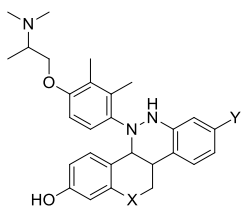
#905-
908



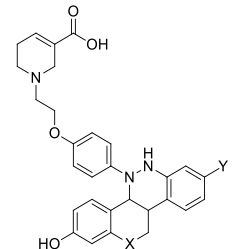
#909-
912



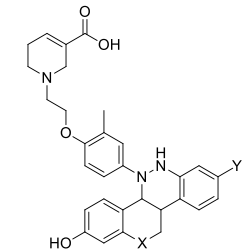
#913-
916



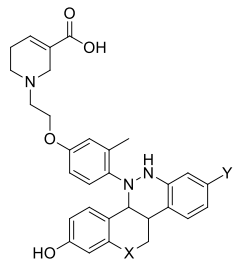
#917-
920



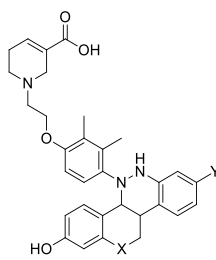
#921-
924



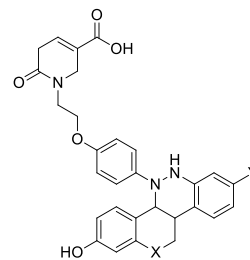
**#925-
928**



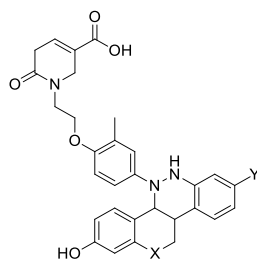
**#929-
932**



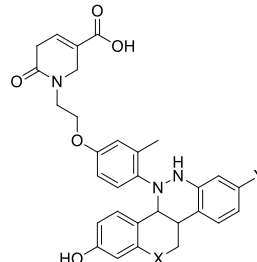
**#933-
936**



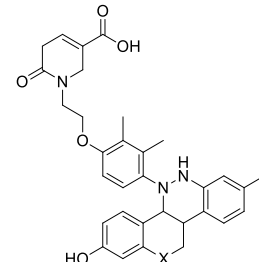
**#937-
940**



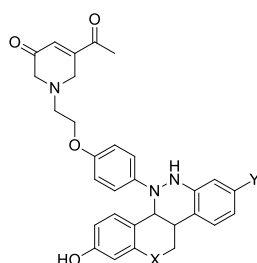
**#941-
944**



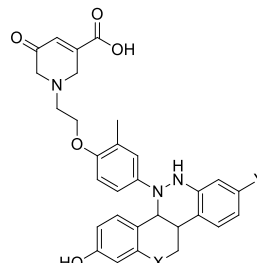
**#945-
948**



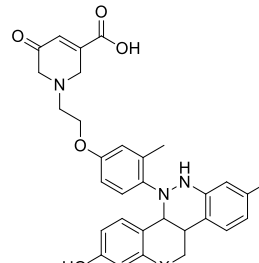
**#949-
952**



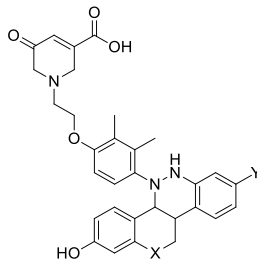
**#953-
956**



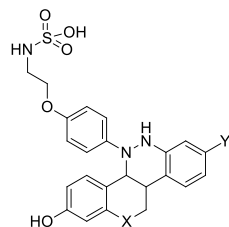
**#957-
960**



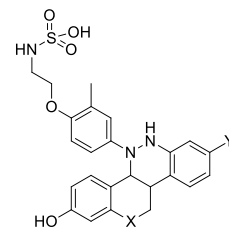
**#961-
964**



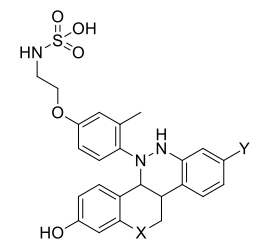
**#965-
968**



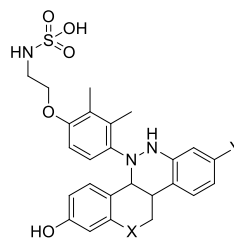
**#969-
972**



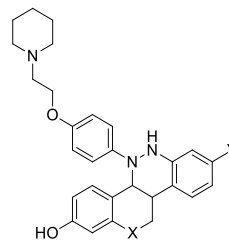
**#973-
976**



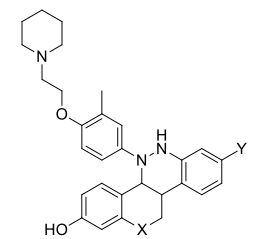
**#977-
980**



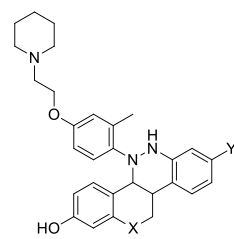
**#981-
984**



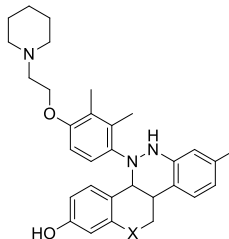
**#985-
988**



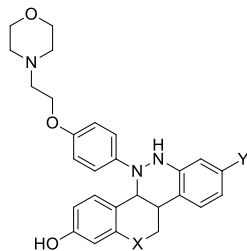
**#989-
992**



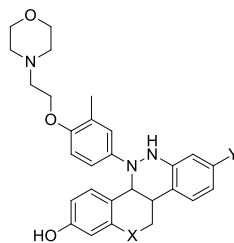
**#993-
996**



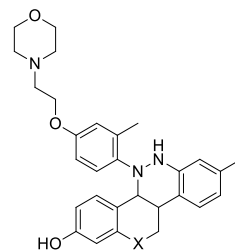
**#997-
-1000**



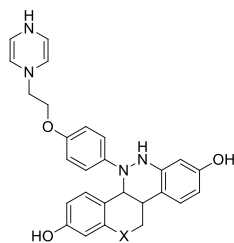
**#1001
-1004**



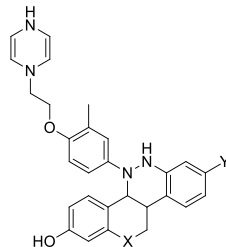
**#1005
-1008**



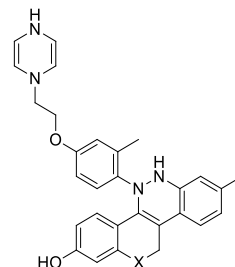
**#1009
-1012**



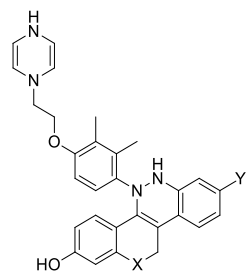
**#1013
-1016**



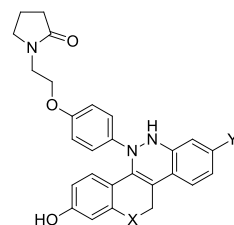
**#1017
-1020**



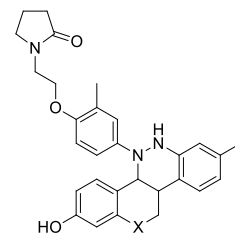
**#1021
-1024**



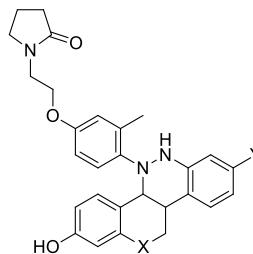
**#1025
-1028**



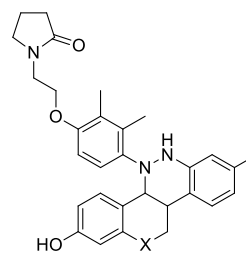
**#1029
-1032**



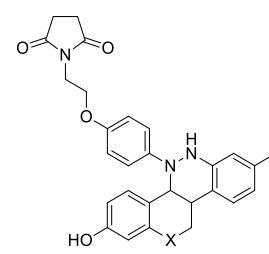
**#1033
-1036**



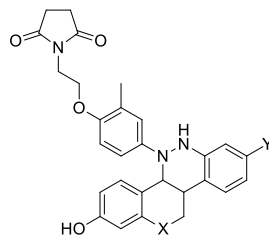
**#1037
-1040**



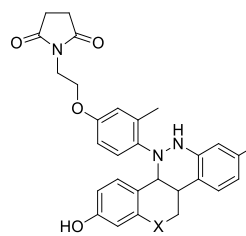
**#1041
-1044**



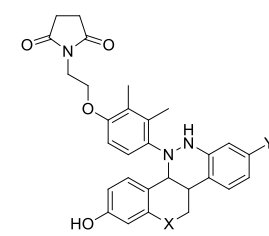
**#1045
-1048**



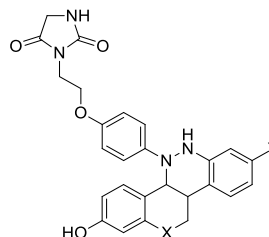
**#1049
-1052**



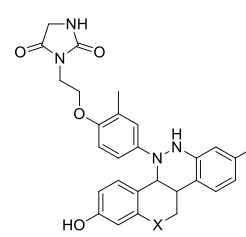
**#1053
-1056**



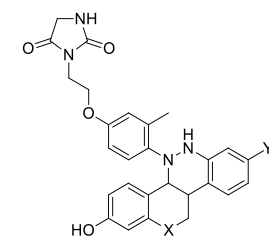
**#1057
-1060**



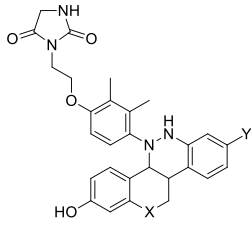
**#1061
-1064**



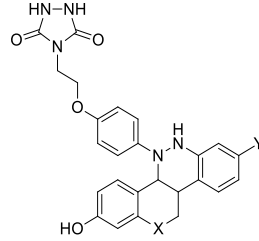
**#1065
-1068**



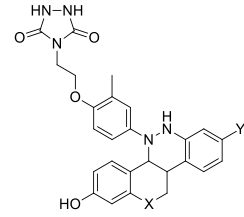
#1069
-1072



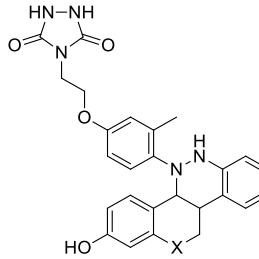
#1073
-1076



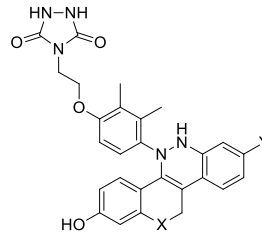
#1077
-1080



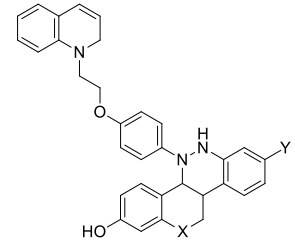
#1081
-1084



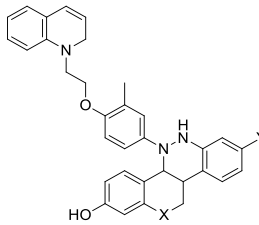
#1085
-1088



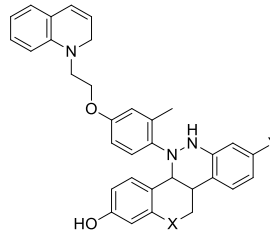
#1089
-1092



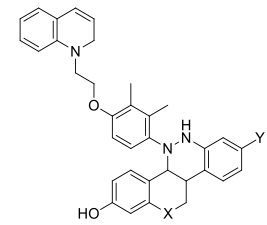
#1093
-1096



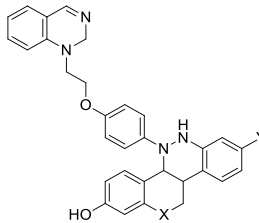
#1097
-1100



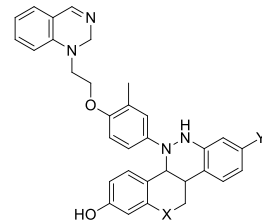
#1101
-1104



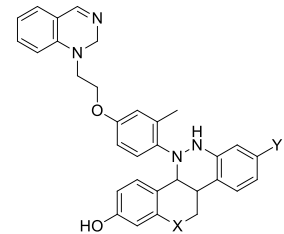
#1105
-1108



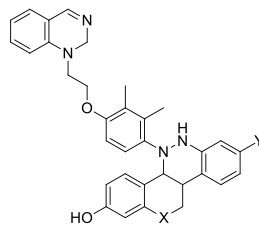
#1109
-1112



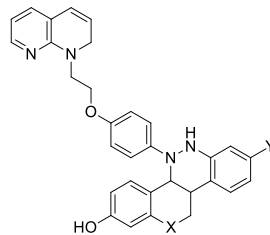
#1113
-1116



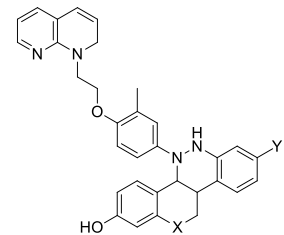
#1117
-1120



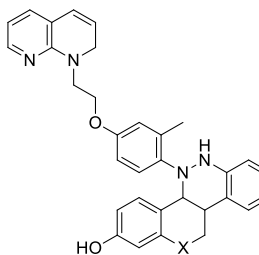
#1121
-1124



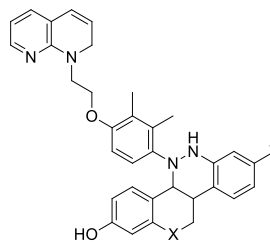
#1125
-1128



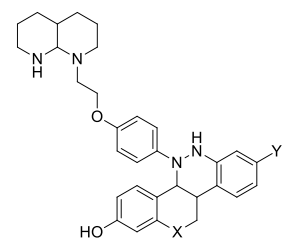
#1129
-1132



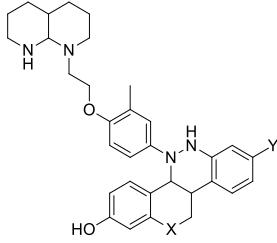
#1133
-1136



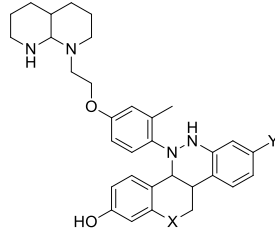
#1139
-1142



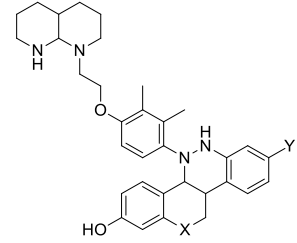
#1143
-1146



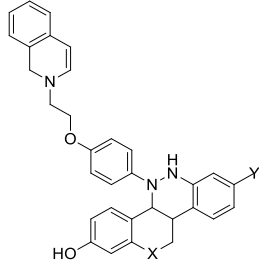
#1147
-1150



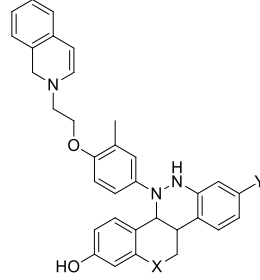
#1151
-1154



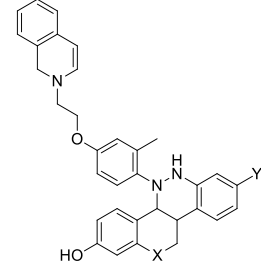
#1155
-1158



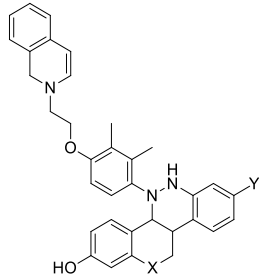
#1159
-1162



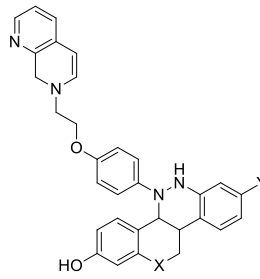
#1163
-1166



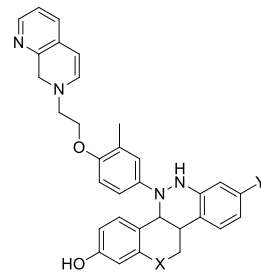
#1167
-1170



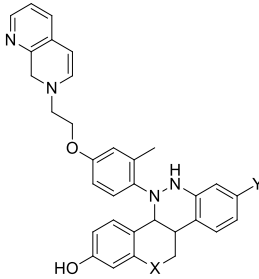
#1171
-1174



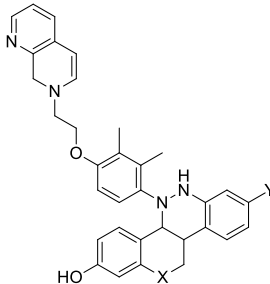
#1175
-1178



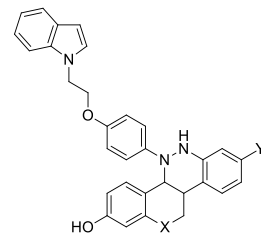
#1179
-1182



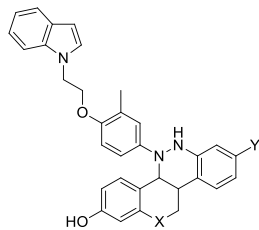
#1183
-1186



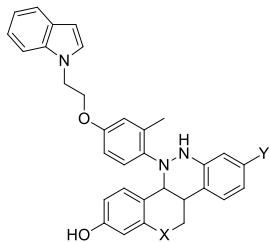
#1187
-1190



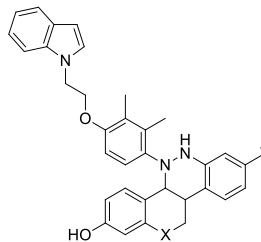
#1191
-1194



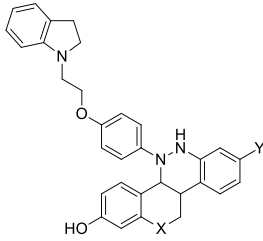
#1195
-1198



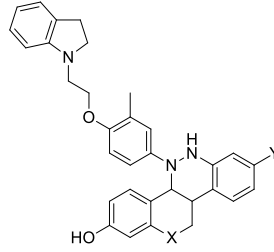
#1199
-1202



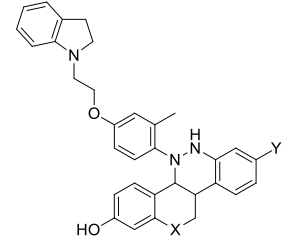
**#1203
-1206**



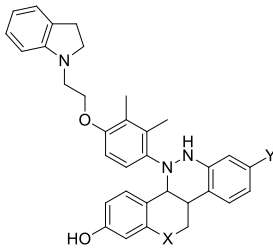
**#1207
-1210**



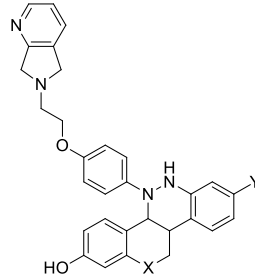
**#1211
-1214**



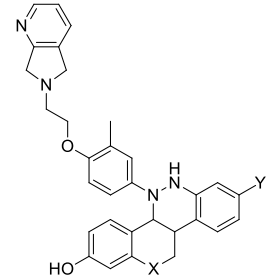
**#1215
-1218**



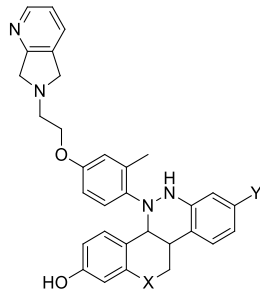
**#1219
-1222**



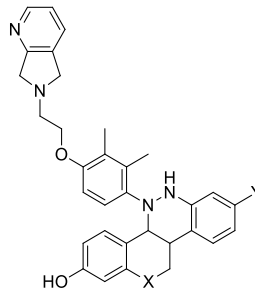
**#1223
-1226**



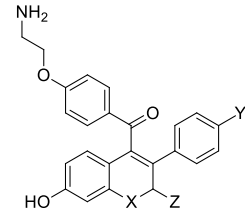
**#1227
-1234**



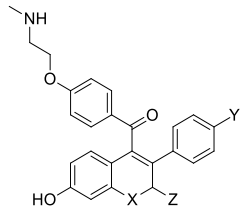
**#1235
-1242**



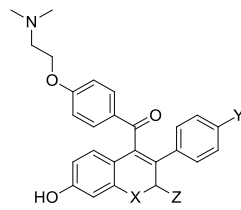
**#1243
-1250**



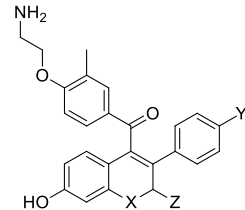
**#1251
-1258**



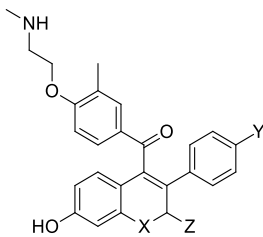
**#1259
-1266**



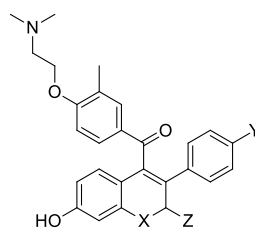
**#1267
-1274**



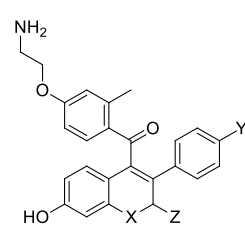
**#1275
-1282**



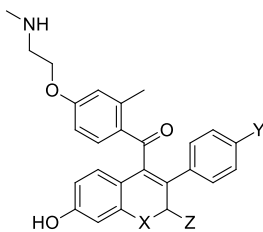
**#1283
-1290**



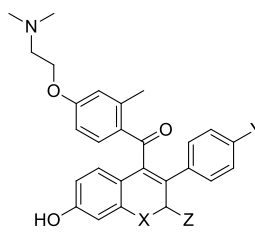
**#1291
-1298**



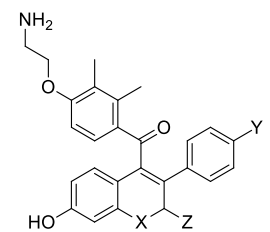
**#1299
-1306**



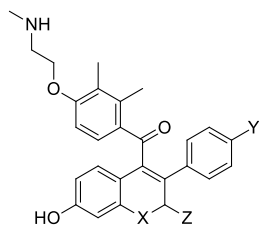
**#1307
-1314**



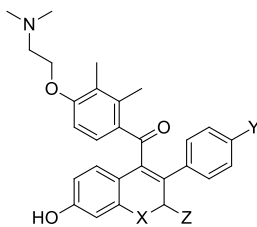
**#1315
-1322**



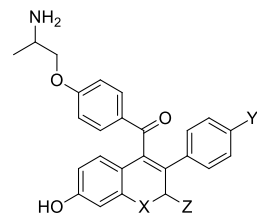
**#1323
-1330**



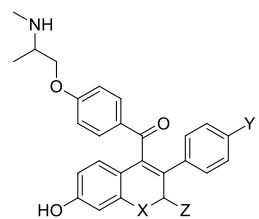
**#1331
-1338**



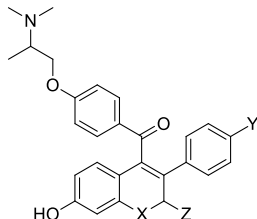
**#1339
-1346**



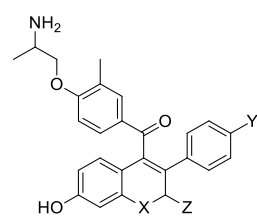
**#1347
-1354**



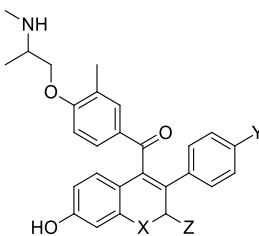
**#1355
-1362**



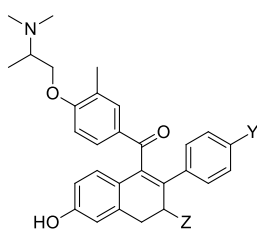
**#1363
-1370**



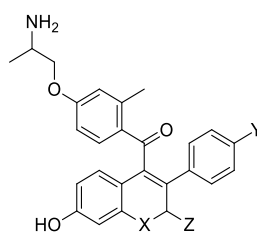
**#1371
-1378**



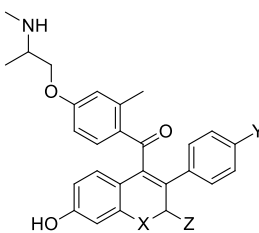
**#1379
-1386**



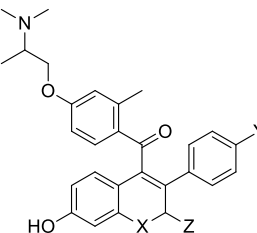
**#1387
-1394**



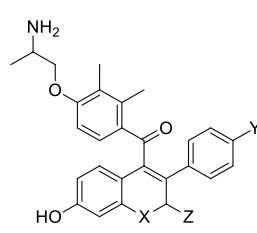
**#1395
-1402**



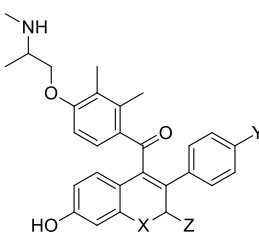
**#1403
-1410**



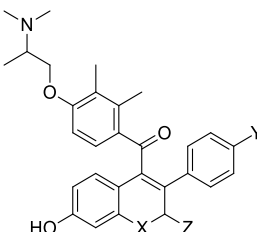
**#1411
-1418**



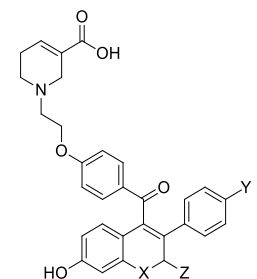
**#1419
-1426**



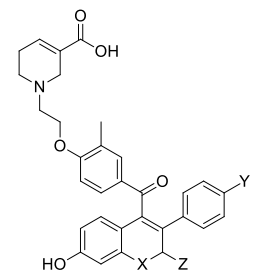
**#1427
-1434**



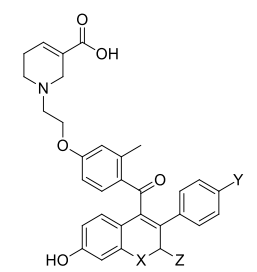
**#1435
-1442**



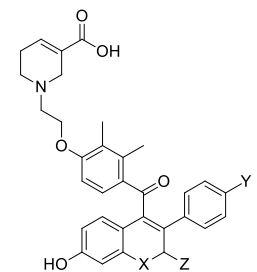
**#1443
-1450**



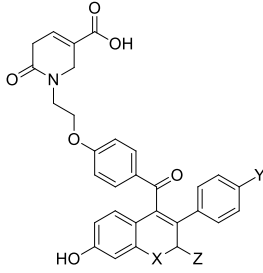
**#1451
-1458**



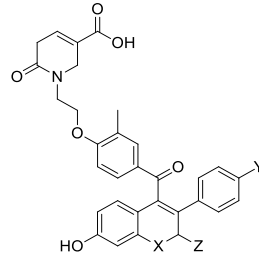
**#1459
-1466**



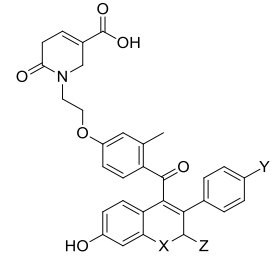
#1467
-1474



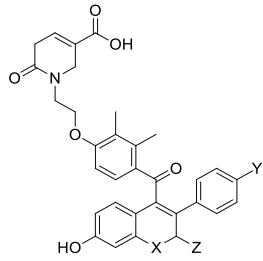
#1475
-1482



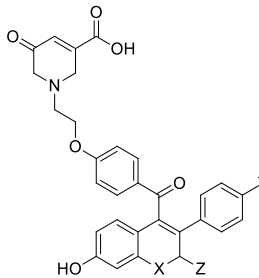
#1483
-1490



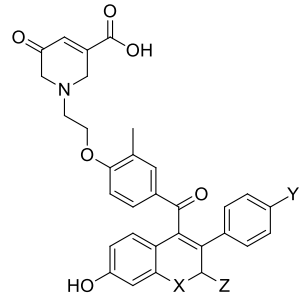
#1491
-1498



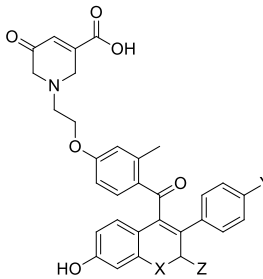
#1499
-1506



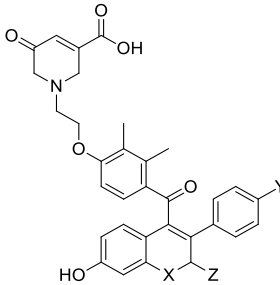
#1507
-1514



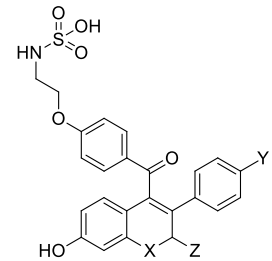
#1515
-1522



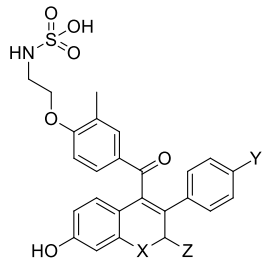
#1523
-1530



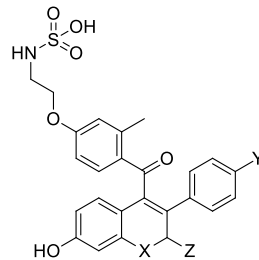
#1531
-1538



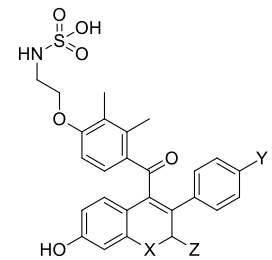
#1539
-1546



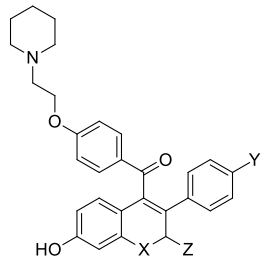
#1547
-1554



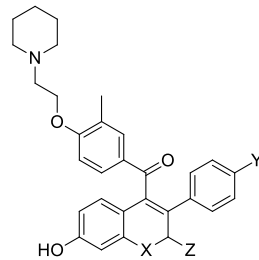
#1555
-1562



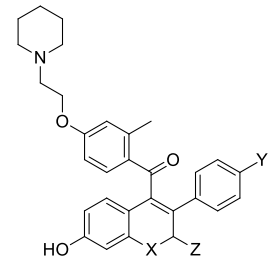
#1563
-1570



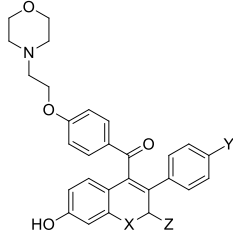
#1571
-1578



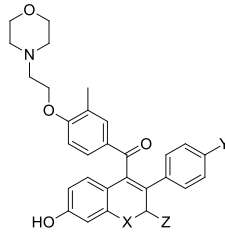
#1579
-1586



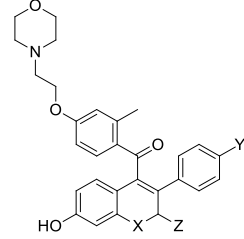
**#1587
-1594**



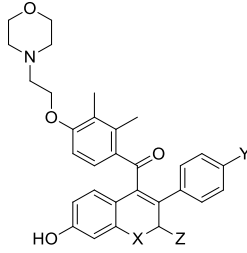
**#1595
-1562**



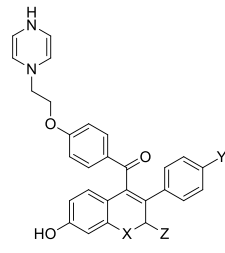
**#1563
-1570**



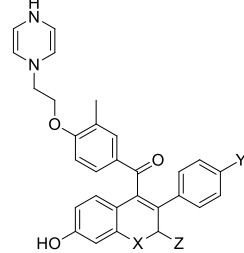
**#1571
-1578**



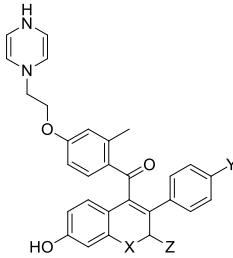
**#1579
-1586**



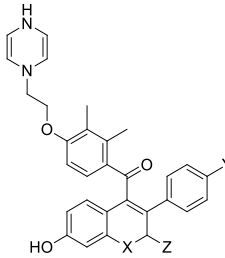
**#1587
-1594**



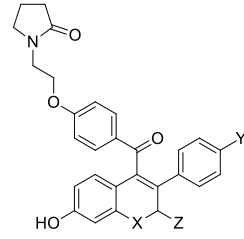
**#1595
-1602**



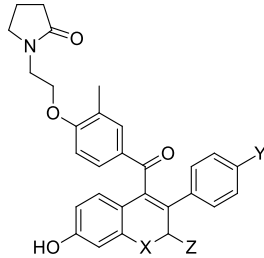
**#1603
-1610**



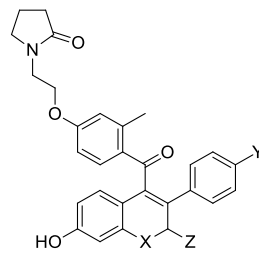
**#1611
-1618**



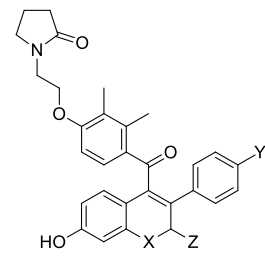
**#1619
-1626**



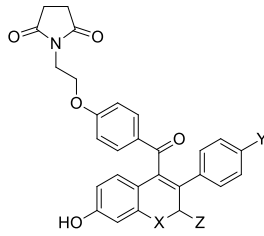
**#1627
-1634**



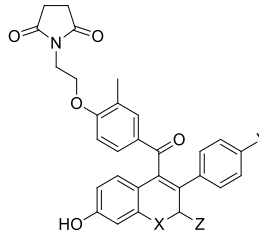
**#1635
-1642**



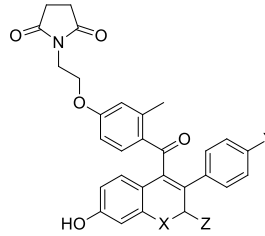
**#1643
-1650**



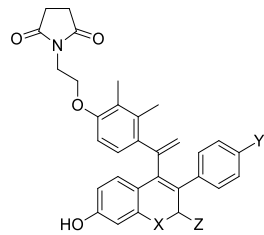
**#1651
-1658**



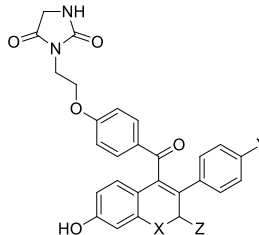
**#1659
-1666**



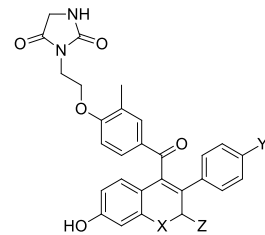
**#1667
-1674**



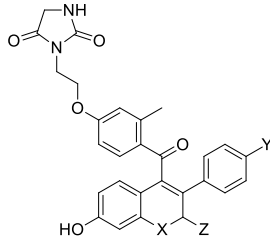
**#1675
-1682**



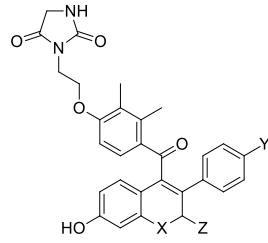
**#1683
-1690**



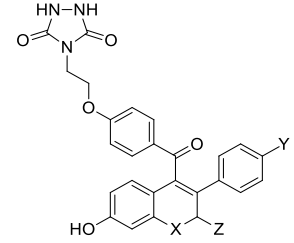
#1691
-1698



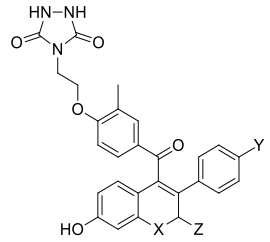
#1699
-1706



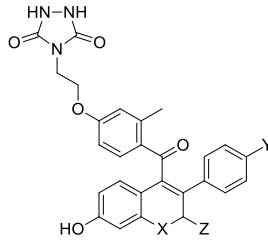
#1707
-1714



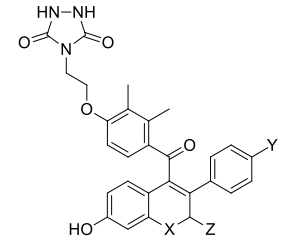
#1715
-1722



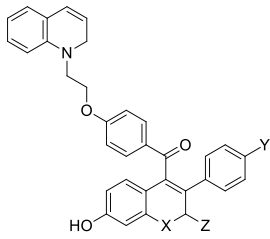
#1723
-1730



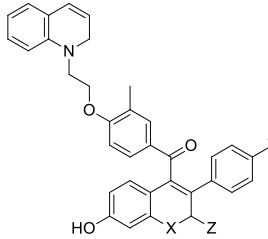
#1731
-1738



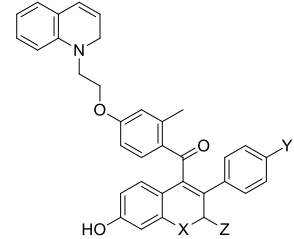
#1739
-1746



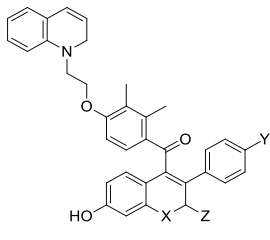
#1747
-1754



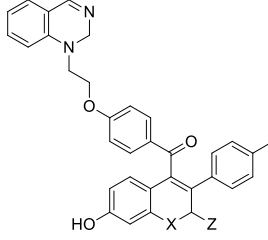
#1755
-1762



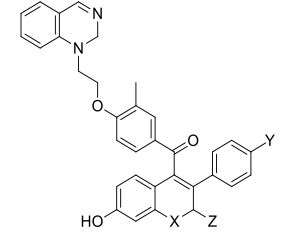
#1763
-1770



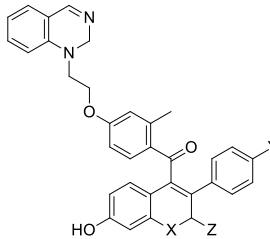
#1771
-1778



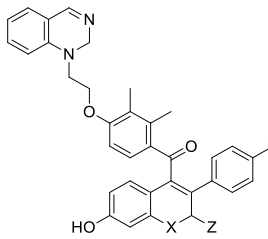
#1779
-1786



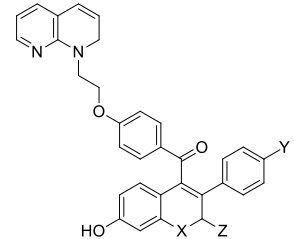
#1787
-1794



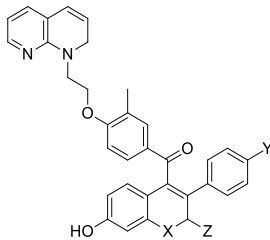
#1795
-1802



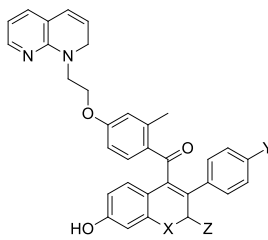
#1803
-1810



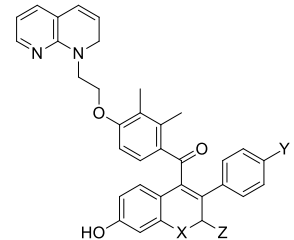
#1811
-1818



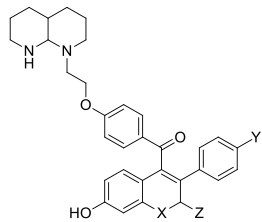
#1819
-1826



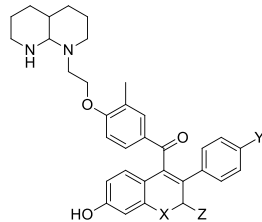
#1827
-1834



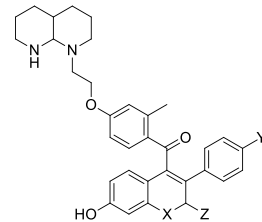
**#1835
-1842**



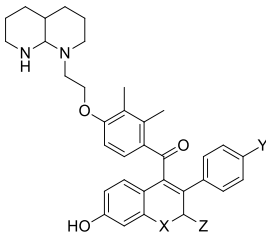
**#1843
-1850**



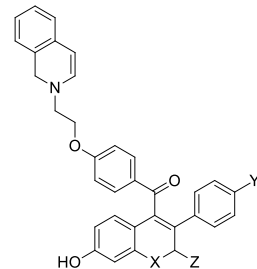
**#1851
-1858**



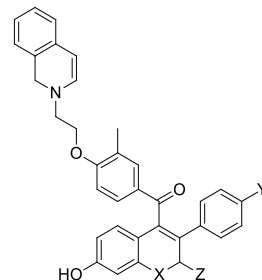
**#1859
-1866**



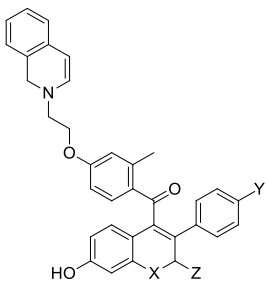
**#1867
-1874**



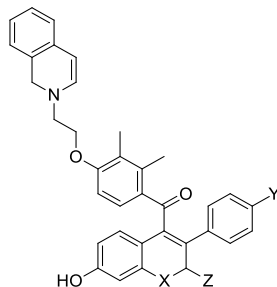
**#1875
-1882**



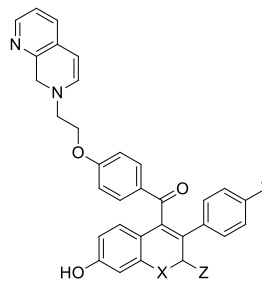
**#1883
-1890**



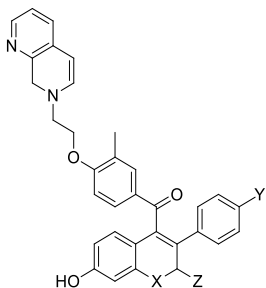
**#1891
-1898**



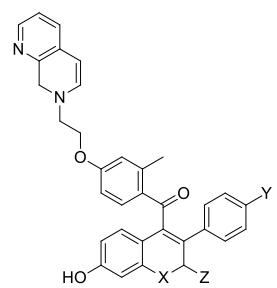
**#1899
-1906**



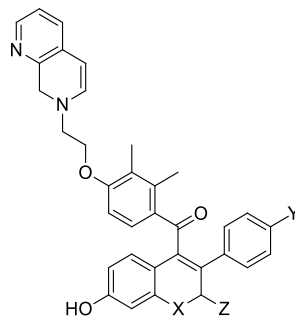
**#1907
-1914**



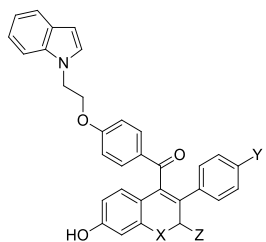
**#1915
-1922**



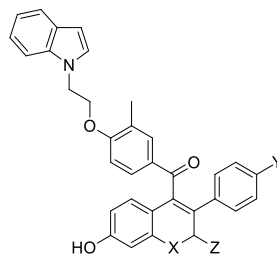
**#1923
-1930**



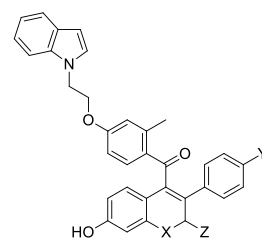
**#1931
-1938**



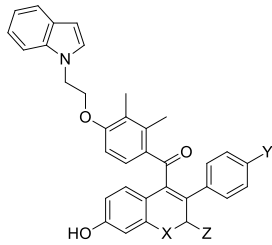
**#1939
-1946**



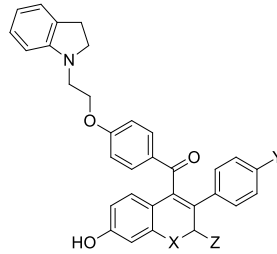
**#1947
-1954**



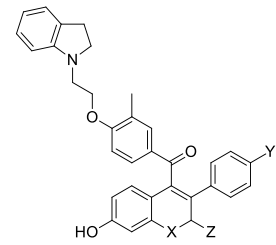
**#1955
-1962**



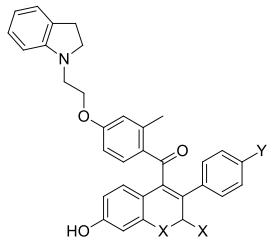
**#1963
-1970**



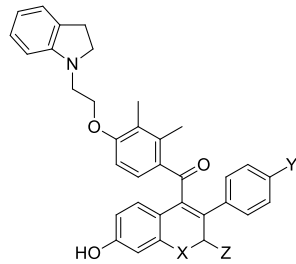
**#1971
-1978**



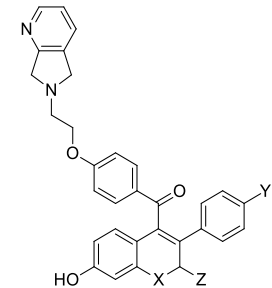
**#1979
-1986**



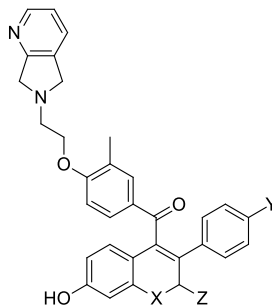
**#1987
-1994**



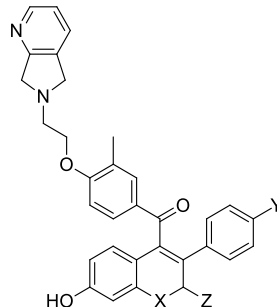
**#1995
-2002**



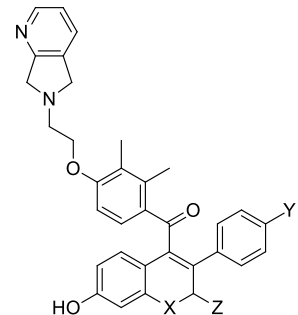
**#2003
-2006**



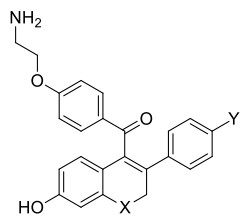
**#2007
-2010**



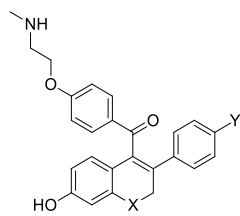
**#2011
-2014**



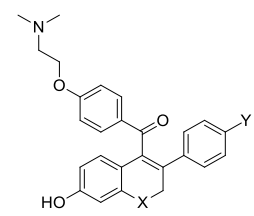
**#2015
-2018**



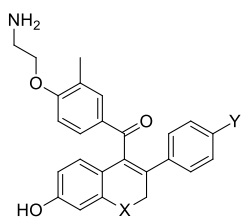
**#2019
-2022**



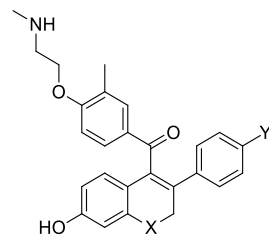
**#2023
-2026**



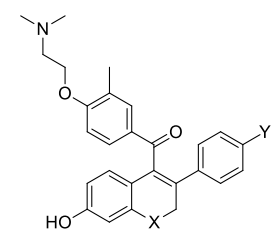
**#2027
-2030**



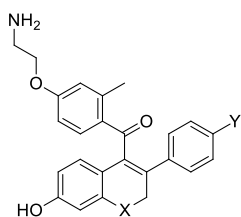
**#2031
-2034**



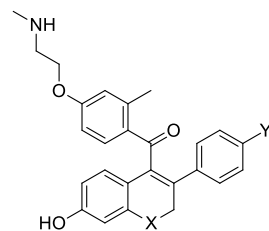
**#2035
-2038**



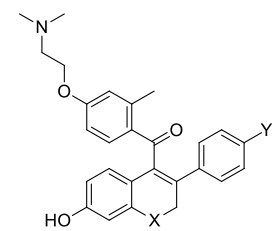
**#2039
-2042**



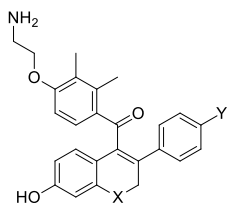
**#2043
-2046**



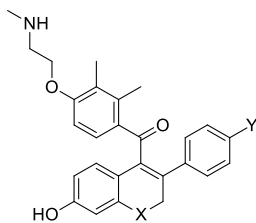
**#2047
-2050**



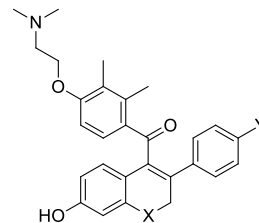
**#2051
-2054**



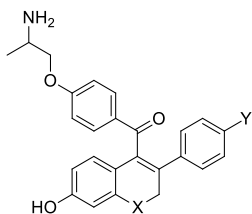
**#2055
-2058**



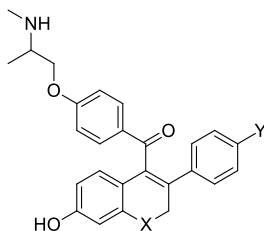
**#2059
-2062**



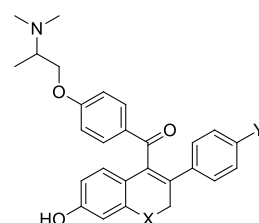
**#2063
-2066**



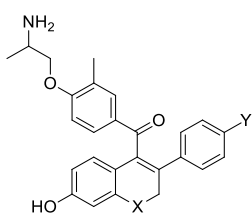
**#2067
-2070**



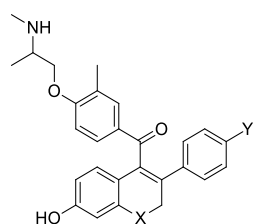
**#2071
-2072**



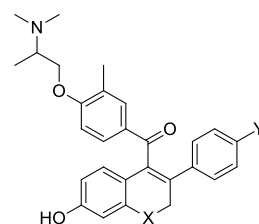
**#2073
-2076**



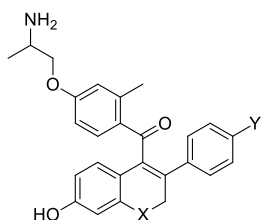
**#2077
-2080**



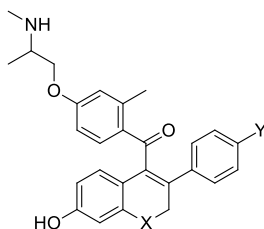
**#2081
-2088**



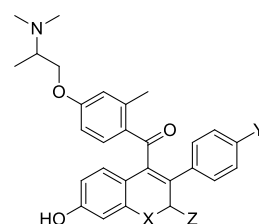
**#2089
-2096**



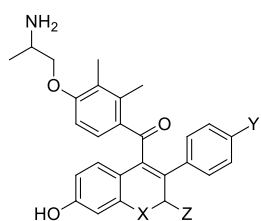
**#2097
-2104**



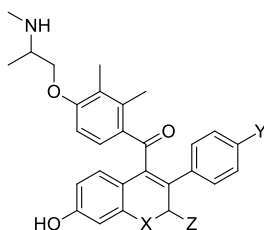
**#2105
-2108**



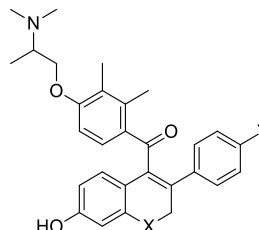
**#2109
-2112**



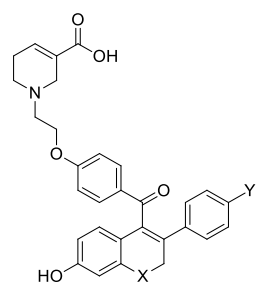
**#2113
-2116**



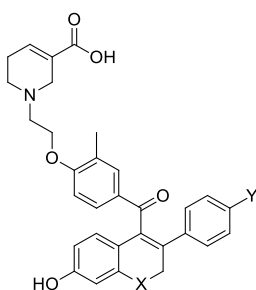
**#2117
-2120**



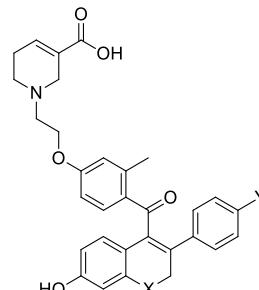
**#2121
-2124**



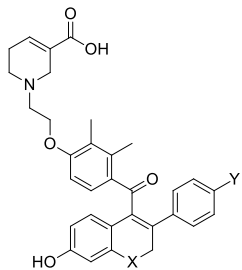
**#2125
-2128**



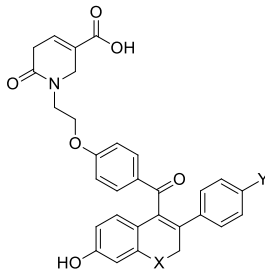
**#2129
-2132**



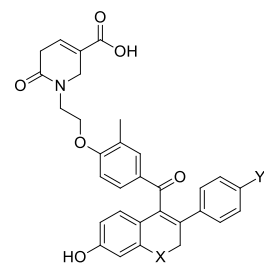
#2133
-2136



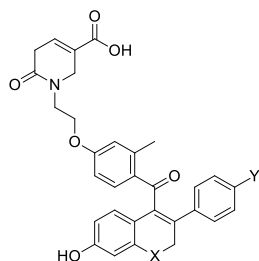
#2137
-2140



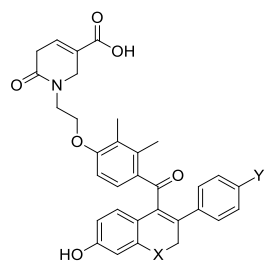
#2141
-2144



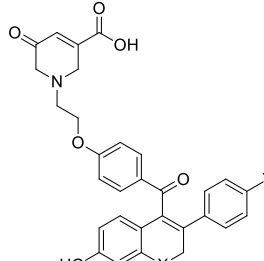
#2145
-2152



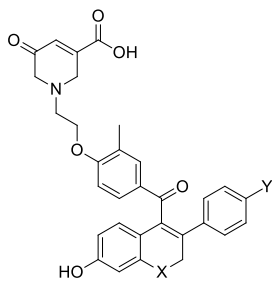
#2153
-2156



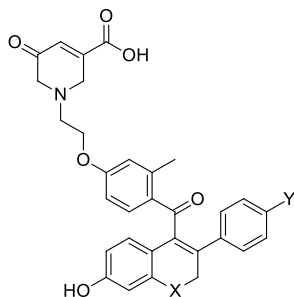
#2157
-2160



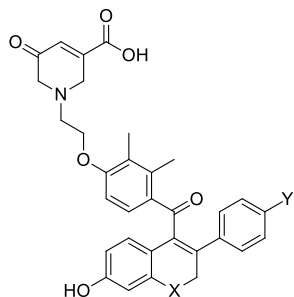
#2161
-2164



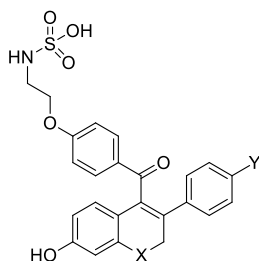
#2165
-2168



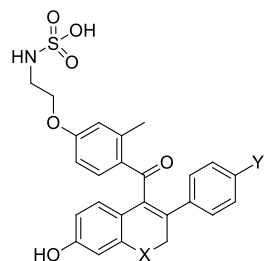
#2169
-2172



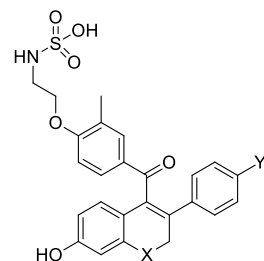
#2173
-2176



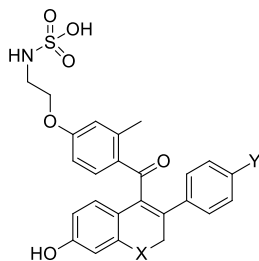
#2177
-2180



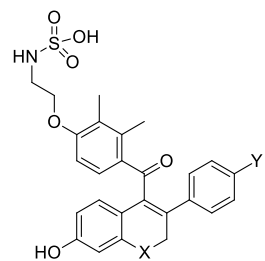
#2181
-2184



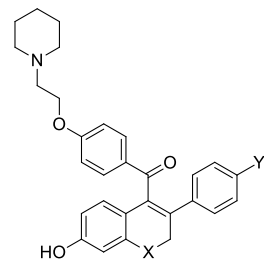
#2185
-2188



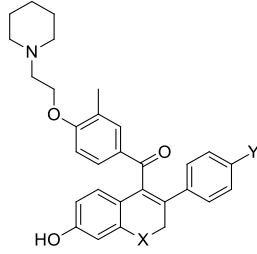
#2189
-2192



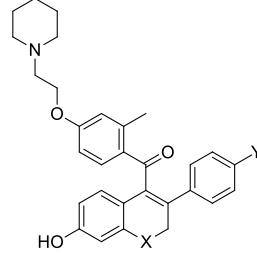
#2193
-2196



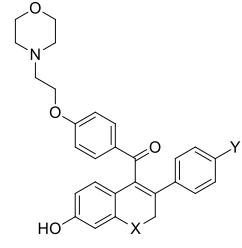
**#2197
-2200**



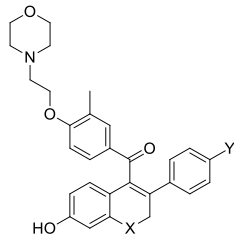
**#2201
-2204**



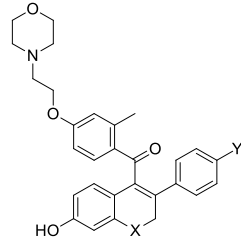
**#2205
-2208**



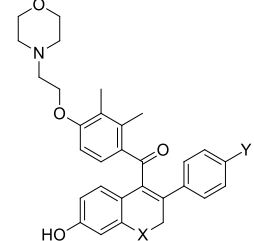
**#2209
-2212**



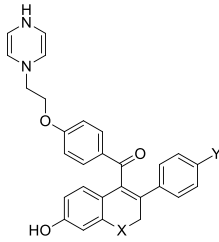
**#2213
-2216**



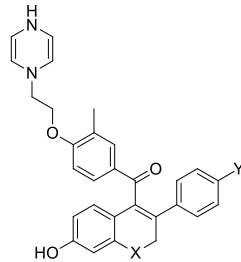
**#2217
-2220**



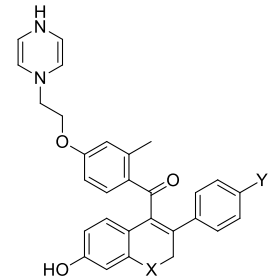
**#2221
-2224**



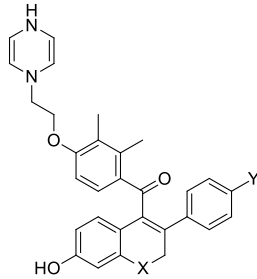
**#2225
-2228**



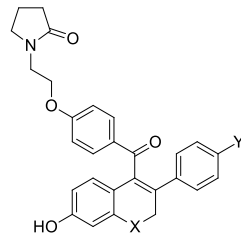
**#2229
-2232**



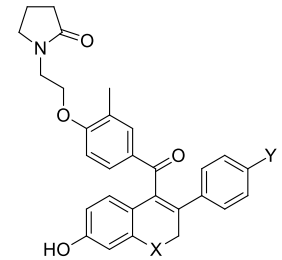
**#2233
-2236**



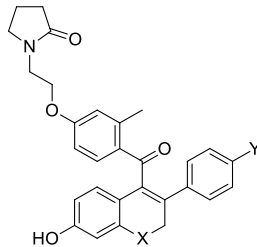
**#2237
-2240**



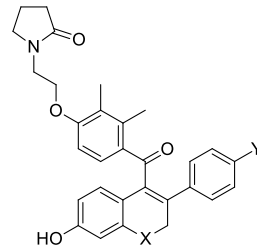
**#2241
-2244**



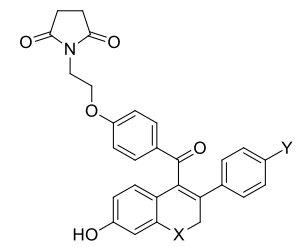
**#2245
-2248**



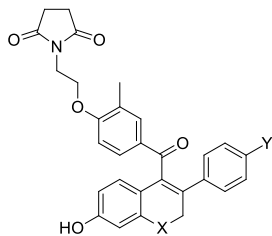
**#2249
-2252**



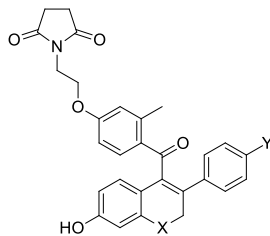
**#2253
-2256**



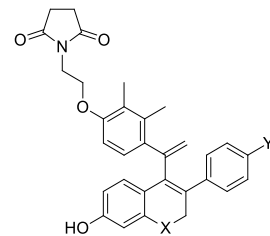
#2257
-2260



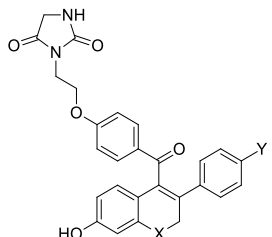
#2261
-2264



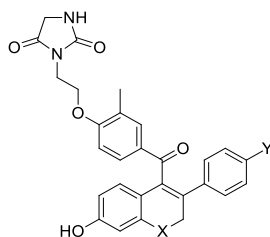
#2265
-2268



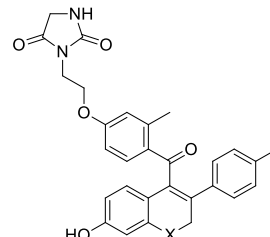
#2269
-2272



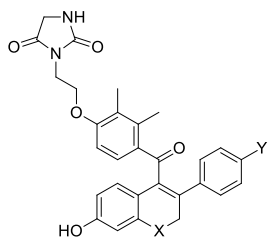
#2273
-2276



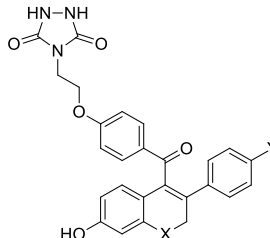
#2277
-2280



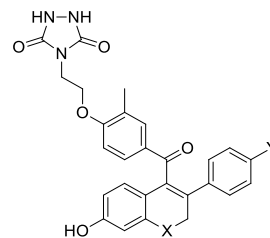
#2281
-2284



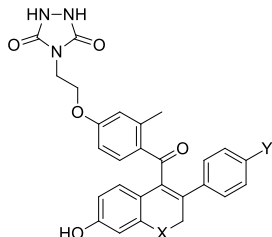
#2285
-2288



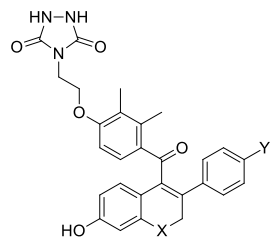
#2289
-2292



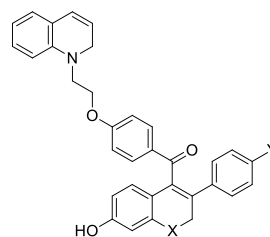
#2293
-2296



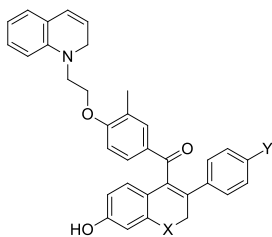
#2297
-2300



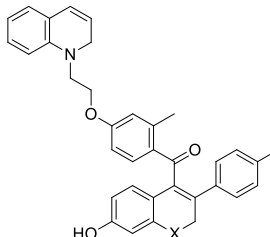
#2301
-2304



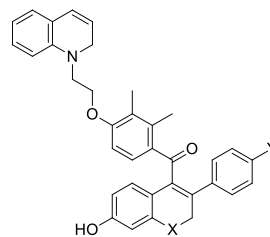
#2305
-2312



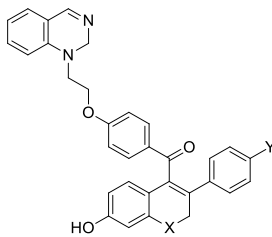
#2313
-2320



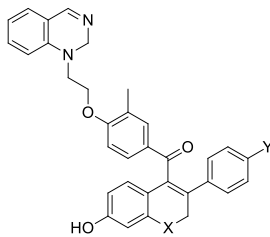
#2321
-2328



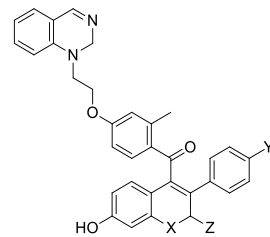
#2329
-2332



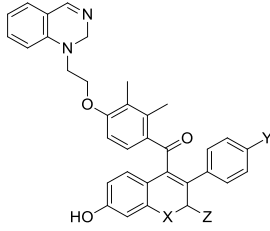
#2333
-2336



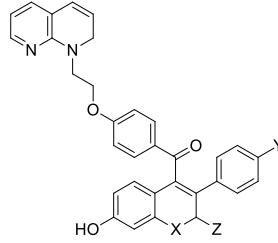
#2337
-2340



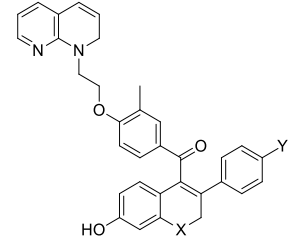
#2341
-2344



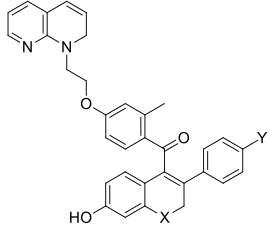
#2345
-2348



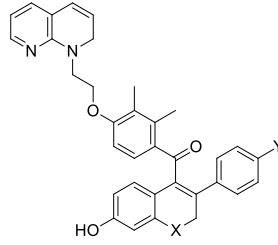
#2349
-2352



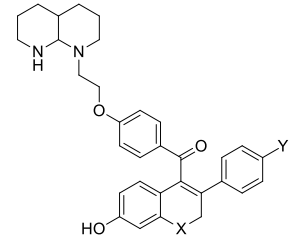
#2353
-2356



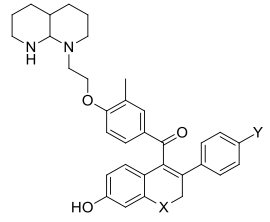
#2357
-2360



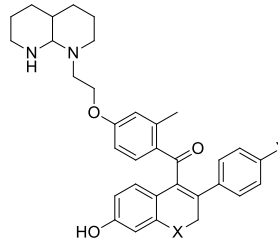
#2361
-2364



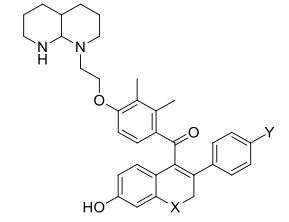
#2365
-2368



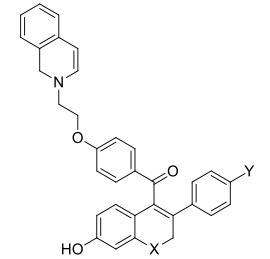
#2369
-2372



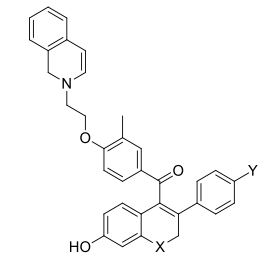
#2373
-2376



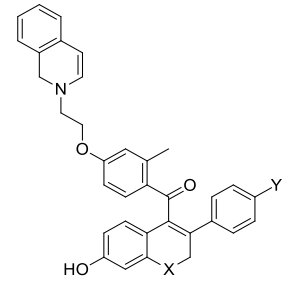
#2377
-2380



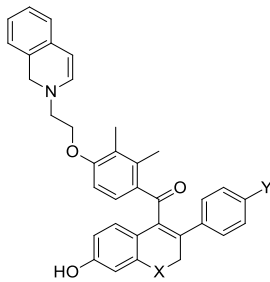
#2381
-2384



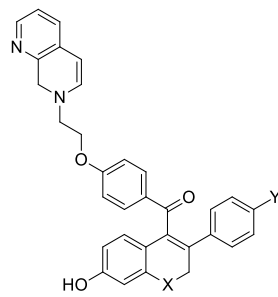
#2385
-2388



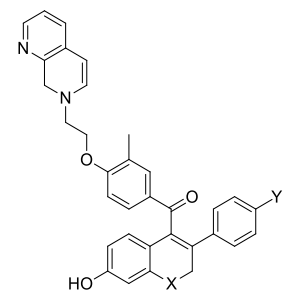
#2389
-2392



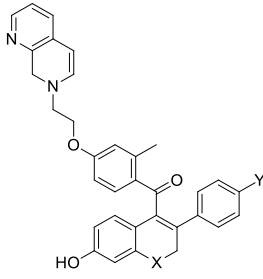
#2393
-2396



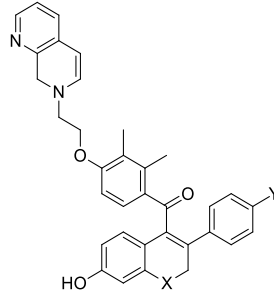
#2397
-2400



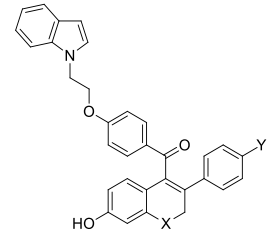
#2401
-2404



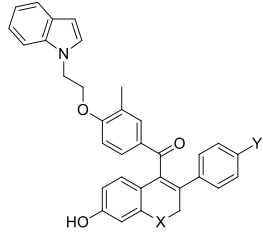
#2405
-2408



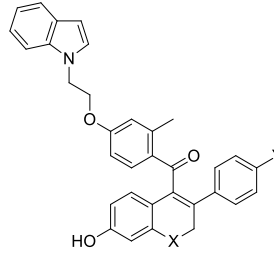
#2409
-2412



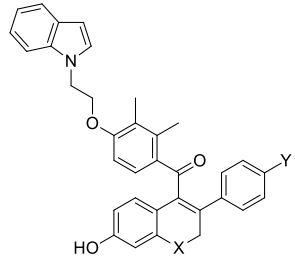
#2413
-2416



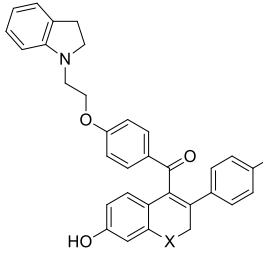
#2417
-2420



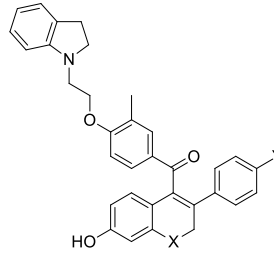
#2421
-2424



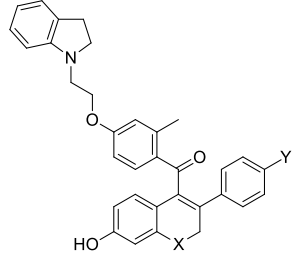
#2425
-2428



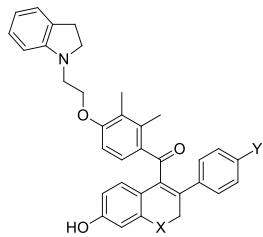
#2429
-2432



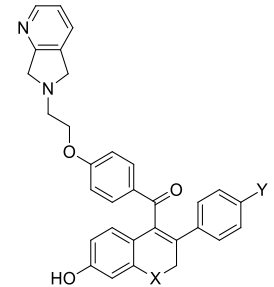
#2433
-2436



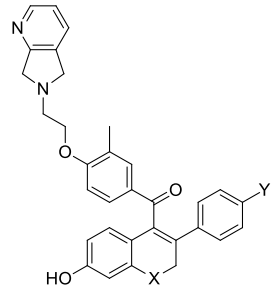
#2437
-2438



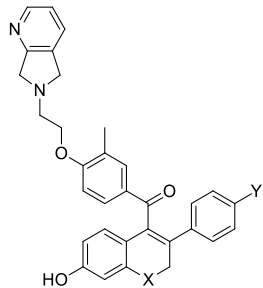
#2439
-2440



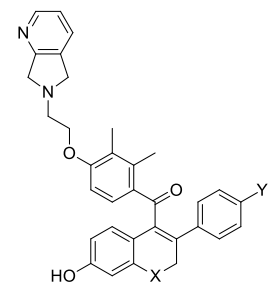
#2441
-2442



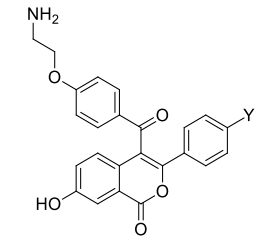
#2443
-2444



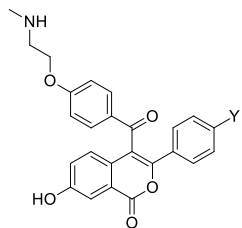
#2445
-2446



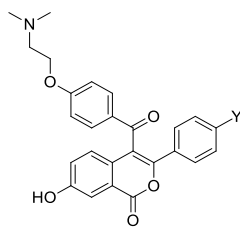
#2447
-2448



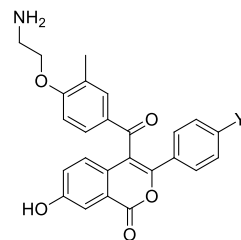
**#2449
-2450**



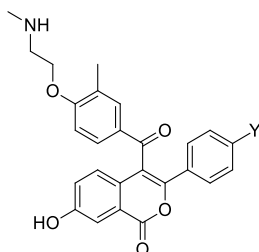
**#2451
-2452**



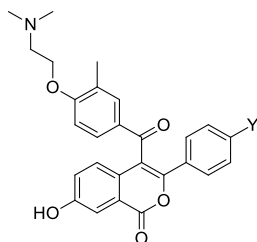
**#2453
-2454**



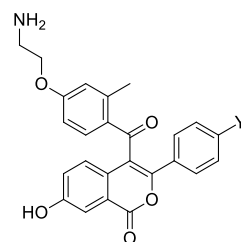
**#2455
-2456**



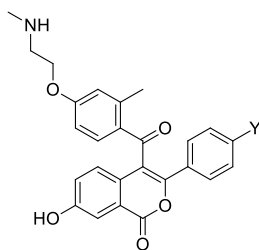
**#2457
-2458**



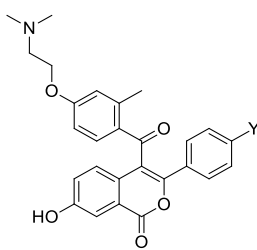
**#2459
-2460**



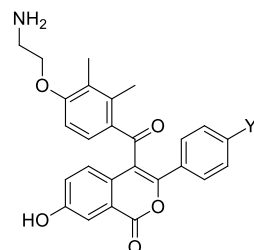
**#2461
-2462**



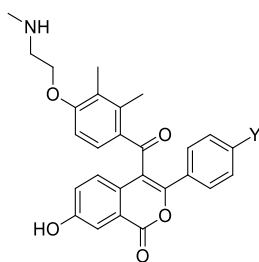
**#2463
-2464**



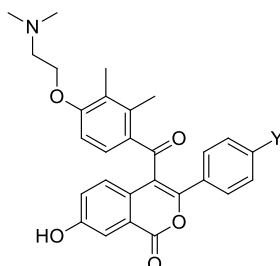
**#2465
-2466**



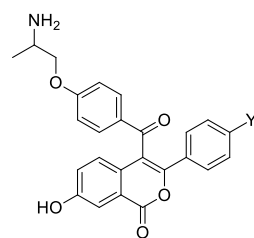
**#2467
-2468**



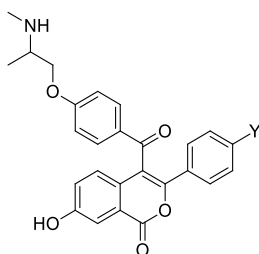
**#2469
-2470**



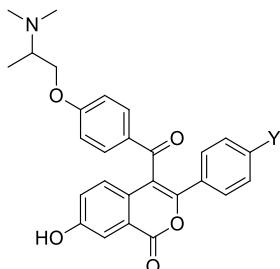
**#2471
-2472**



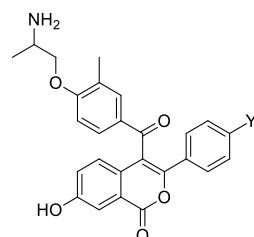
**#2473
-2474**



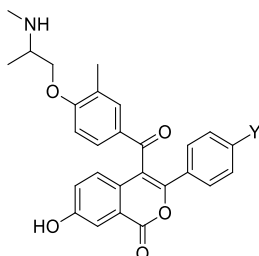
**#2475
-2476**



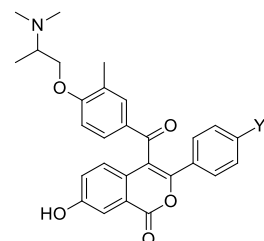
**#2477
-2478**



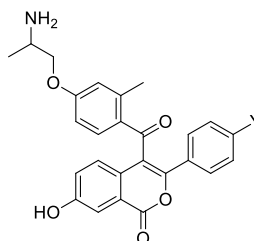
**#2479
-2480**



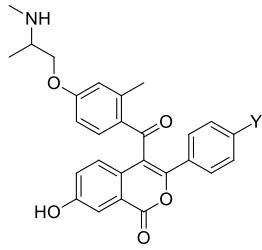
**#2481
-2482**



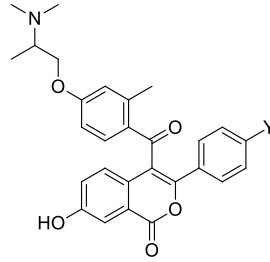
**#2483
-2484**



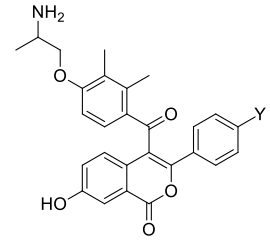
#2485
-2486



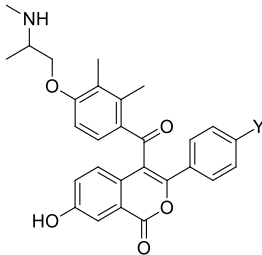
#2487
-2488



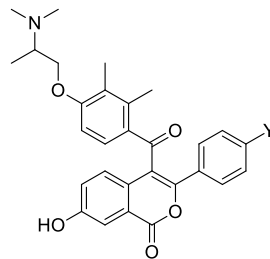
#2489
-2490



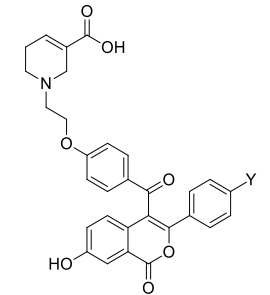
#2491
-2492



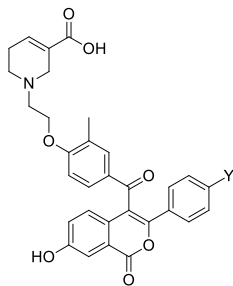
#2493
-2494



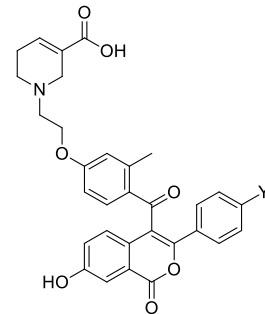
#2495
-2496



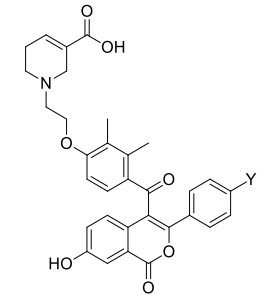
#2497
-2498



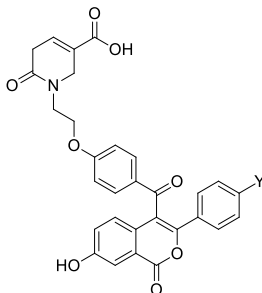
#2499
-2500



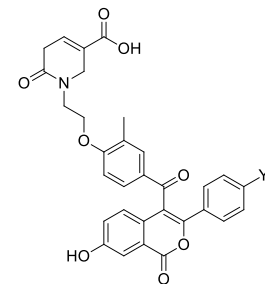
#2501
-2502



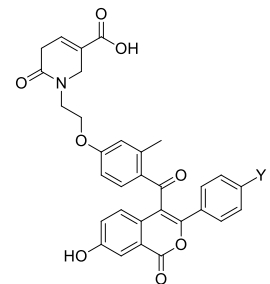
#2503
-2504



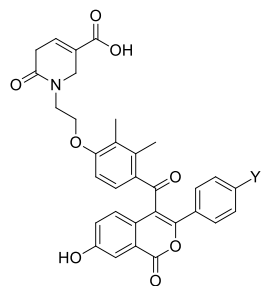
#2505
-2506



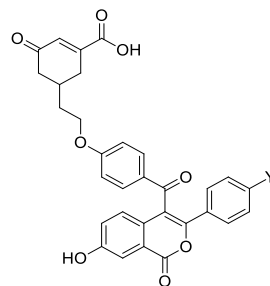
#2507
-2508



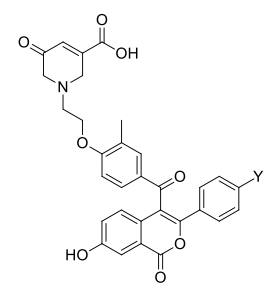
#2509
-2510



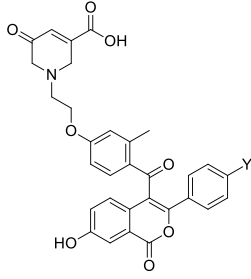
#2511
-2512



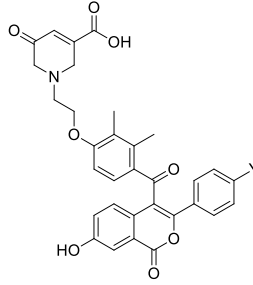
#2513
-2514



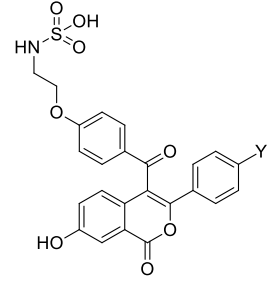
#2515
-2516



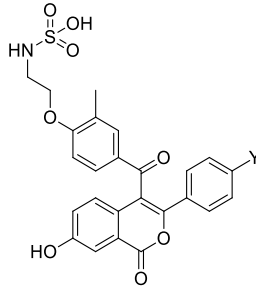
#2517
-2518



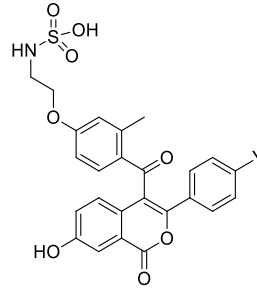
#2519
-2520



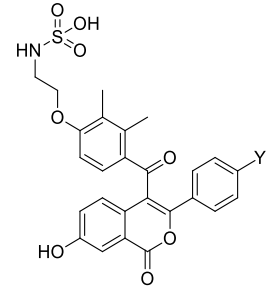
#2521
-2522



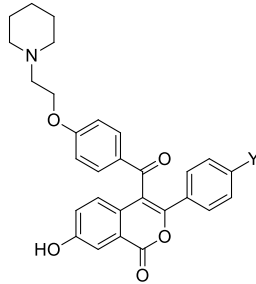
#2523
-2524



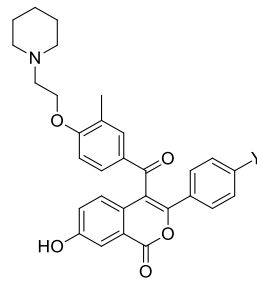
#2525
-2526



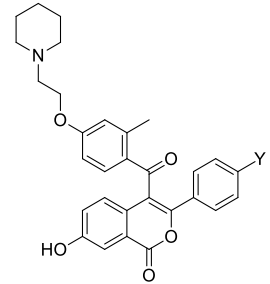
#2527
-2528



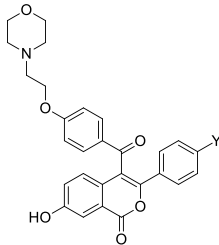
#2529
-2530



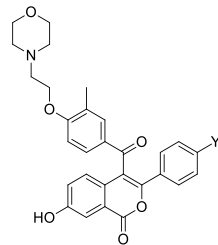
#2531
-2532



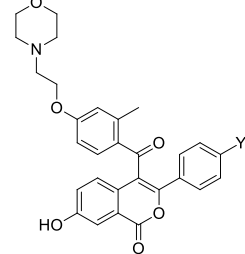
#2533
-2534



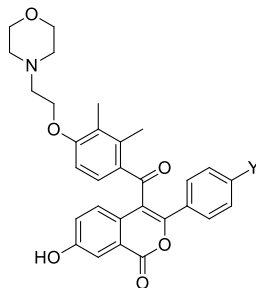
#2535
-2536



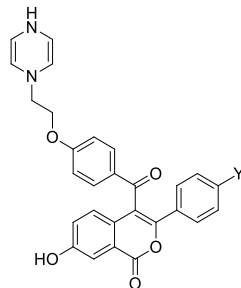
#2537
-2538



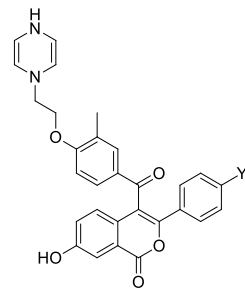
#2539
-2540



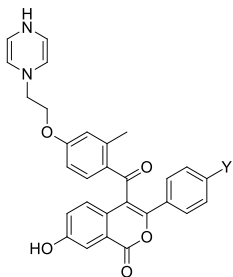
#2541
-2542



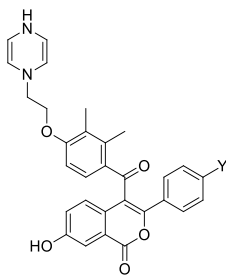
#2543
-2544



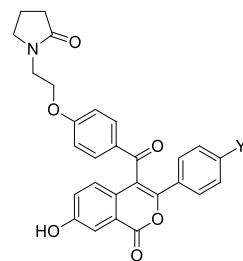
#2545
-2546



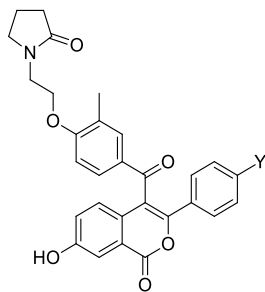
#2547
-2548



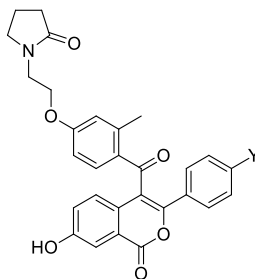
#2549
-2550



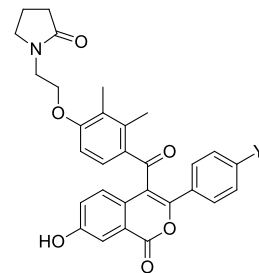
#2551
-2552



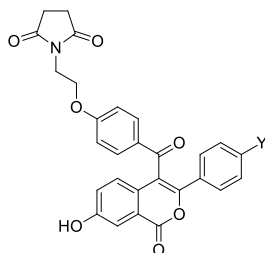
#2553
-2554



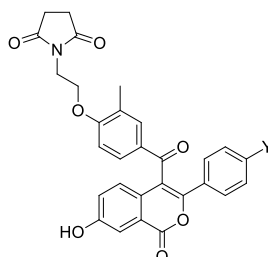
#2555
-2556



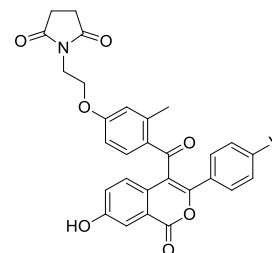
#2557
-2558



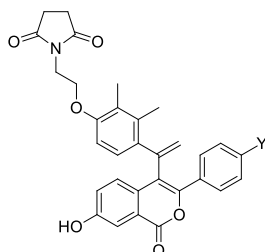
#2559
-2560



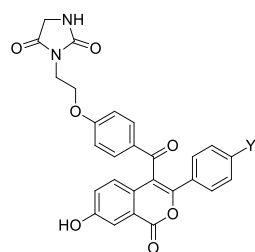
#2561
-2562



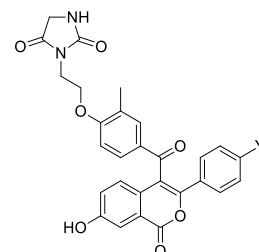
#2563
-2564



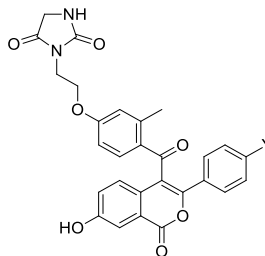
#2565
-2566



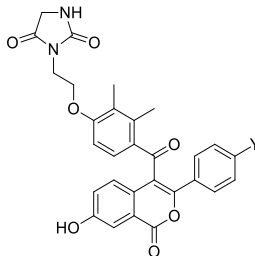
#2567
-2568



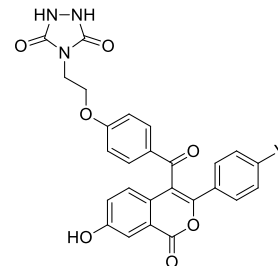
#2569
-2570



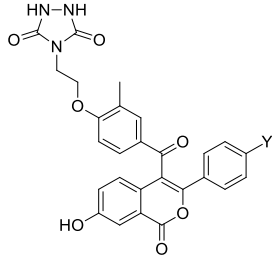
#2571
-2572



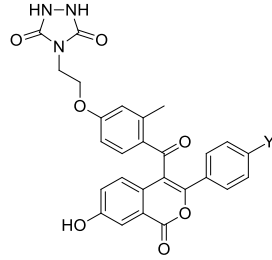
#2573
-2574



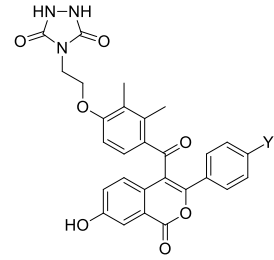
#2575
-2576



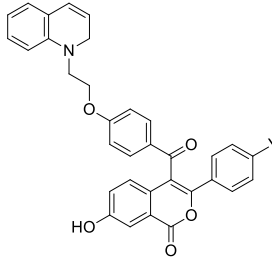
#2577
-2578



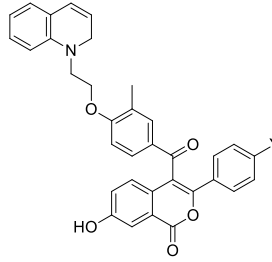
#2579
-2580



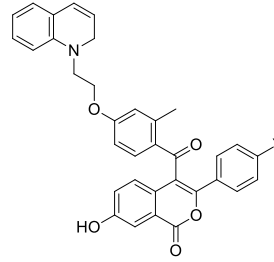
#2581
-2582



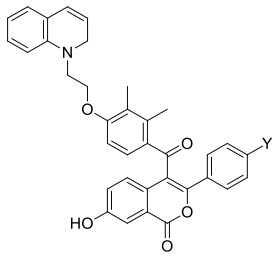
#2583
-2584



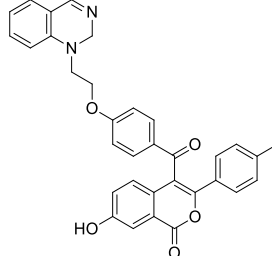
#2585
-2586



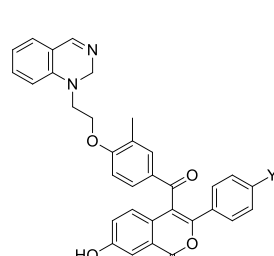
#2587
-2588



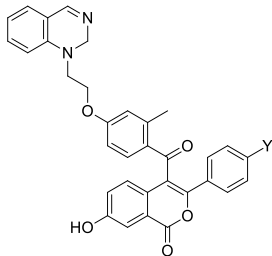
#2589
-2590



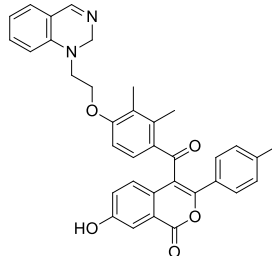
#2591
-2592



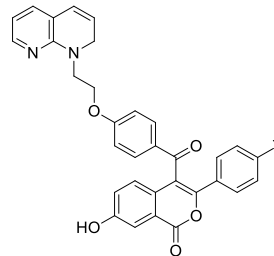
#2593
-2594



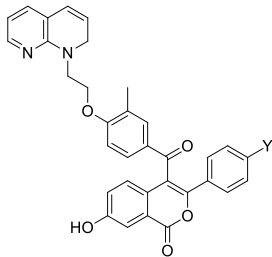
#2595
-2596



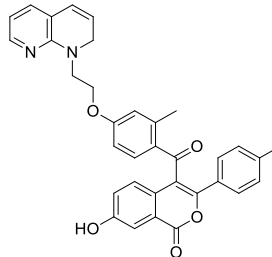
#2597
-2598



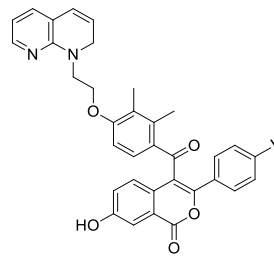
#2599
-2600



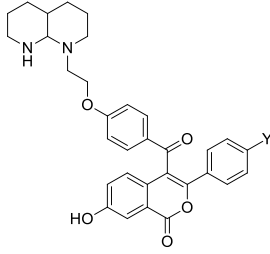
#2601
-2602



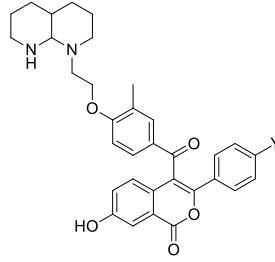
#2603
-2604



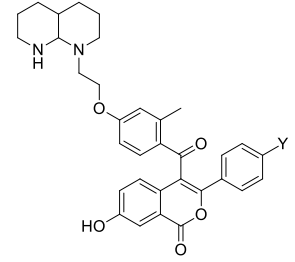
#2605
-2606



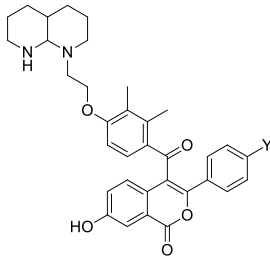
#2607
-2608



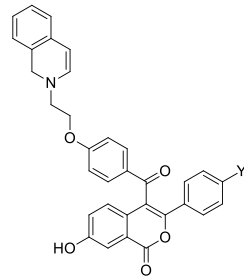
#2609
-2610



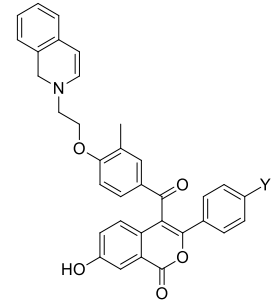
#2611
-2612



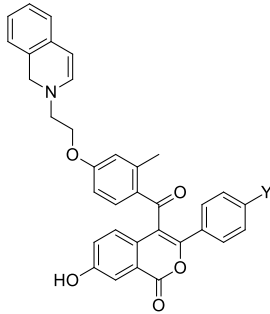
#2613
-2614



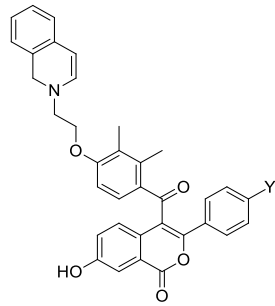
#2615
-2616



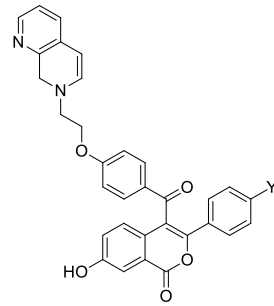
#2617
-2618



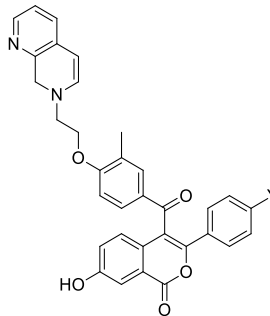
#2619
-2620



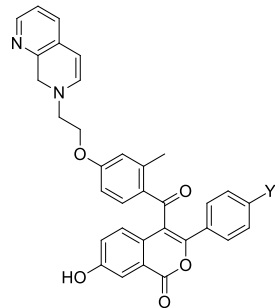
#2621
-2622



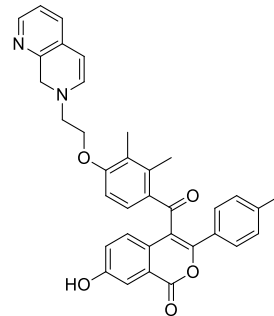
#2623
-2624



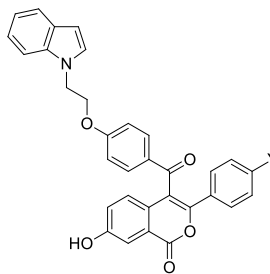
#2625
-2626



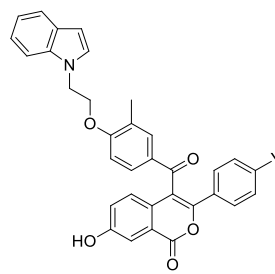
#2627
-2628



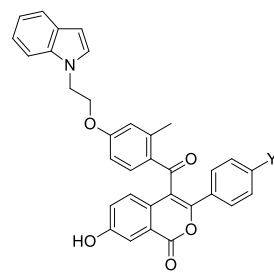
#2629
-2630



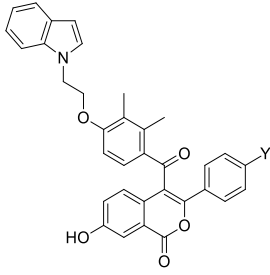
#2631
-2632



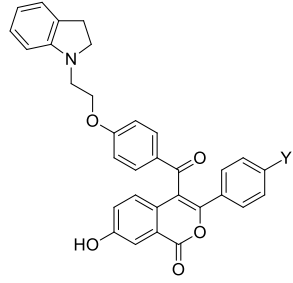
#2633
-2634



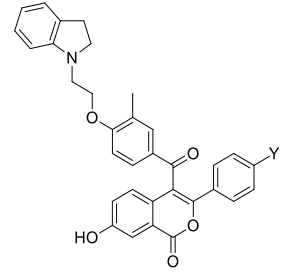
#2635
-2636



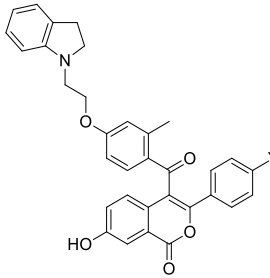
#2637
-2638



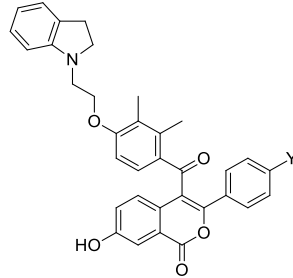
#2639
-2640



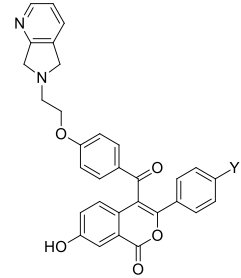
#2641
-2648



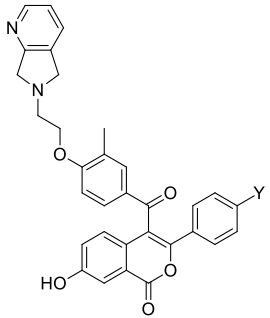
#2649
-2656



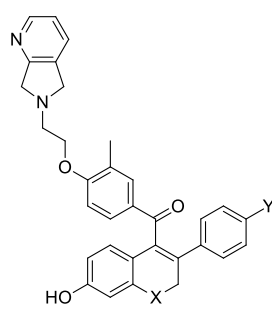
#2657
-2664



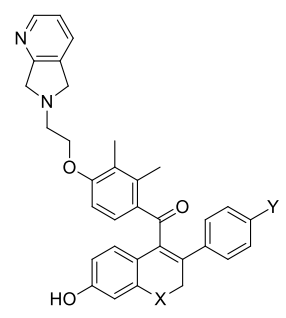
#2665
-2672



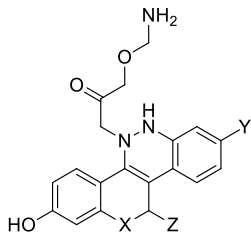
#2673
-2680



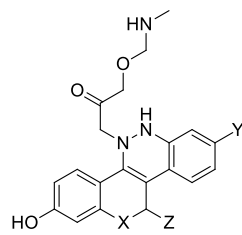
#2681
-2688



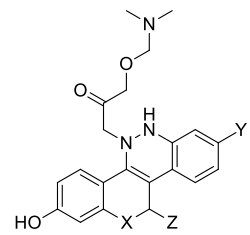
#2689
-2696



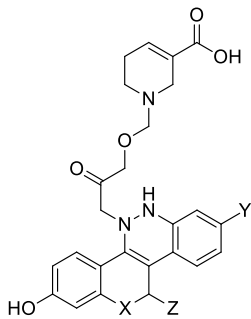
#2697
-2704



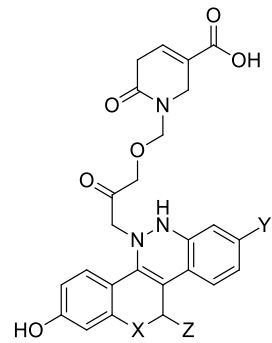
#2705
-2712



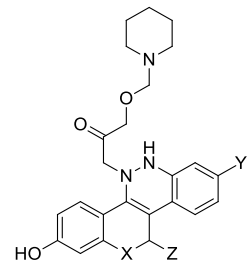
#2713
-2720



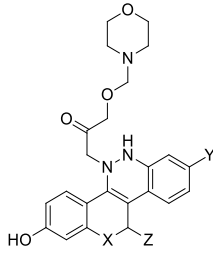
#2721
-2728



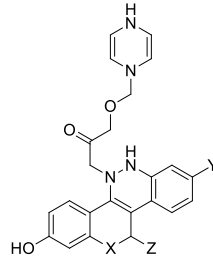
#2729
-2736



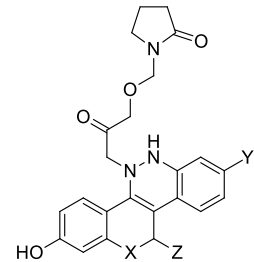
#2737
-2744



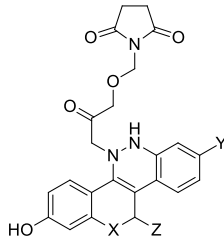
#2745
-2752



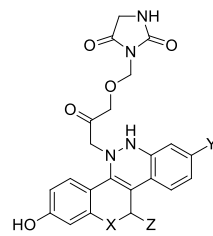
#2753
-2760



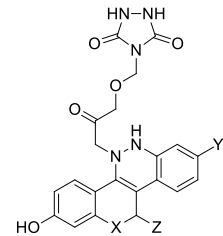
#2761
-2768



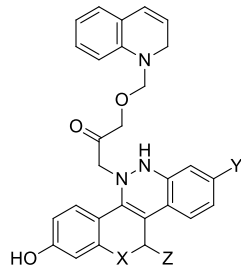
#2769
-2776



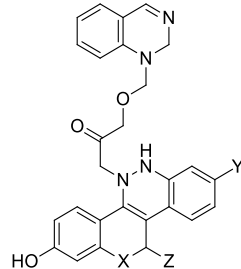
#2777
-2784



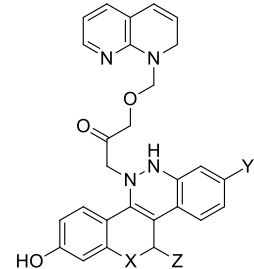
#2785
-2792



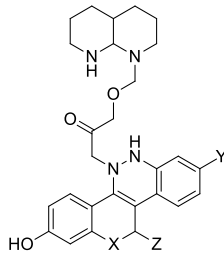
#2793
-2800



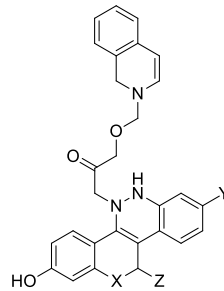
#2801
-2808



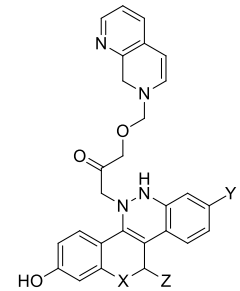
#2809
-2812



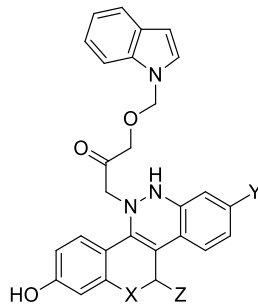
#2813
-2816



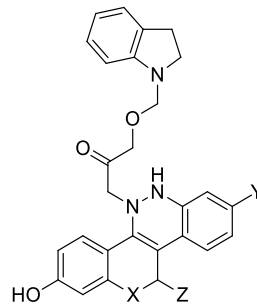
#2817
-2820



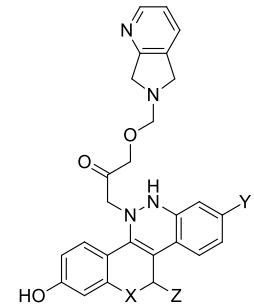
#2821
-2824



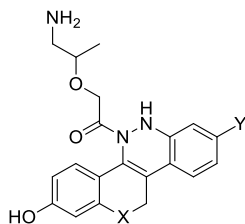
#2825
-2828



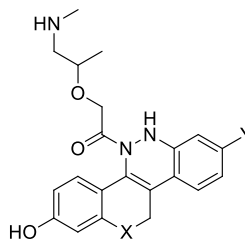
#2829
-2832



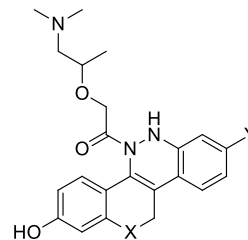
#2833
-2836



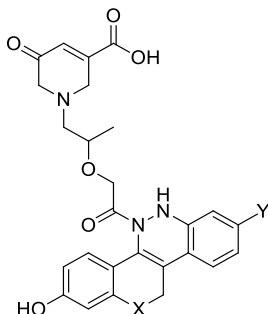
#2837
-2840



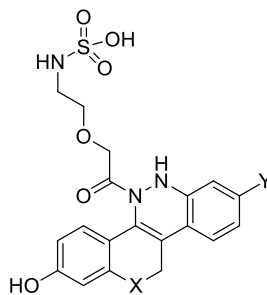
#2841
-2844



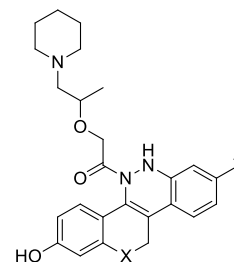
#2845
-2848



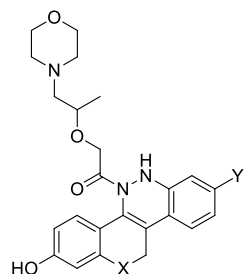
#2849
-2852



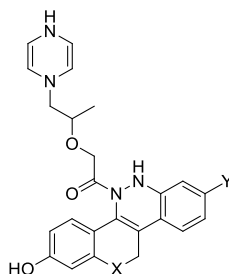
#2853
-2856



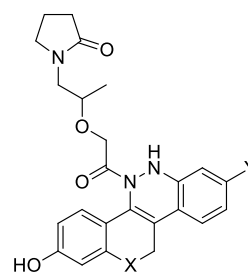
#2857
-2860



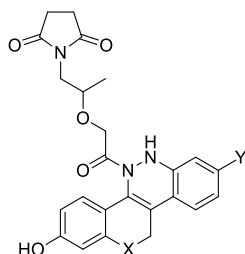
#2861
-2864



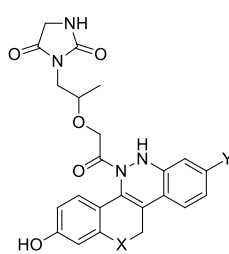
#2865
-2868



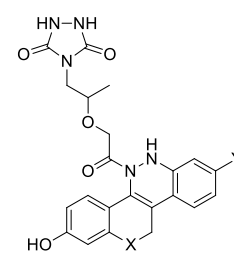
#2869
-2872



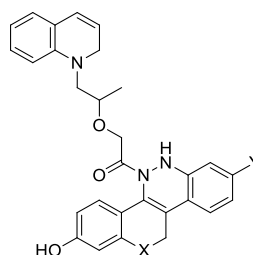
#2873
-2876



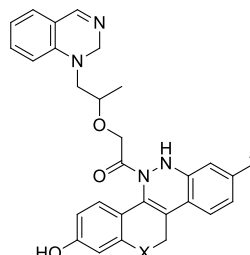
#2877
-2880



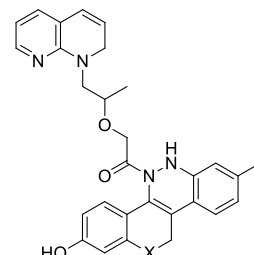
#2881
-2884



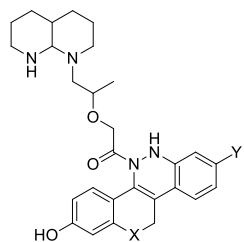
#2885
-2888



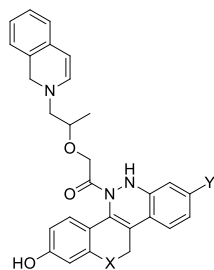
#2889
-2892



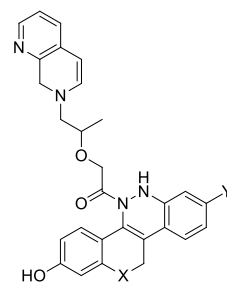
#2893
-2896



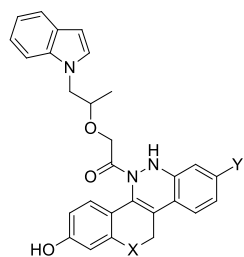
#2897
-3000



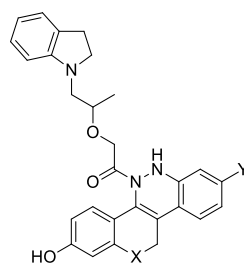
#3001
-3004



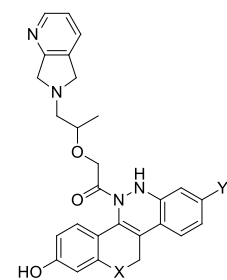
#3005
-3008

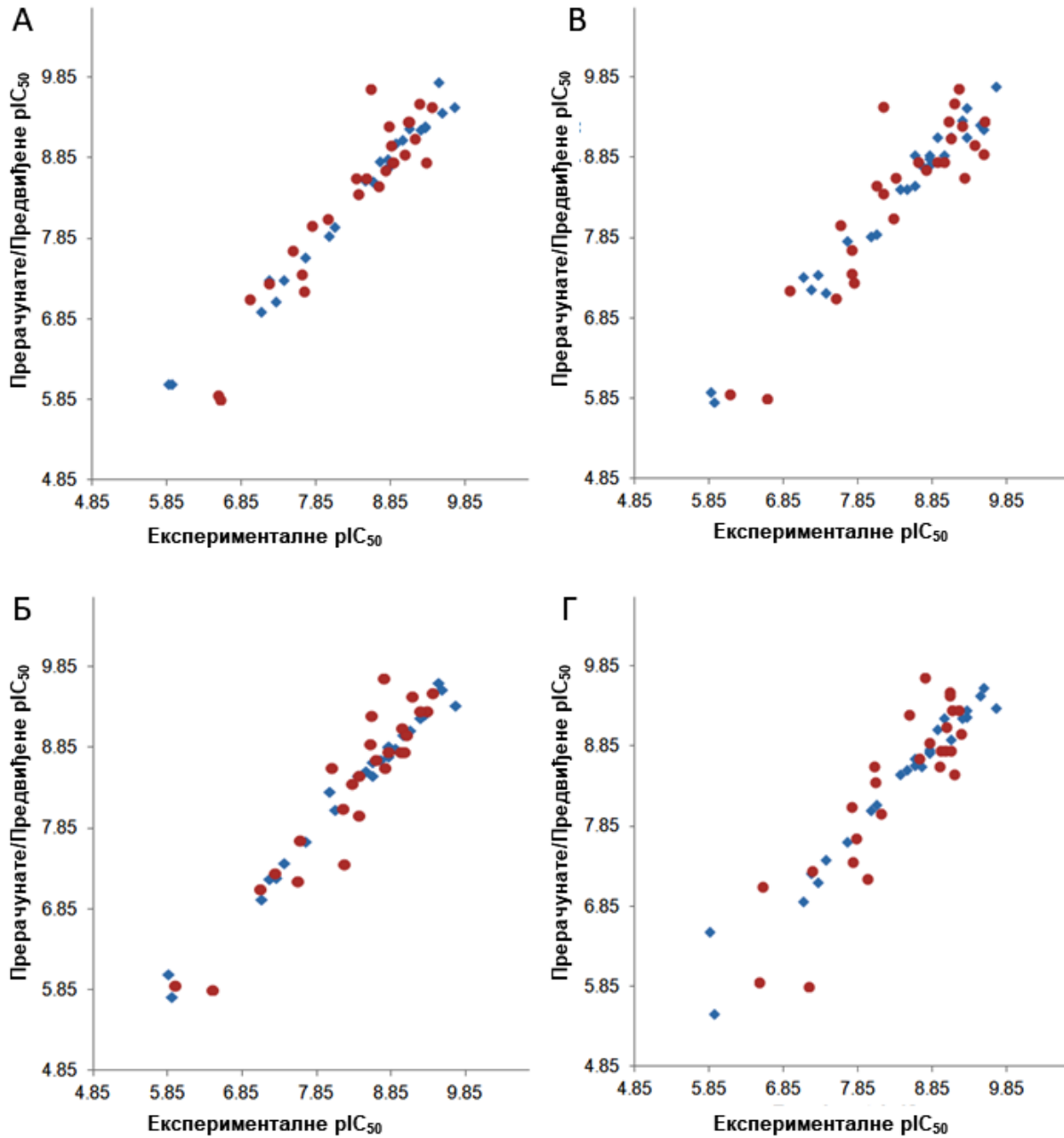


#3009
-3012

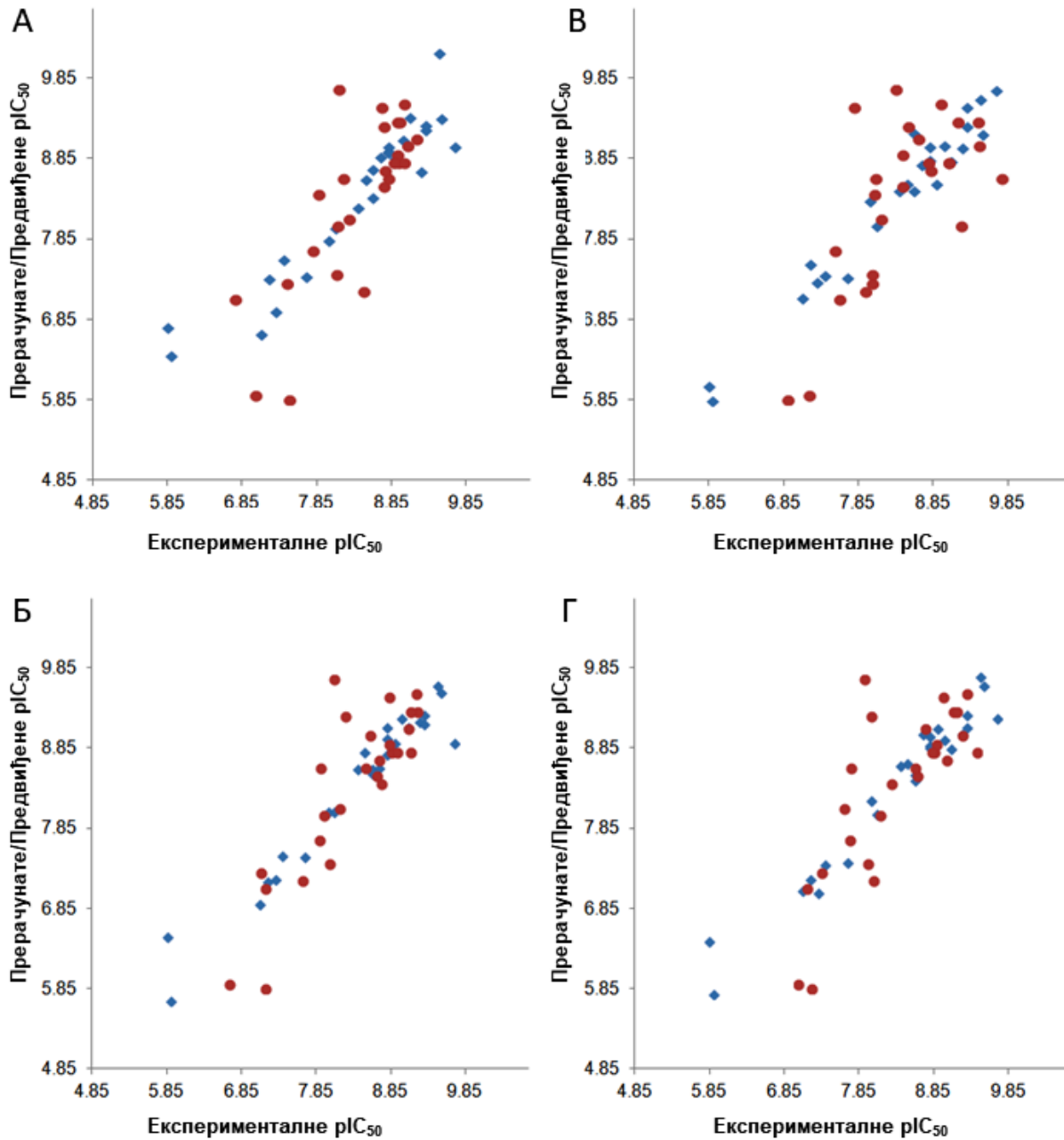


#3013
-3016

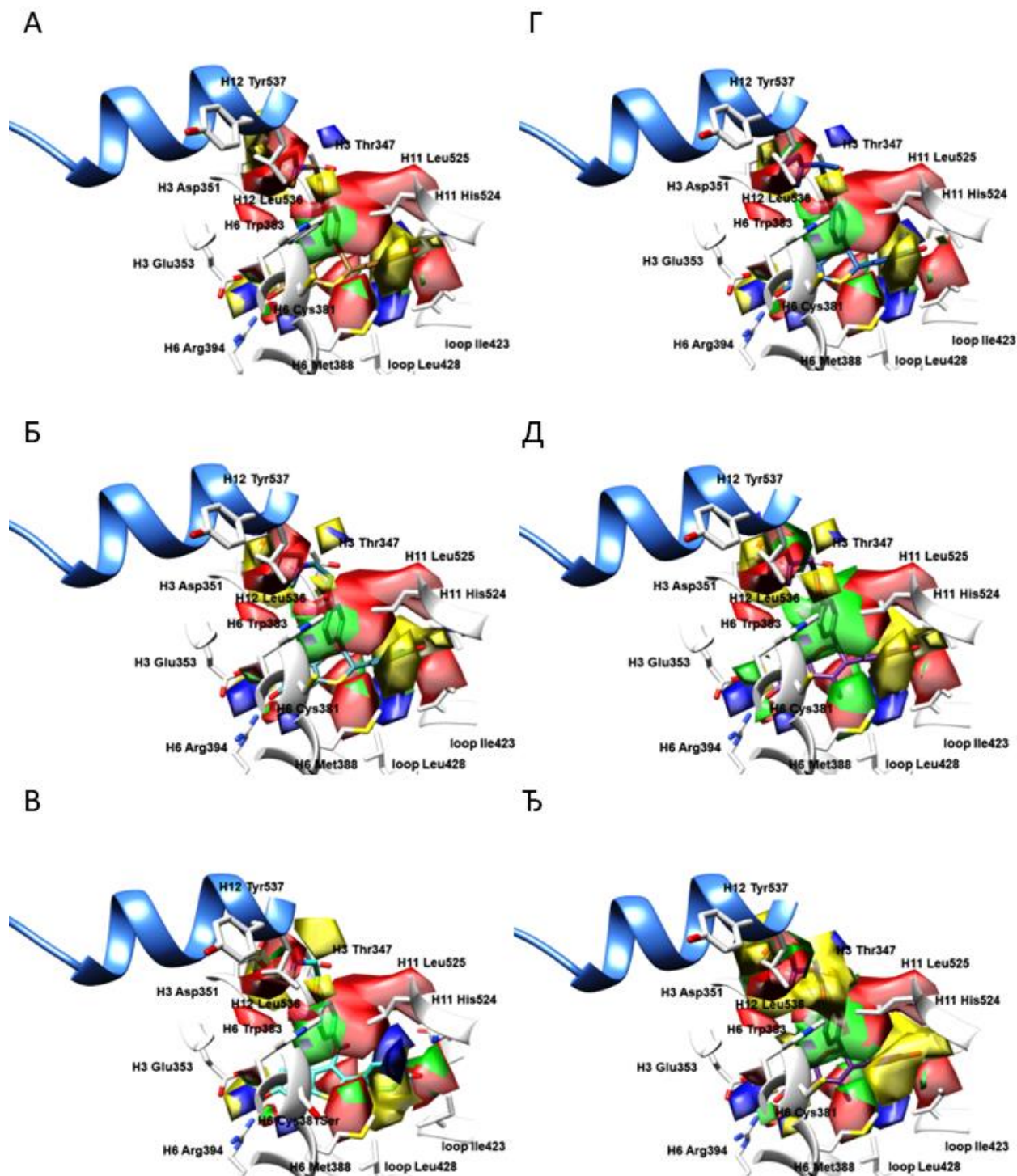




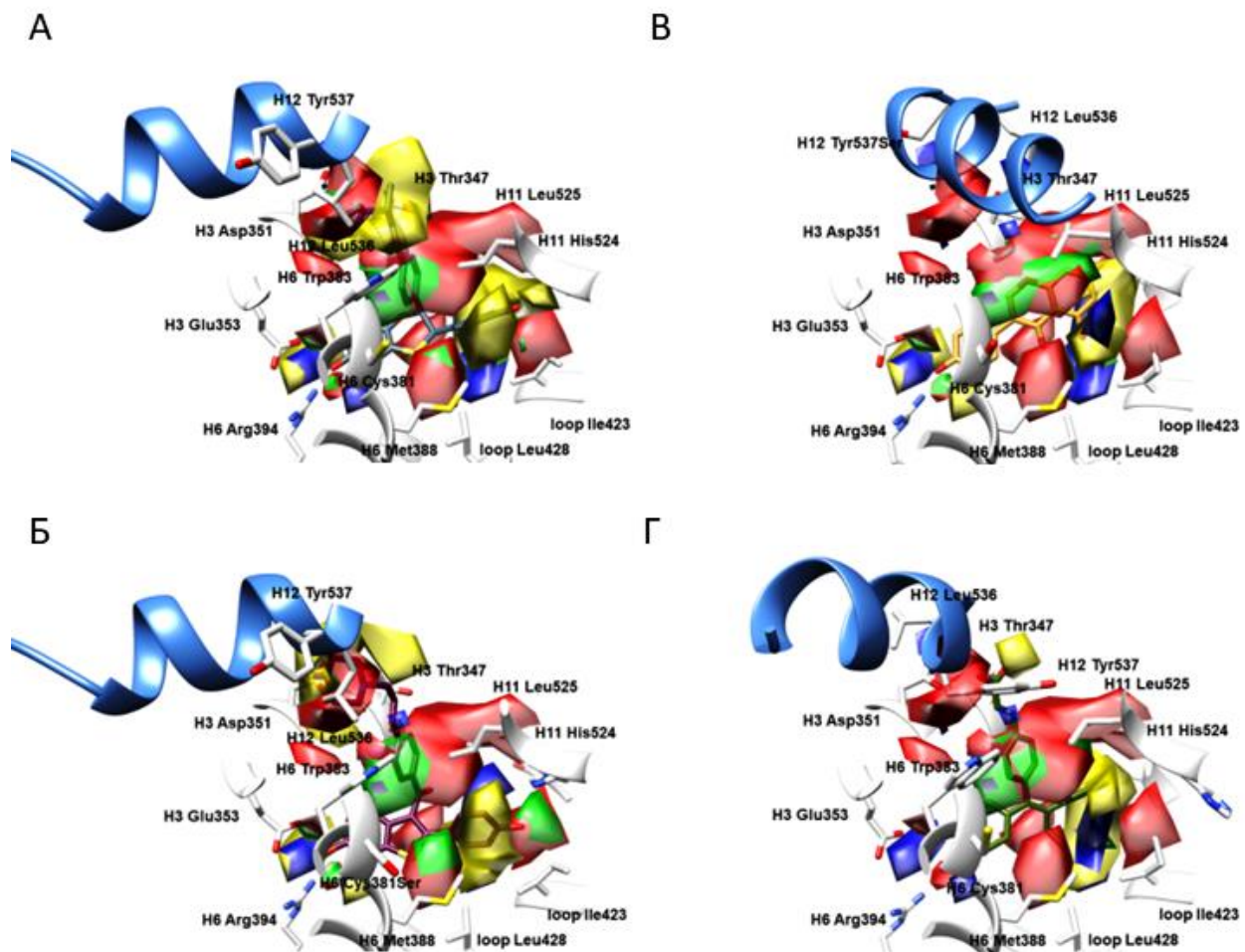
Слика ДМ1. Експерименталне наспрам наспрам прерачунатих (плавни квадрати) и предвиђених (црвени кругови) pIC_{50} вредности добијене након унакрсне валидације LOO приступом за модел генерисан из ОА пробе на PC4 (А); LOO приступом за модел генерисан из NA пробе PCs 5 (Б); LSO приступом за модел генерисан из ОА пробе на PC4 (В); LSO приступом за модел генерисан из NA пробе на PC5 (Г).



Слика ДМ2. Експерименталне наспрам наспрам прерачунатих (плави квадрати) и предвиђених (црвени кругови) pIC_{50} вредности добијене након унакрсне валидације LOO приступом за модел генерисан из А пробе на PC5 (А); LOO приступом за модел генерисан из С пробе PC4 (Б); LSO приступом за модел генерисан из А пробе на PC5 (В); LSO приступом за модел генерисан из С пробе на PC4 (Г).

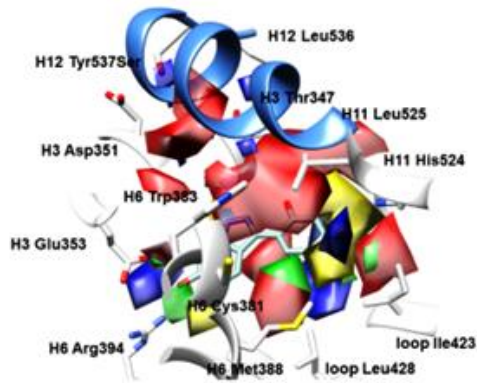


Слика ДМ3. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из N пробе за **1XP6** (A); **1SJO** (Б); **2R6Y** (B); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као за круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

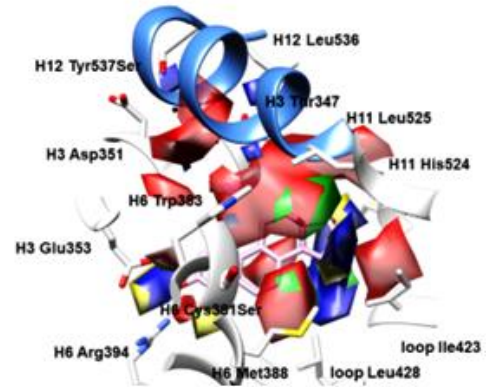


Слика ДМ4. Мапе *PLS*-коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из N пробе за **1XPС** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

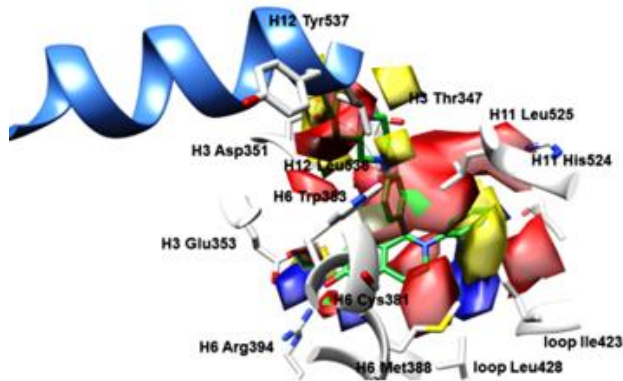
A



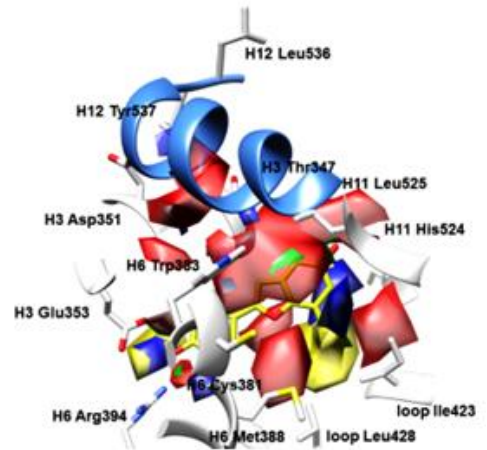
B



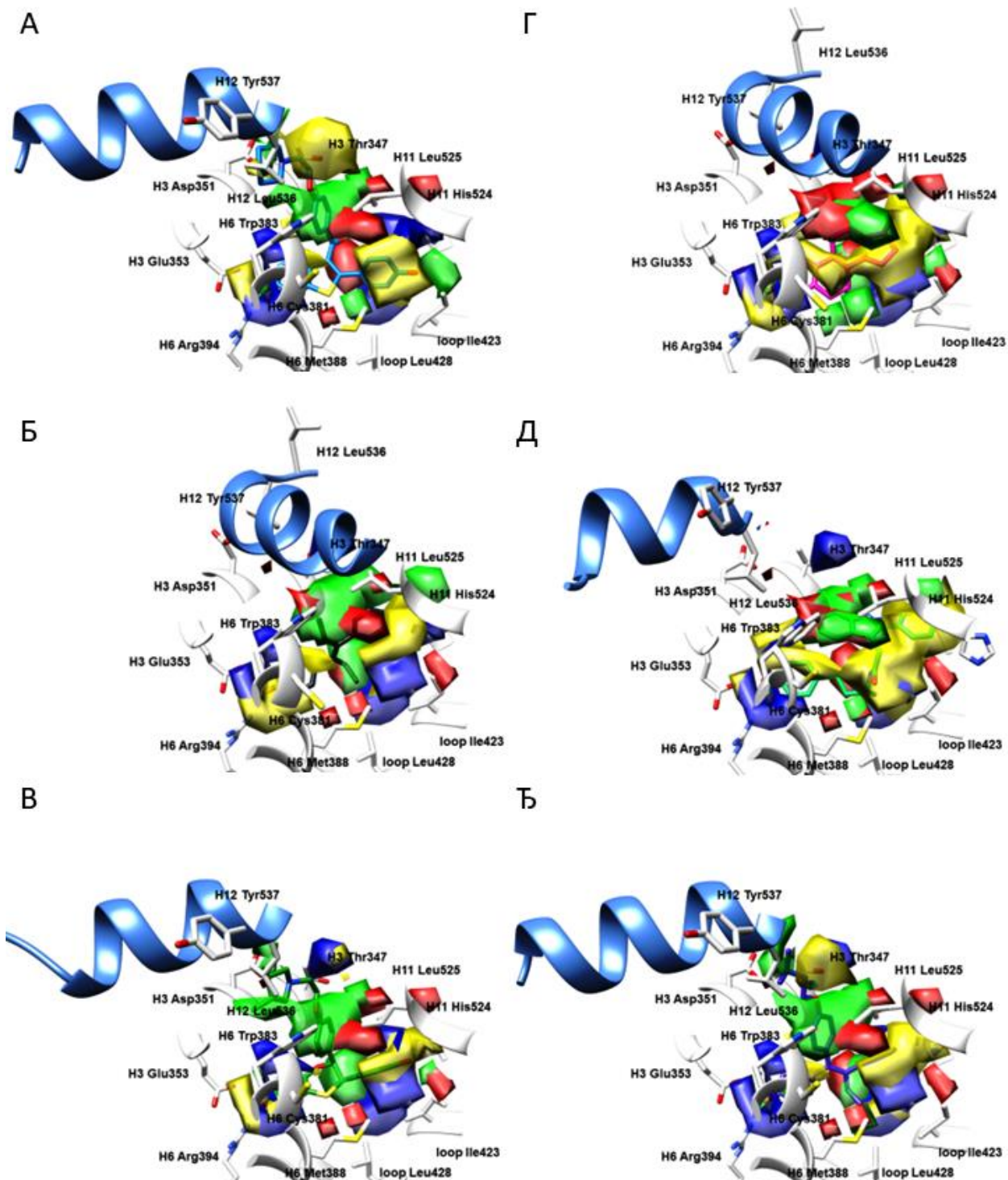
Б



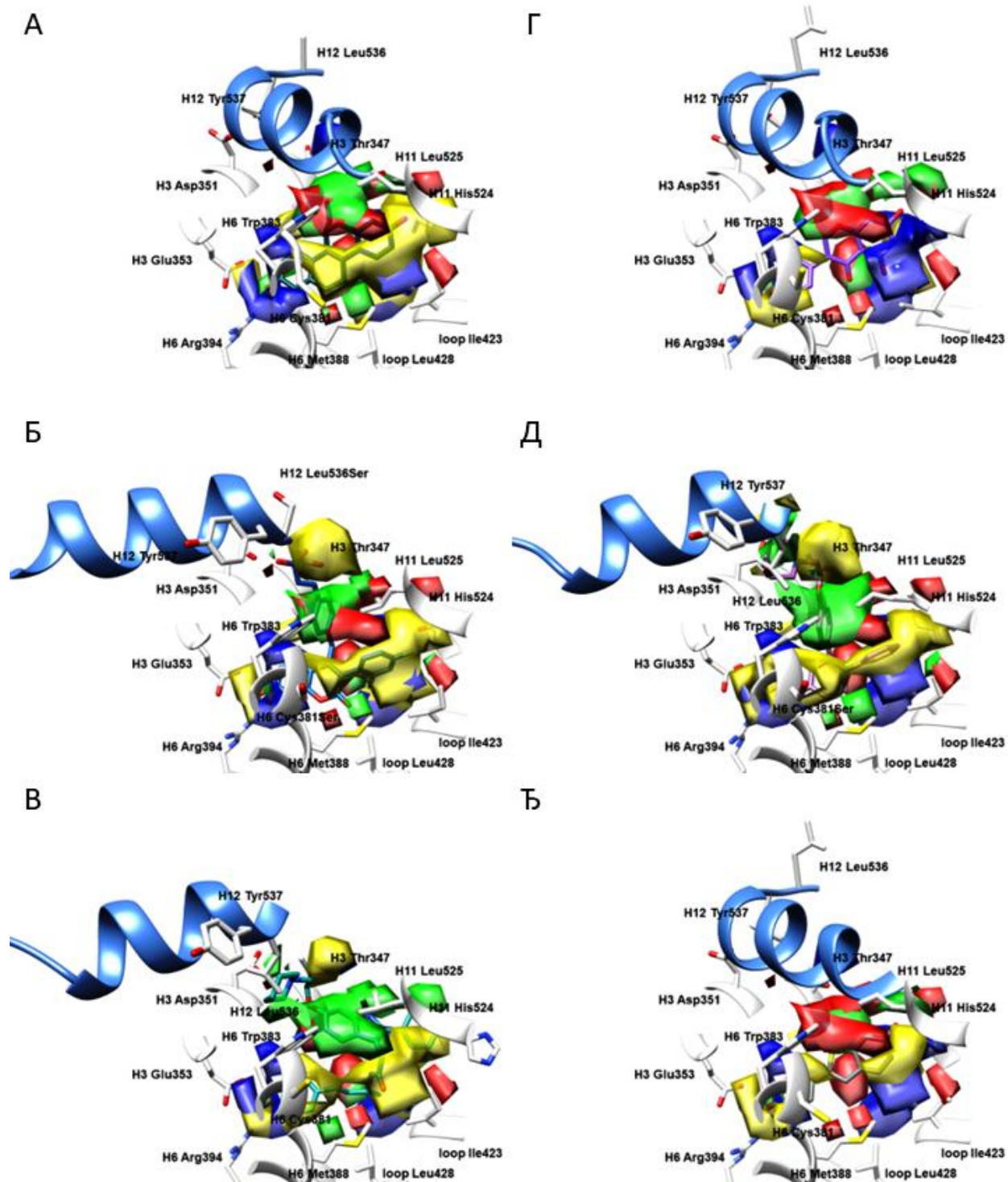
Г



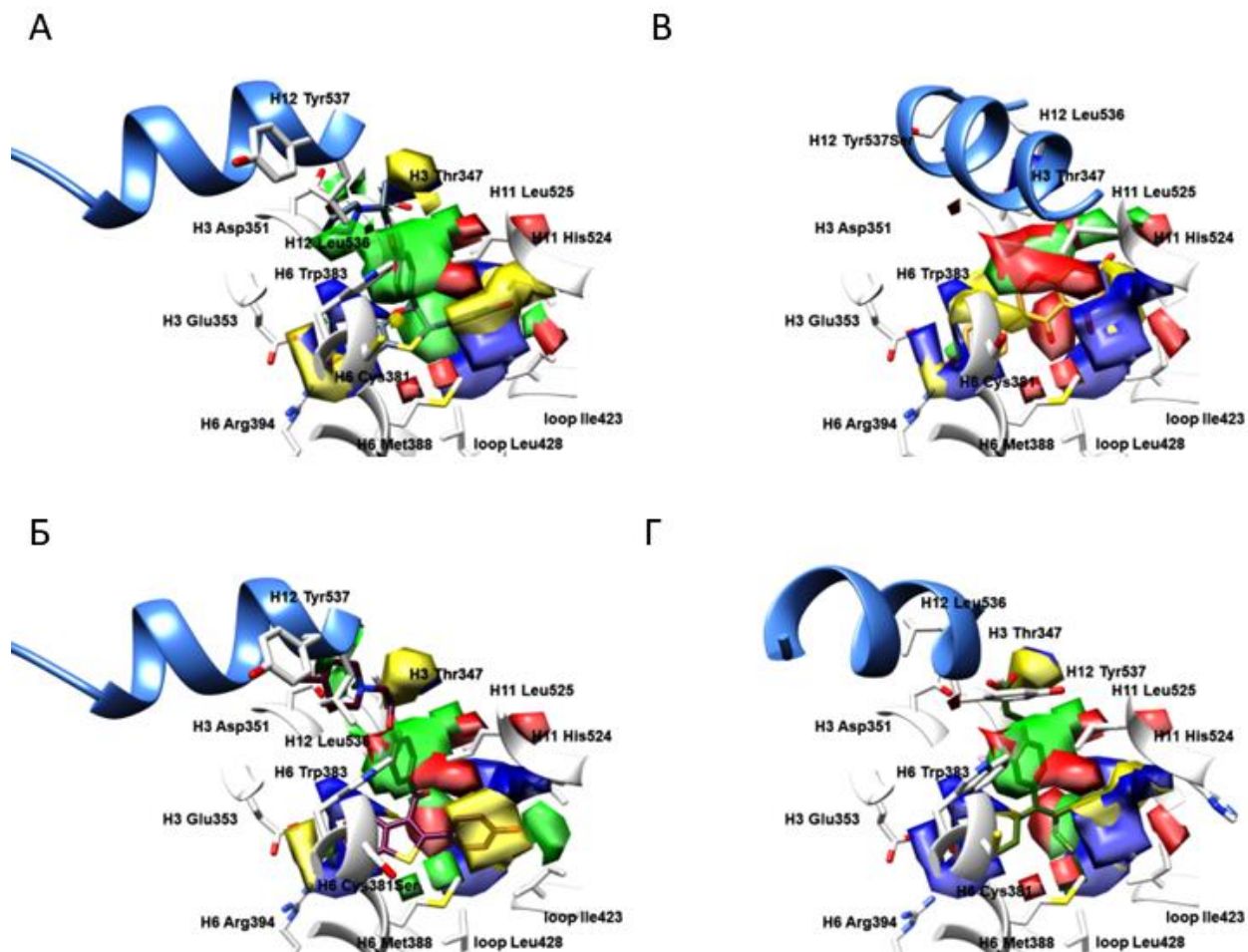
Слика ДМ5. Мапе PLS -кофицијента (P_{PLS} -кофицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из N пробе за **2QA6** (A); **1XQC** (Б); **2B1Z** (B); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



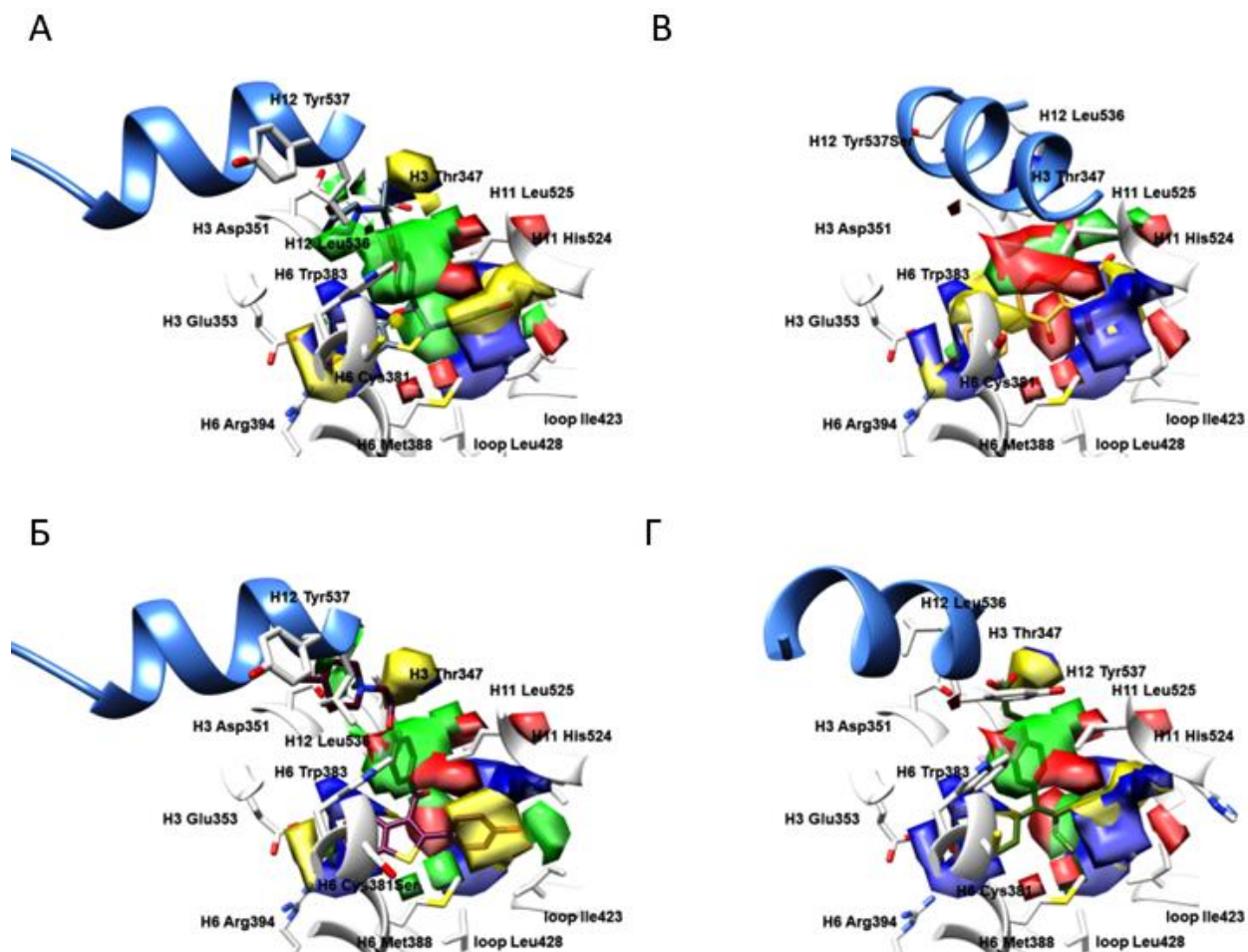
Слика ДМ6. Мапе *PLS*-коэффицијента (*P*_{*PLS*}-коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (*L*_{*ACC*}, позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из А пробе за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **21OK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ7. Мапе PLS -кофицијента (P_{PLS} -кофицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из А пробе за 1L2I (А); 5AK2 (Б); 2IOG (В); 1X7R (Г); 1UOM (Д); 1GWQ (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

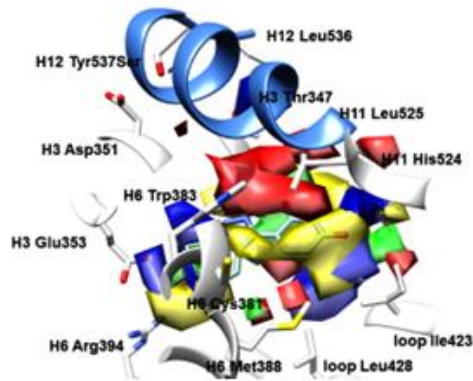


Слика ДМ8. Мапе PLS -кофицијената (P_{PLS} -кофицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из А пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

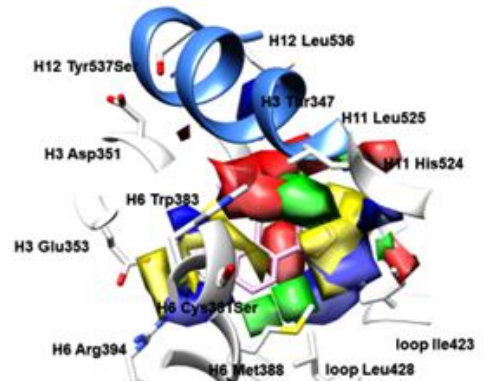


Слика ДМ9. Мапе P_{LS} -кофицијената (P_{LS} -кофицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из А пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

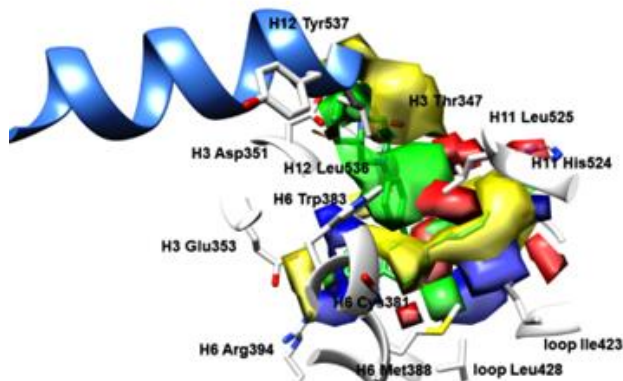
A



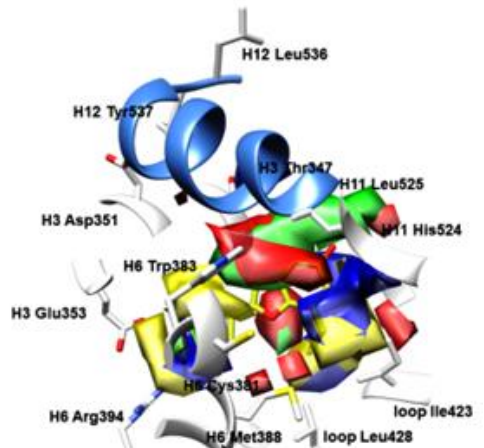
B



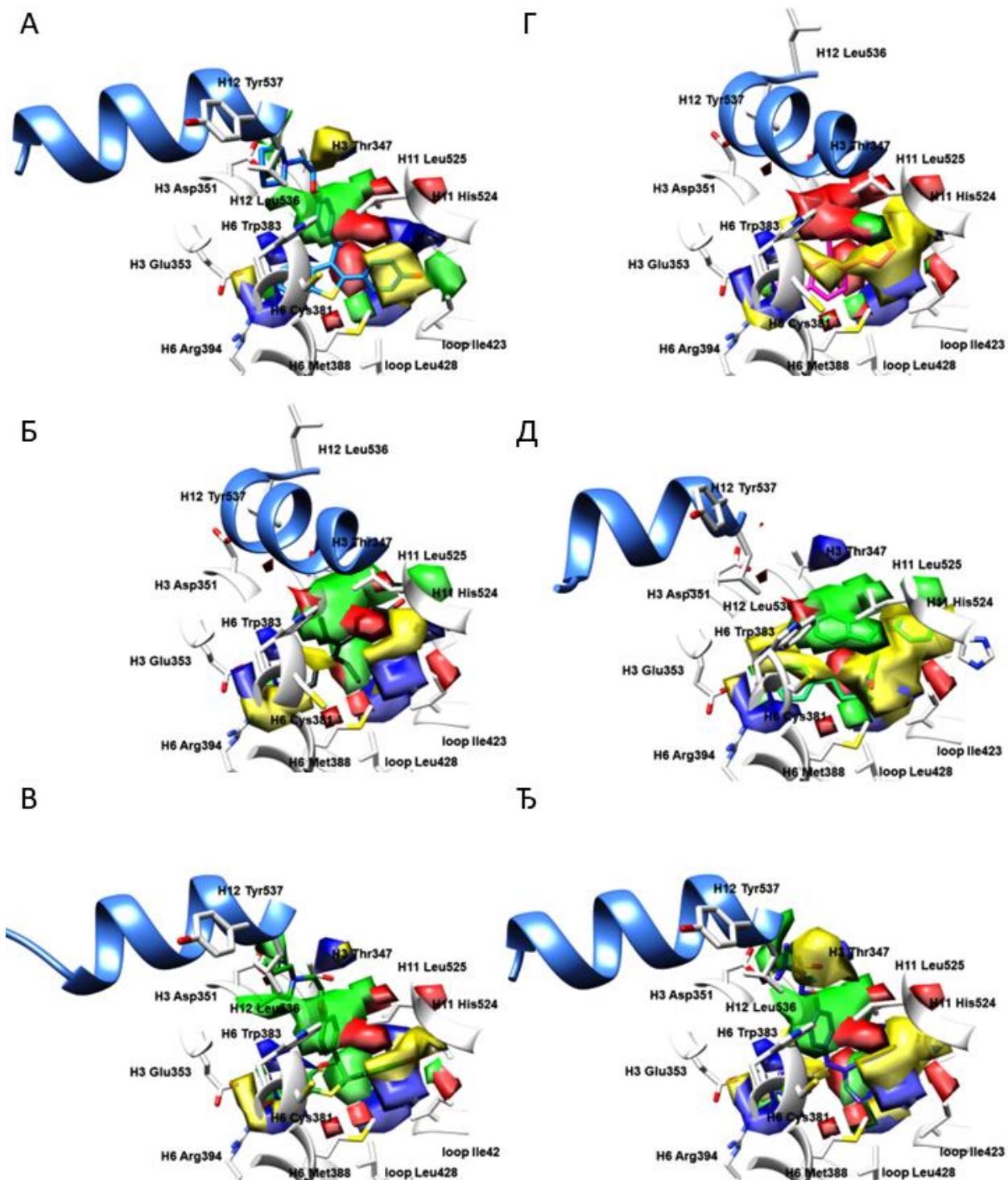
Б



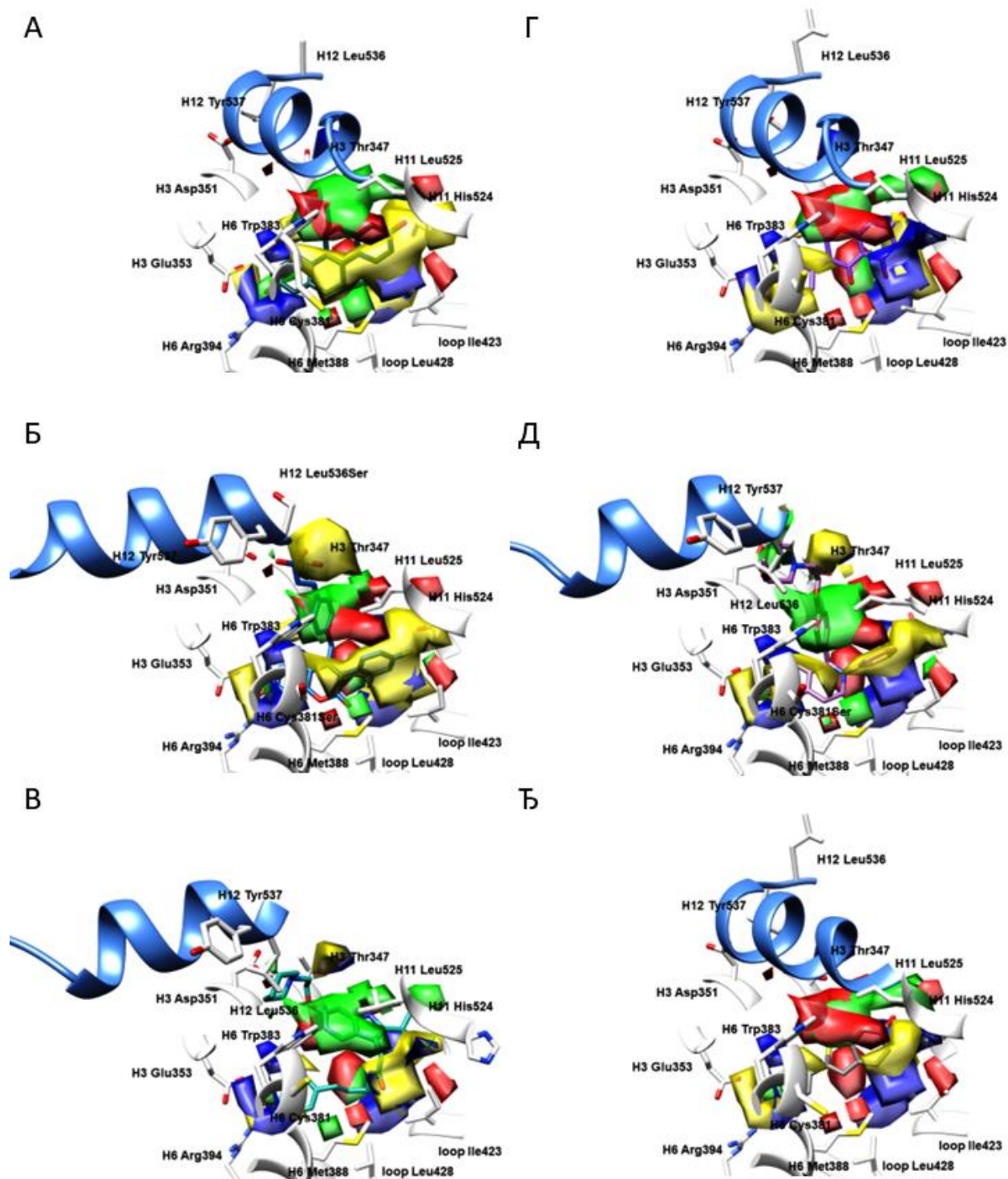
Г



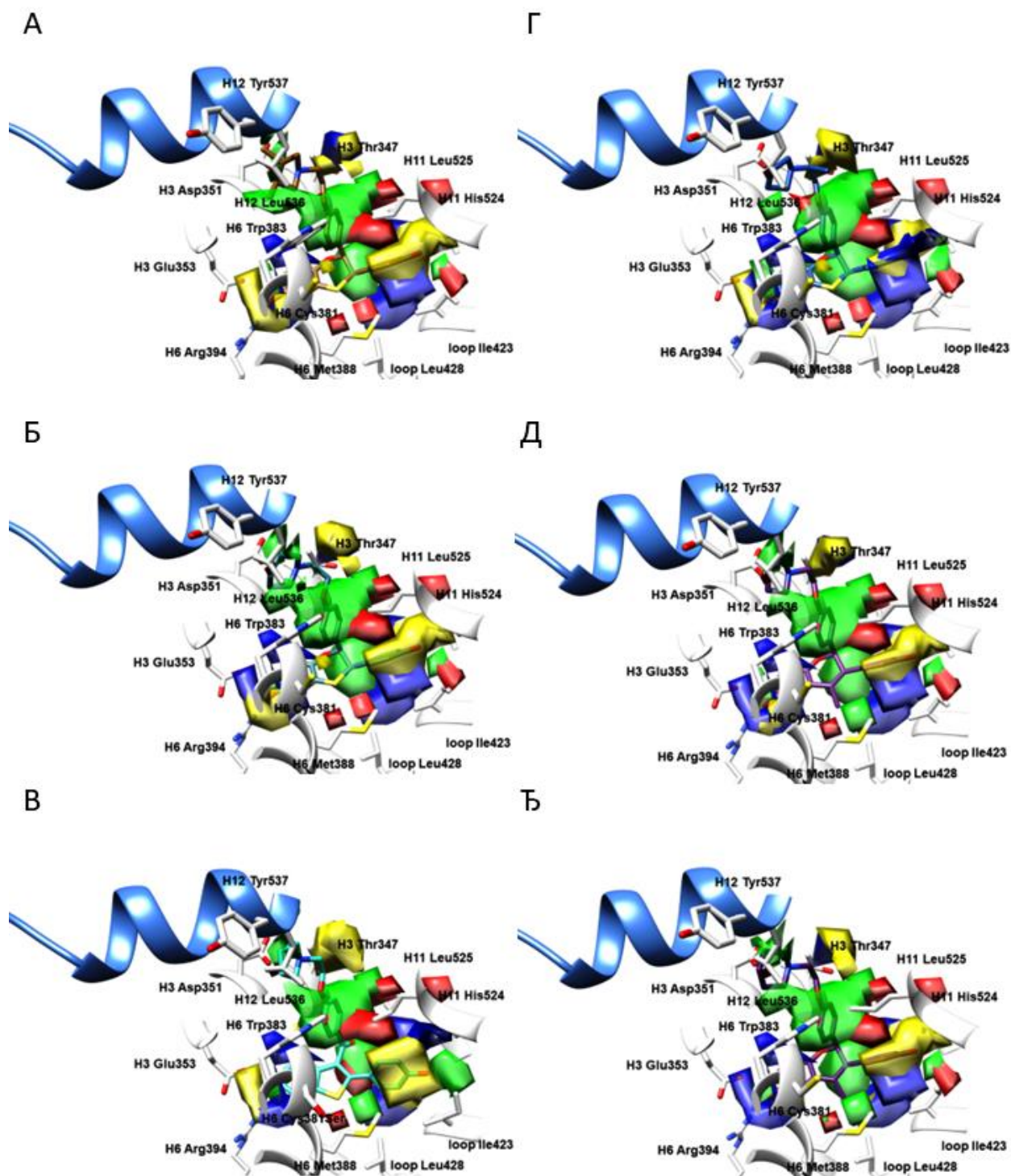
Слика ДМ10. Мапе *PLS*-коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из А пробе за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



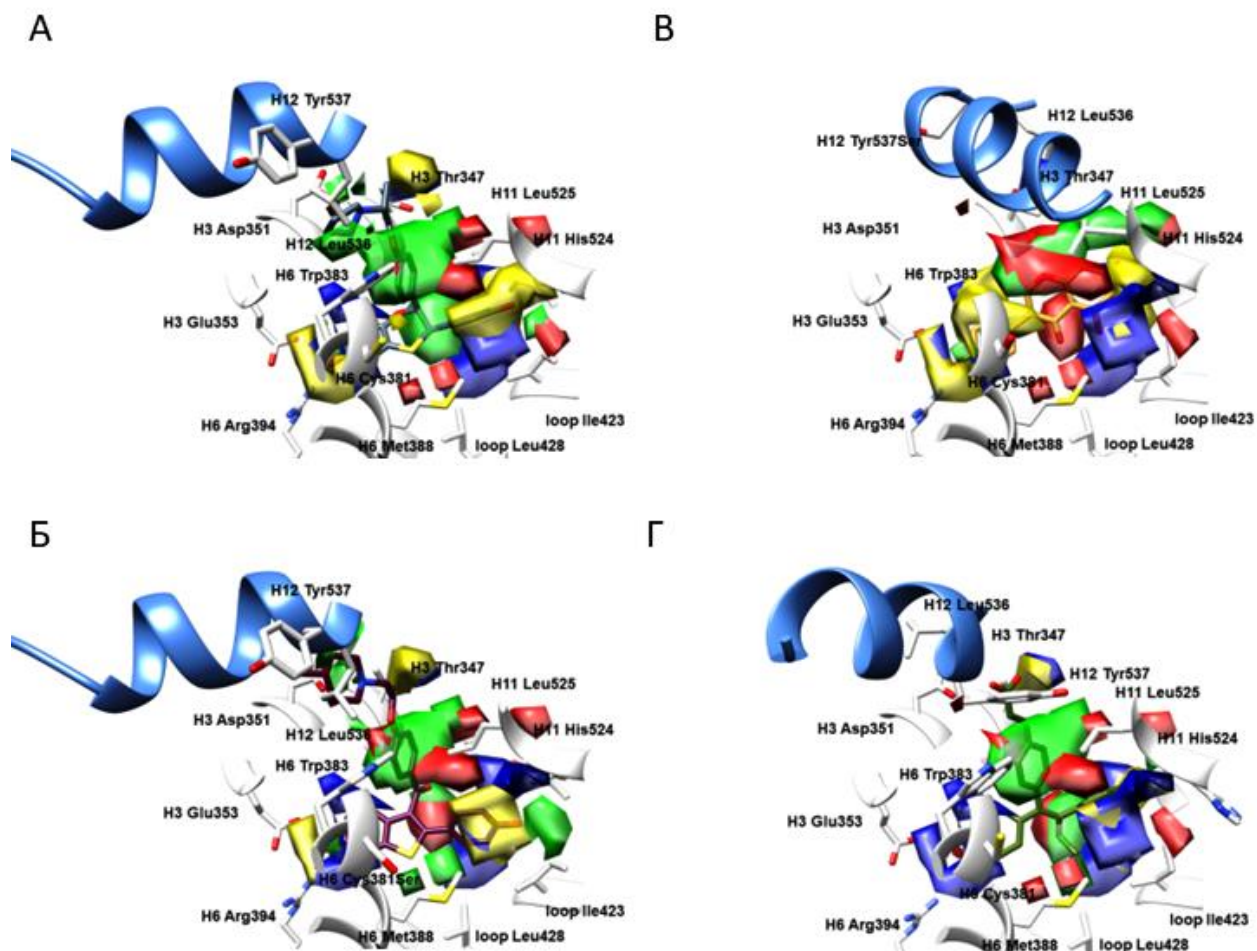
Слика ДМ11. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из С пробе за **1EER** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **21OK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ12. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из C пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

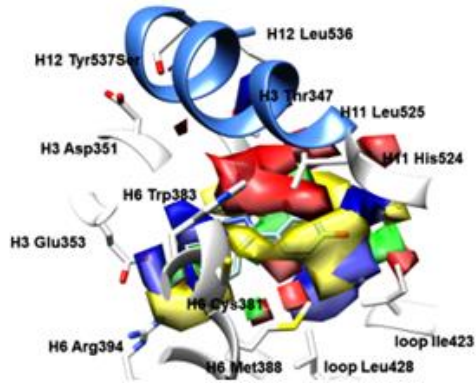


Слика ДМ13. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из С пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

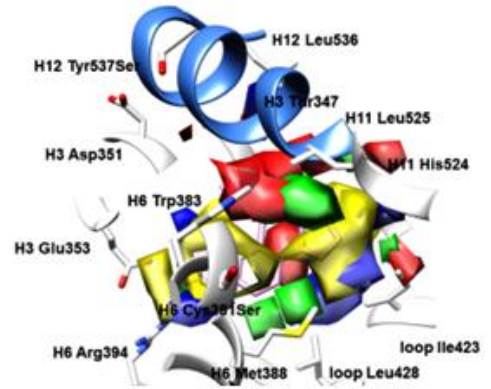


Слика ДМ14. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из С пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

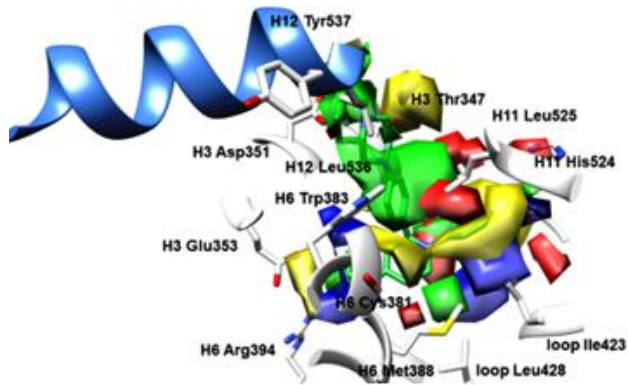
A



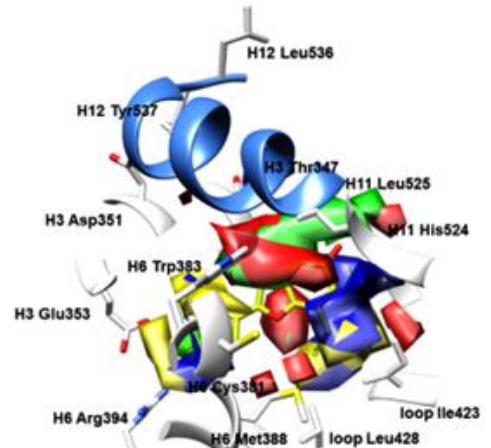
B



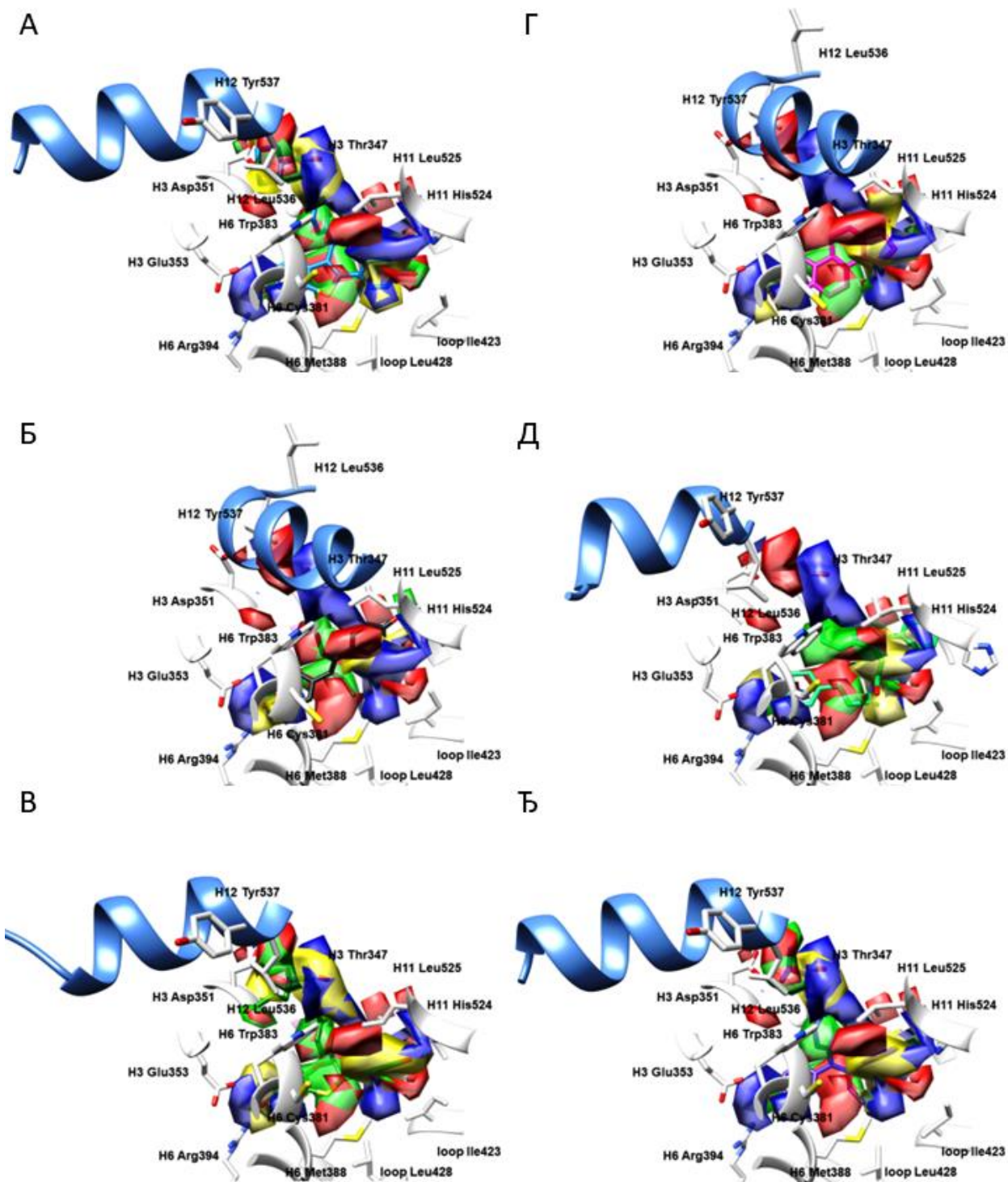
Б



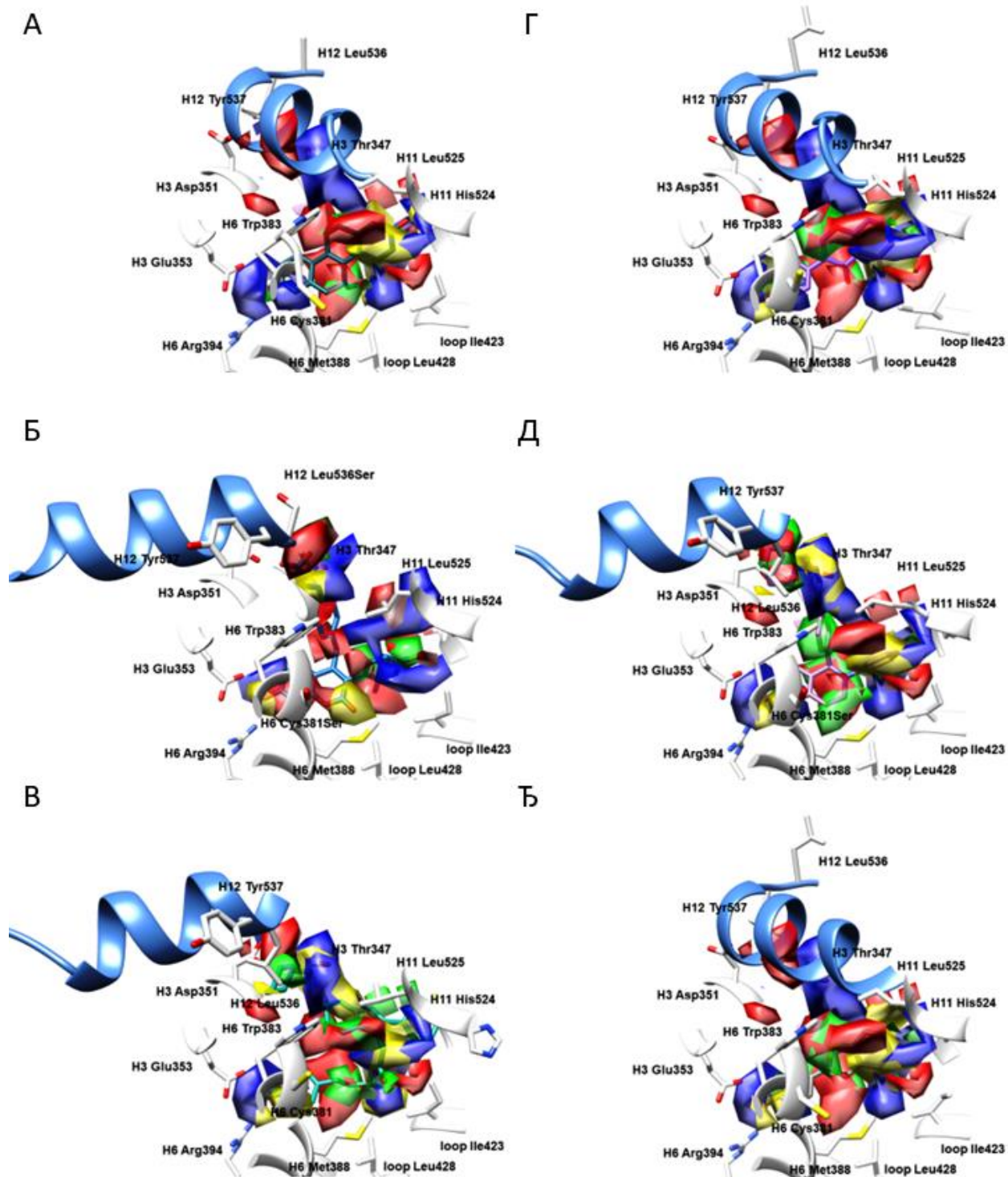
Г



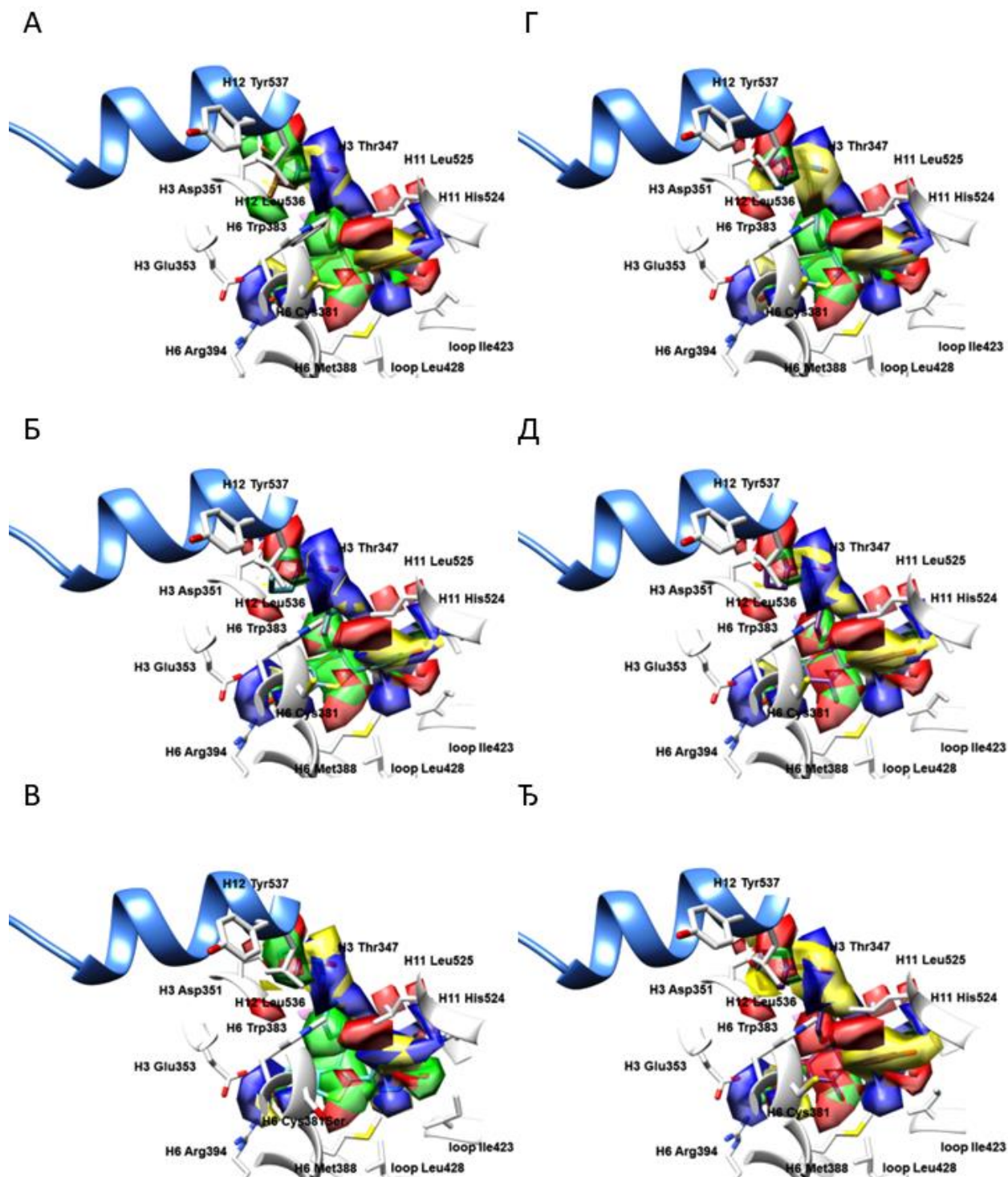
Слика ДМ15. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из С пробе за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



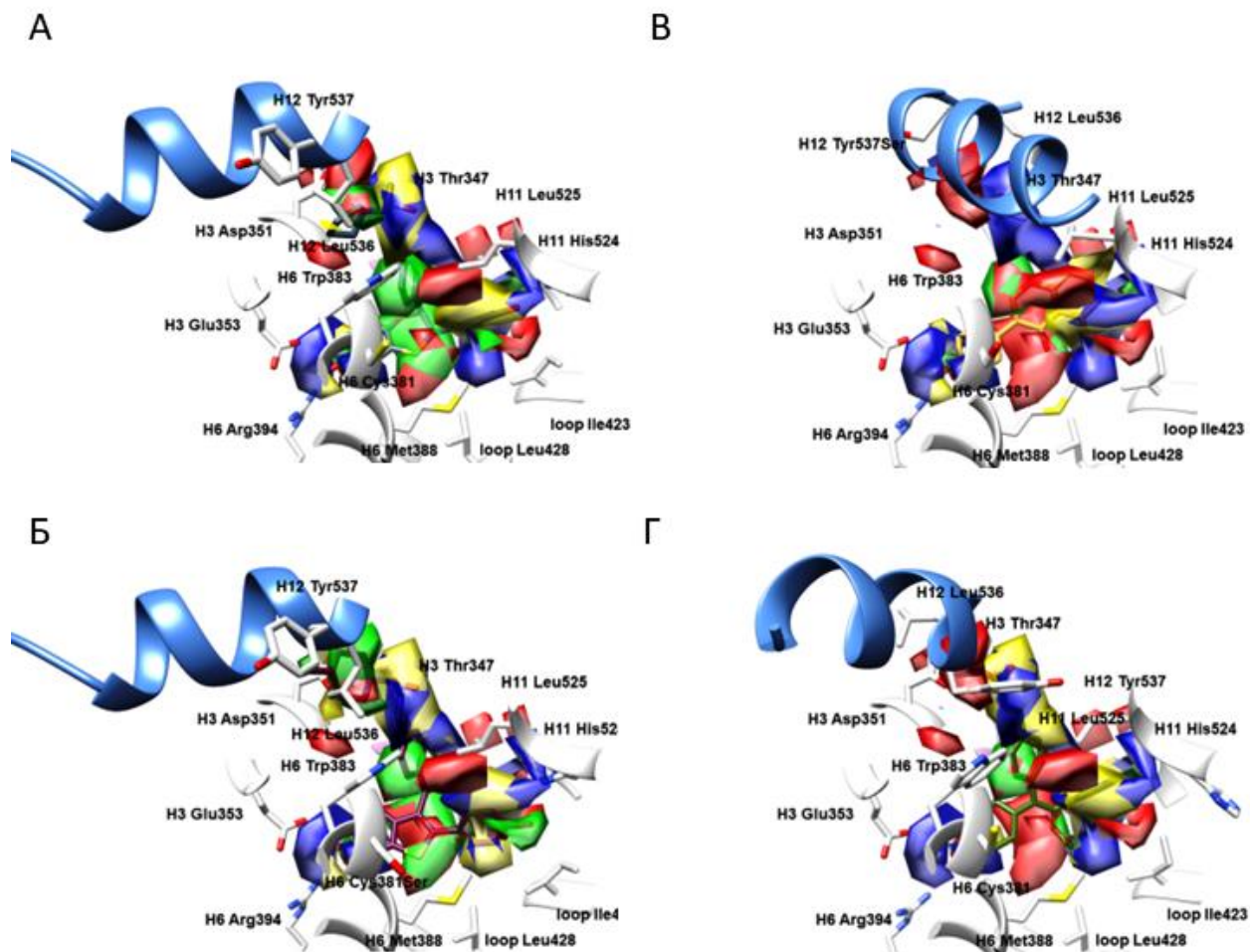
Слика ДМ16. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из HD пробе за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **2IOK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ17. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из HD пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

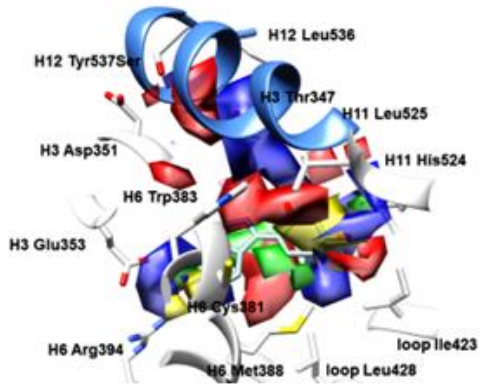


Слика ДМ18. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из HD пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

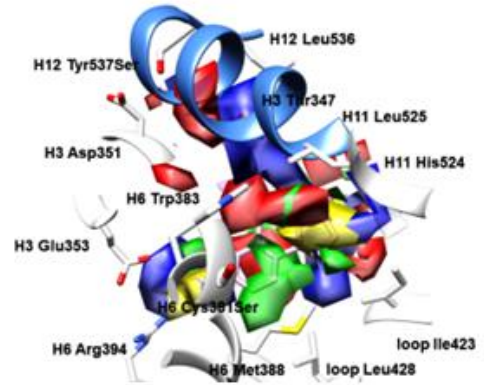


Слика ДМ19. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из HD пробе за **1XPC** (A); **2R6W** (Б); **2QA8** (B); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

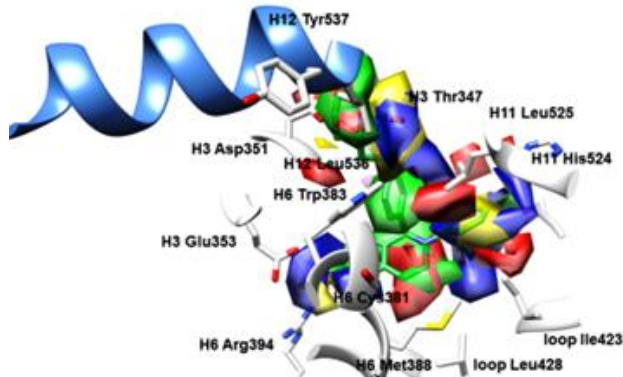
A



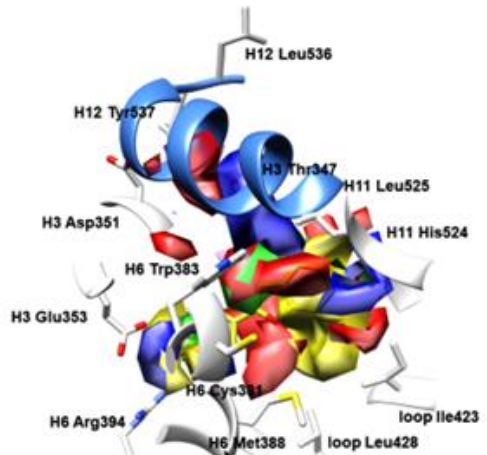
B



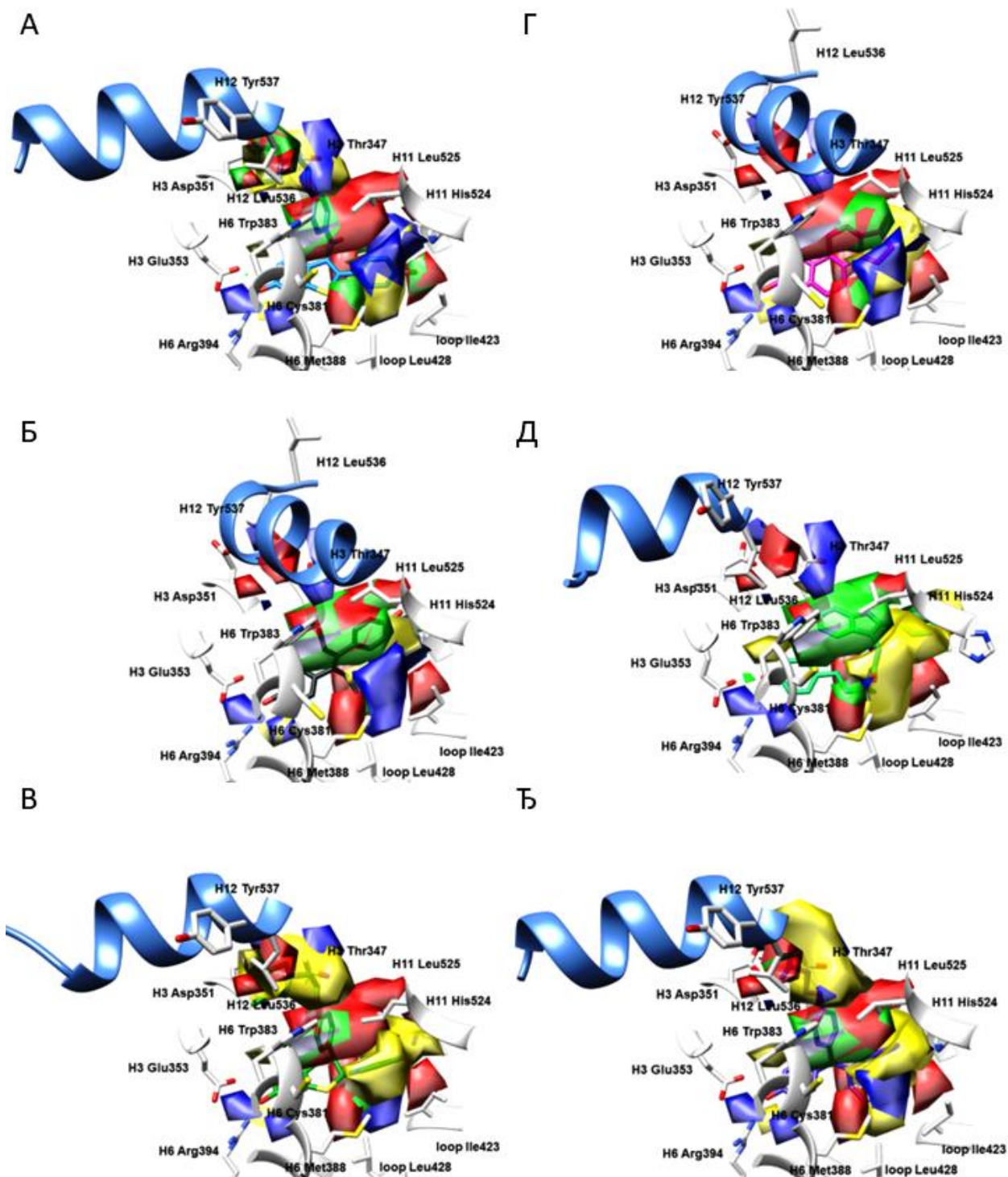
Б



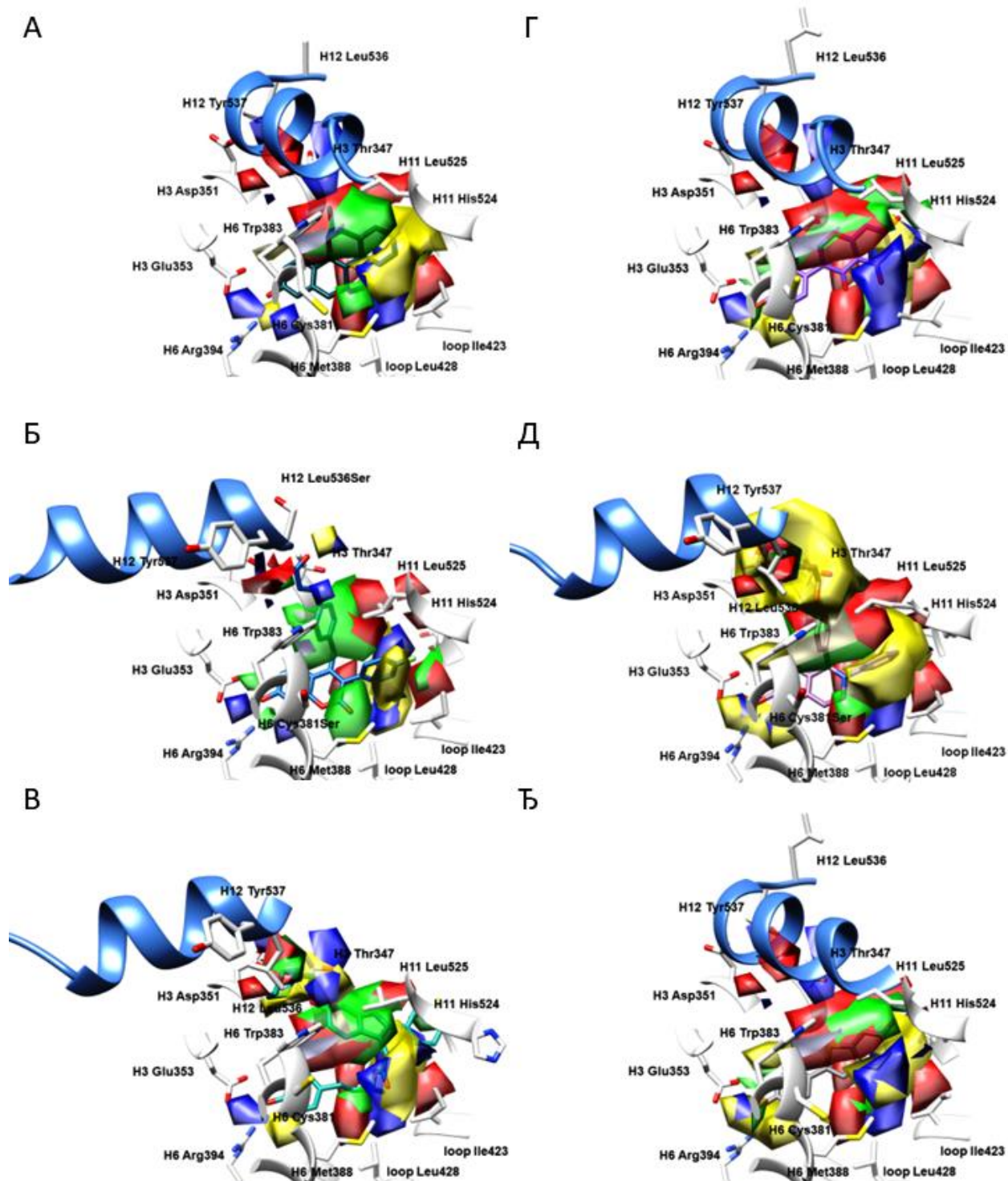
Г



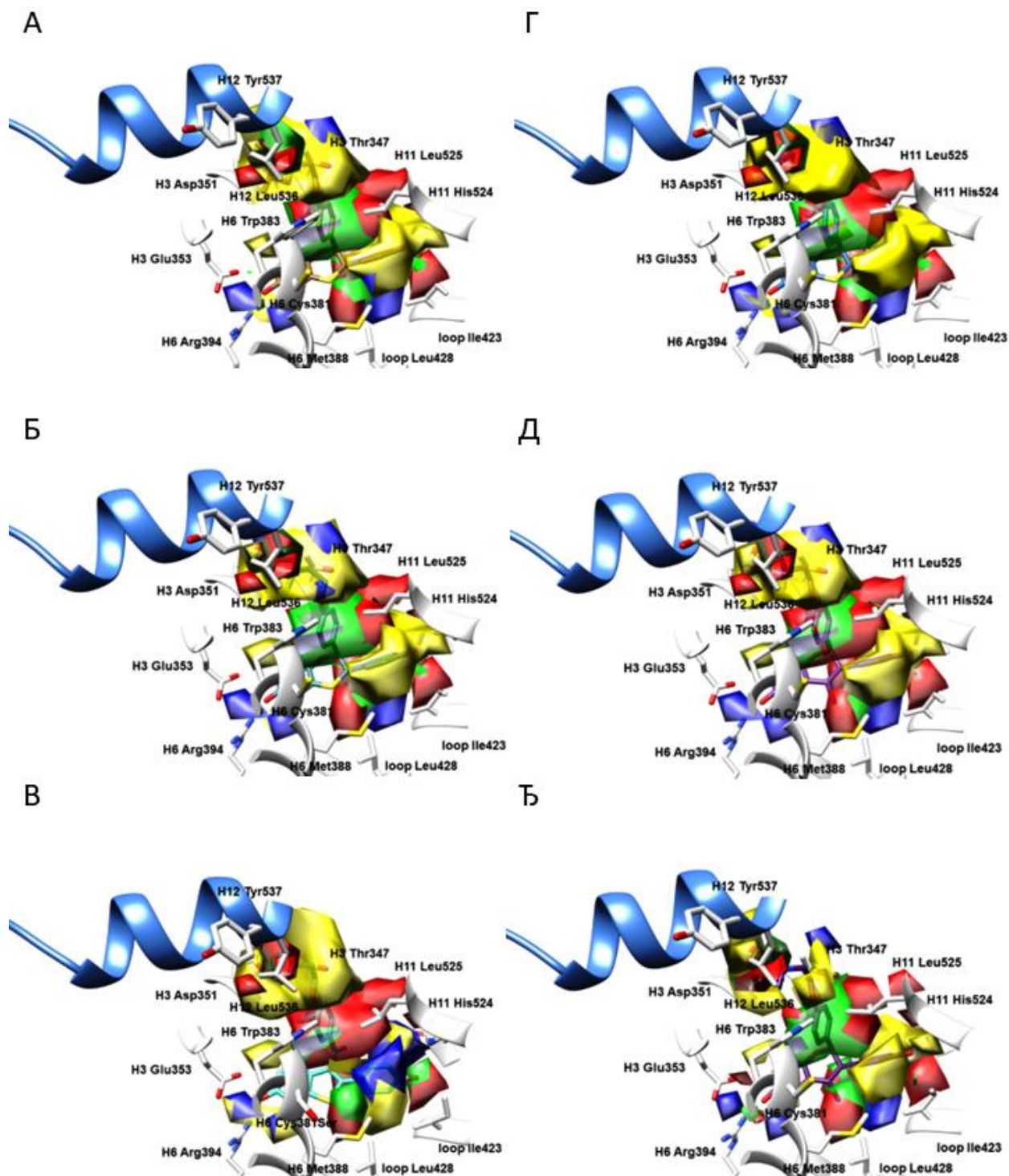
Слика ДМ20. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из HD пробе за **2QA6** (A); **1XQC** (Б); **2B1Z** (B); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



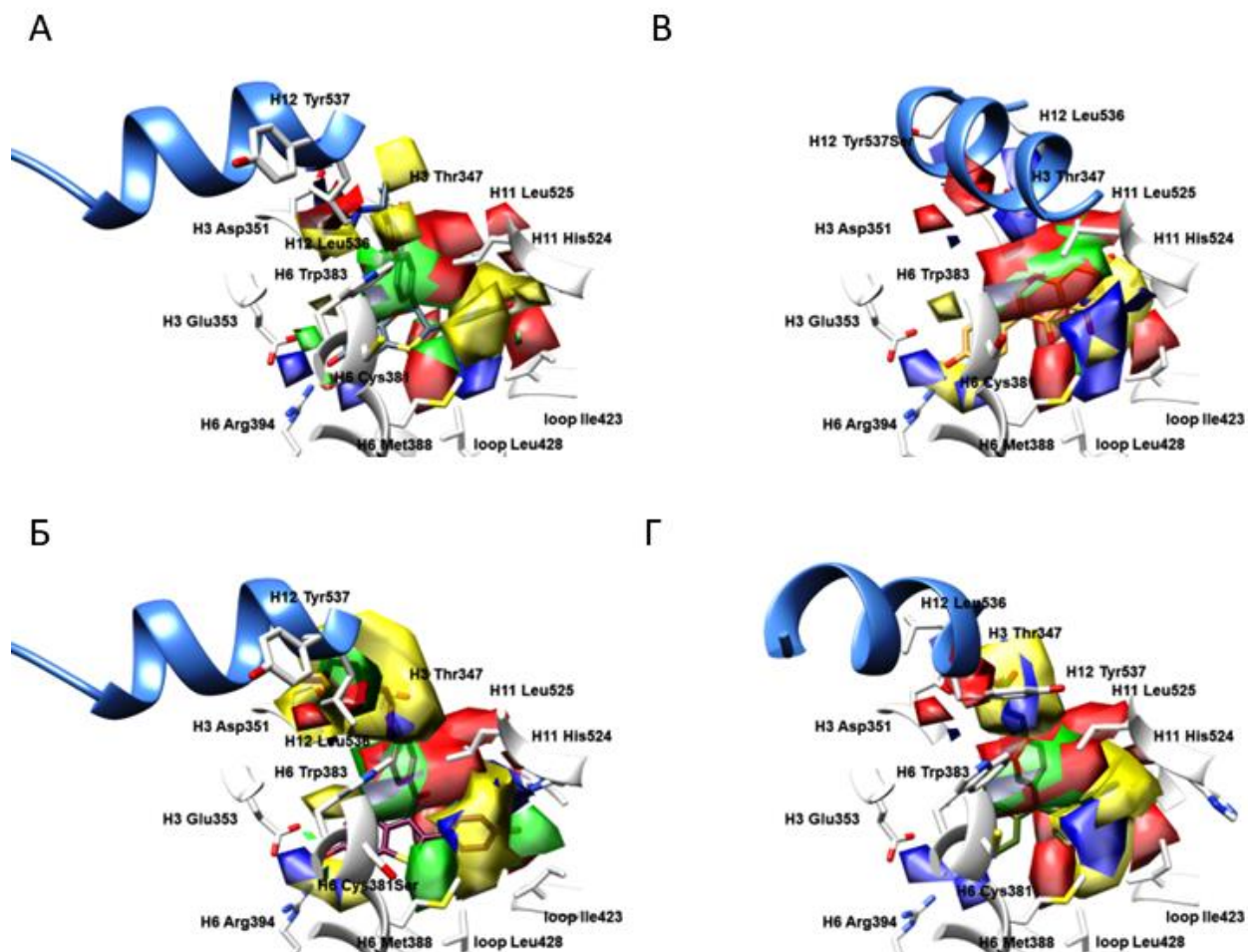
Слика ДМ21. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из ОА пробе за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В), **1ERE** (Г); **2IOK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ22. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из ОА пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

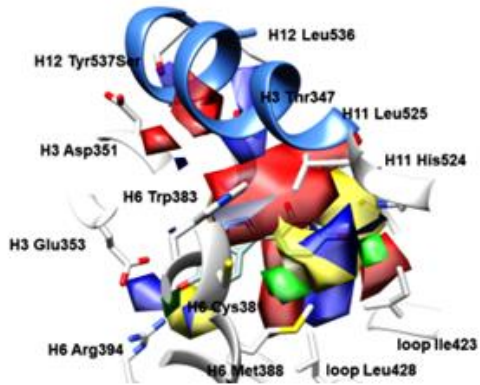


Слика ДМ23. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из ОА пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

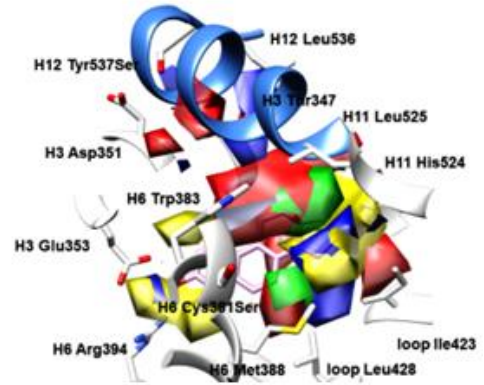


Слика ДМ24. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из ОА пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

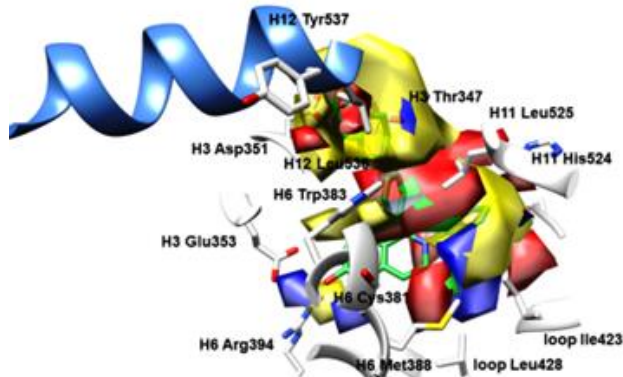
A



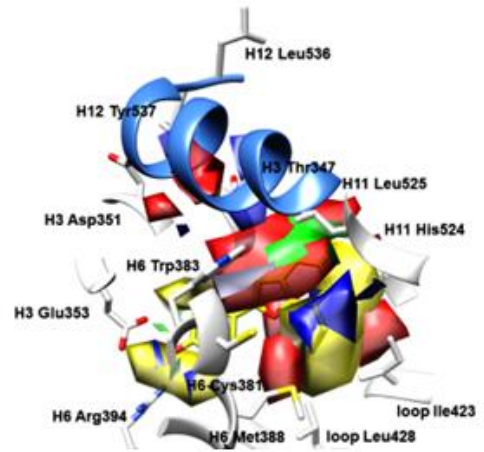
B



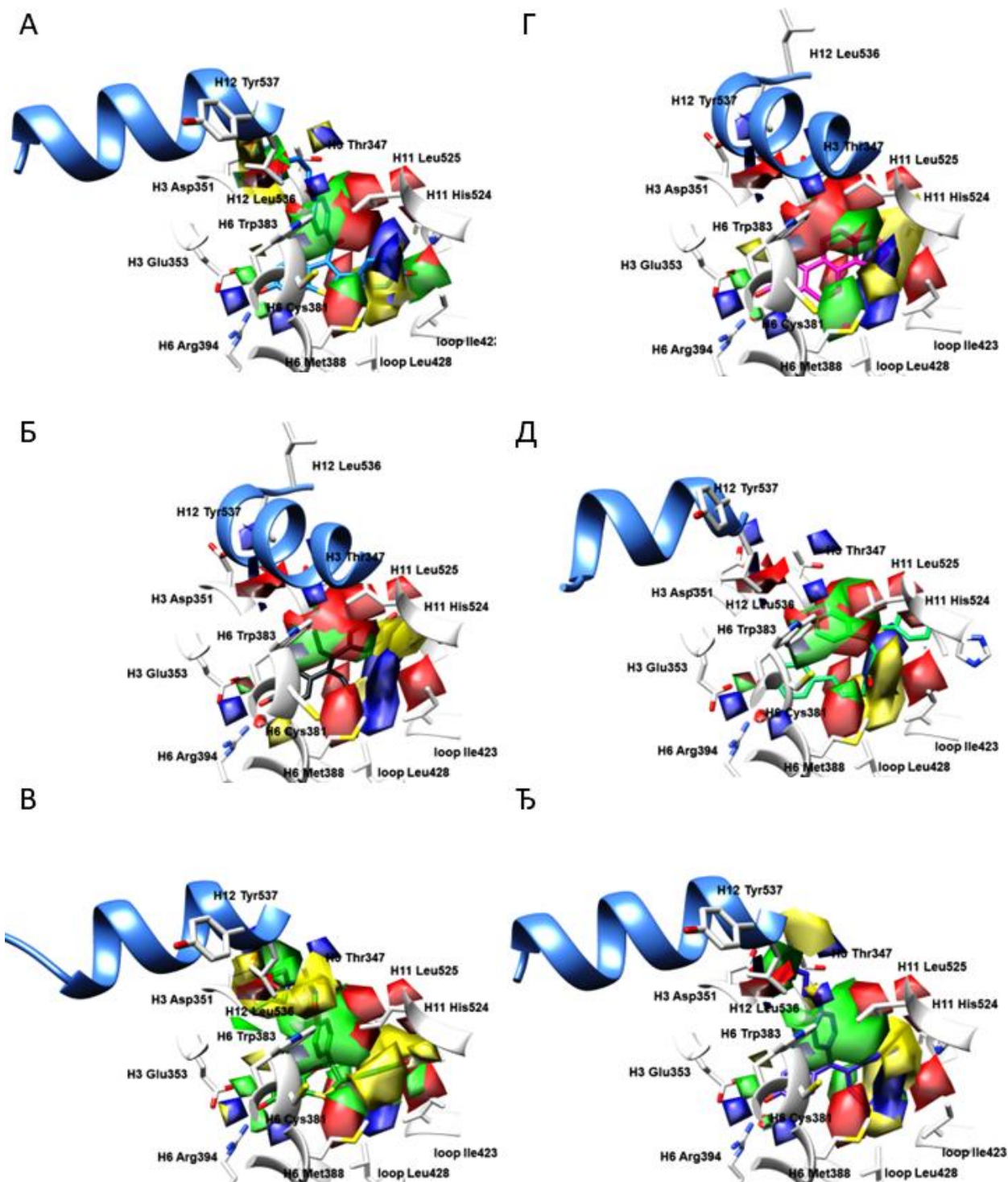
Б



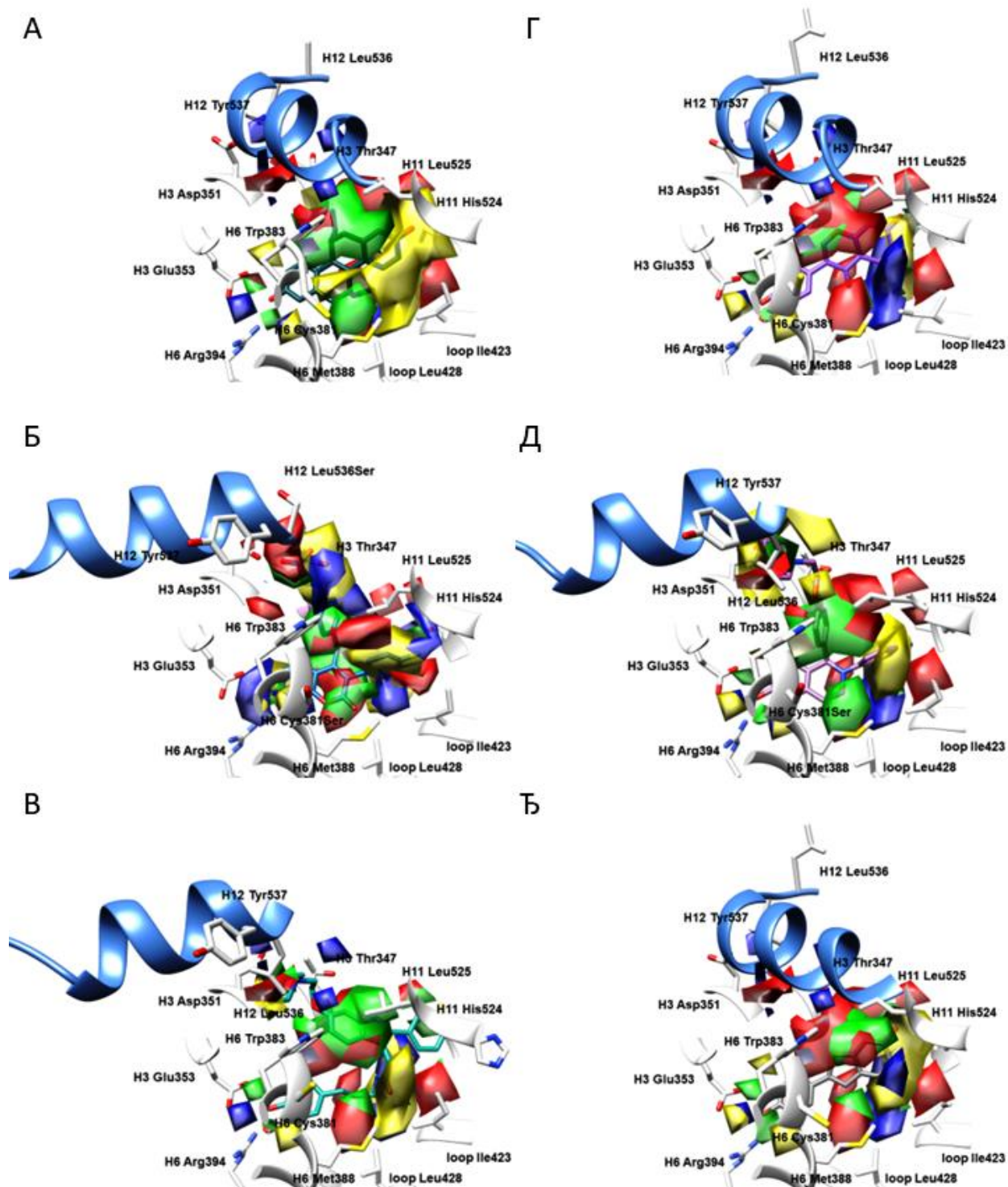
Г



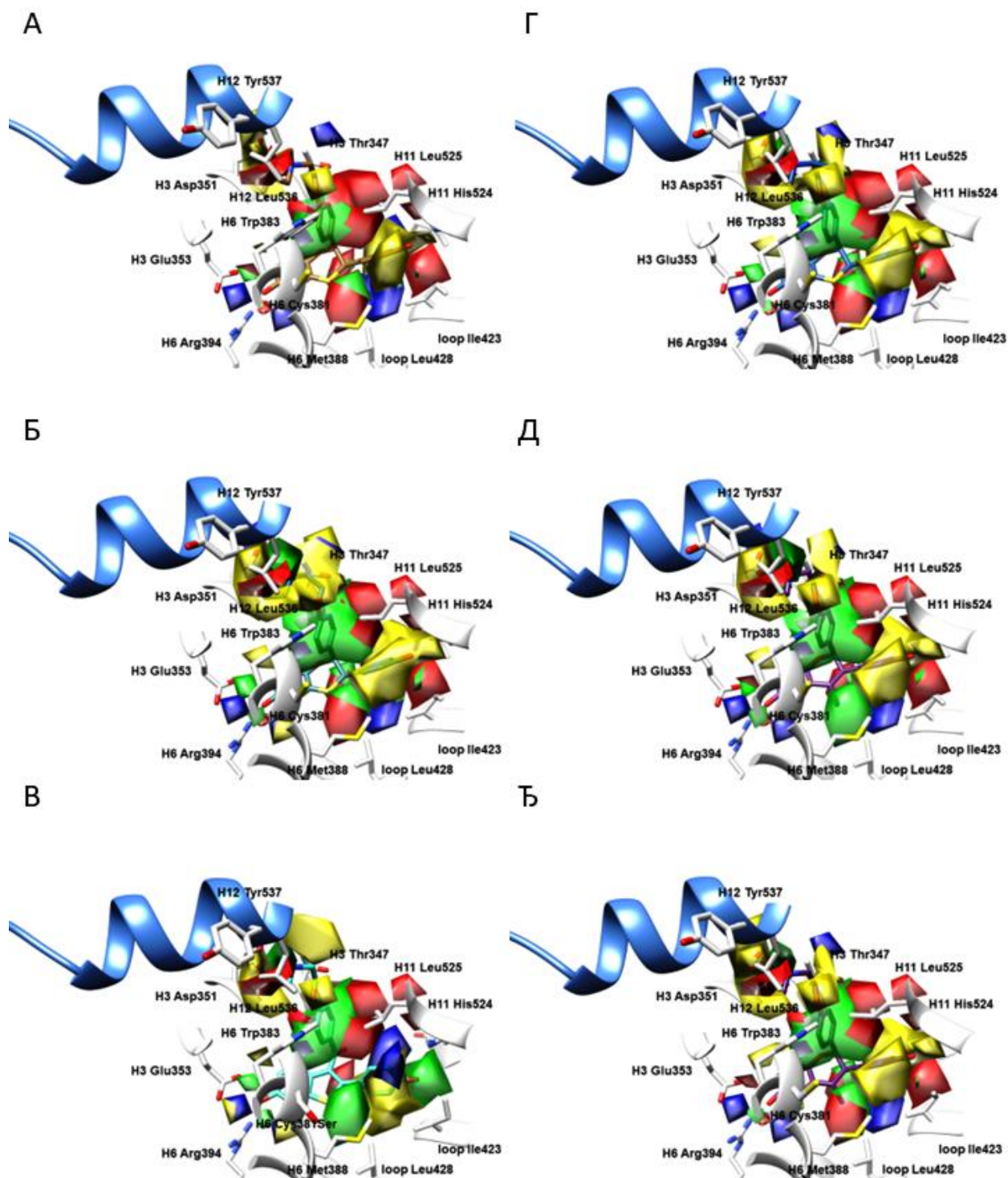
Слика ДМ25. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из ОА пробе за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



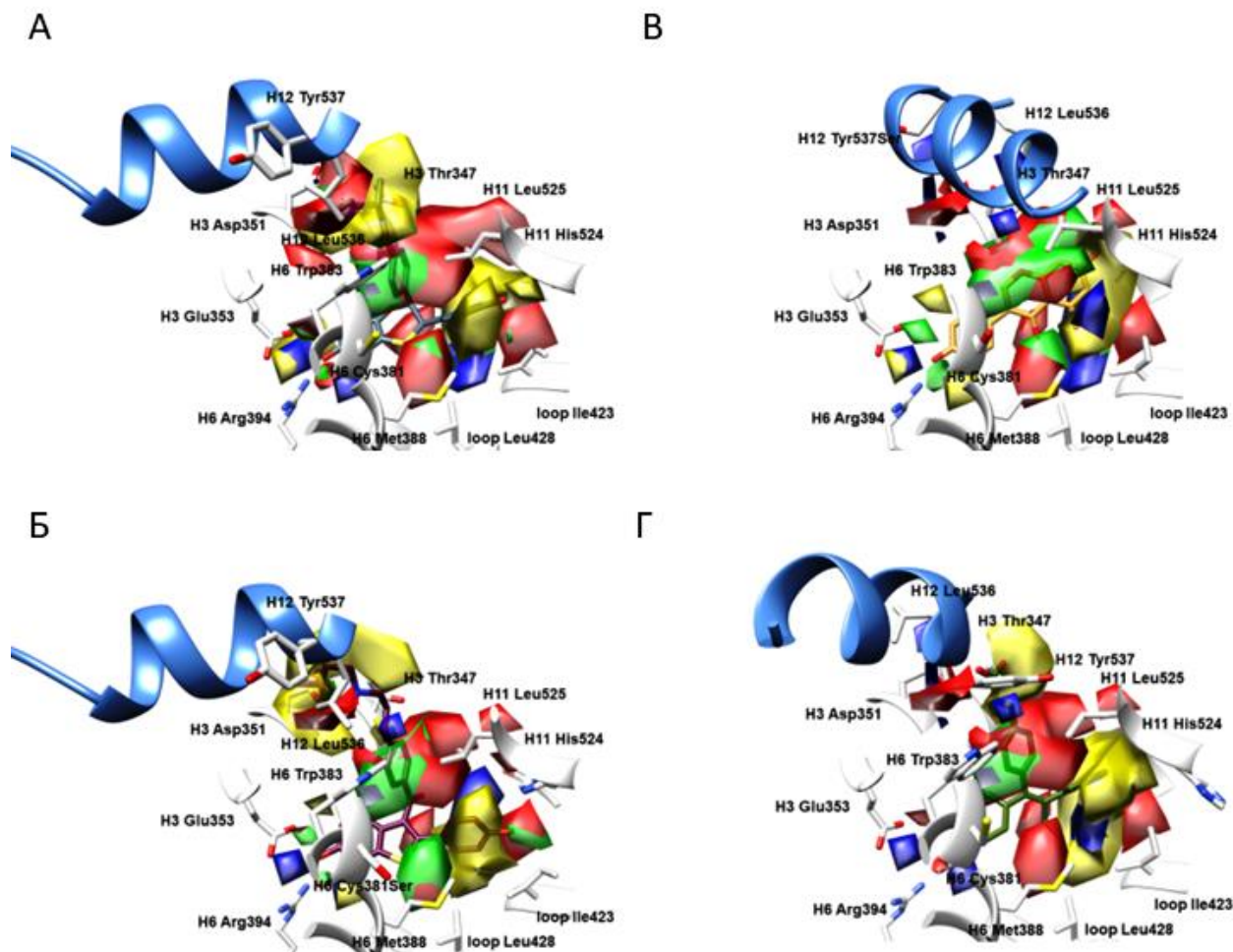
Слика ДМ26. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из NA пробе за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **21OK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ27. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из NA пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

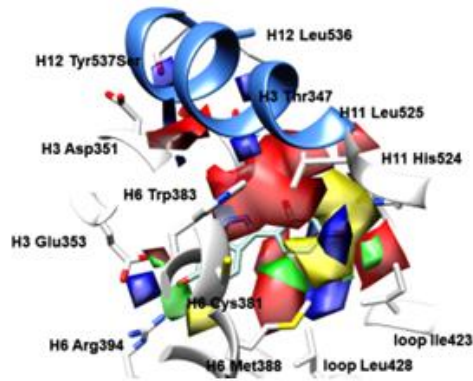


Слика ДМ28. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из NA пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

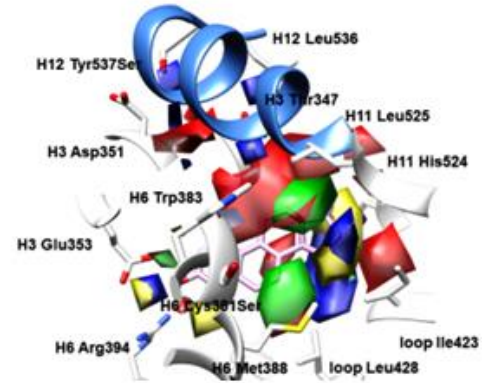


Слика ДМ29. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из NA пробе за **1XPC** (A); **2R6W** (B); **2QA8** (B); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са $SERM$ односно $SERD$ фармакологијом.

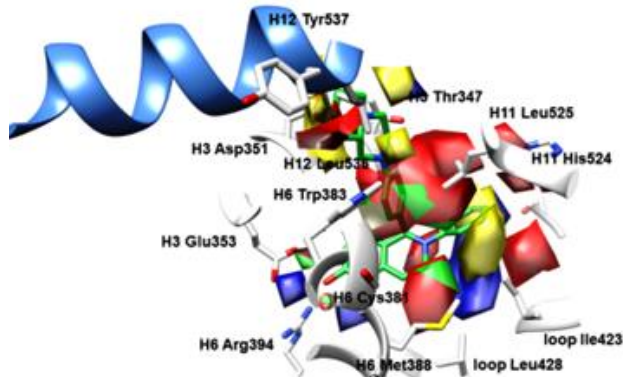
A



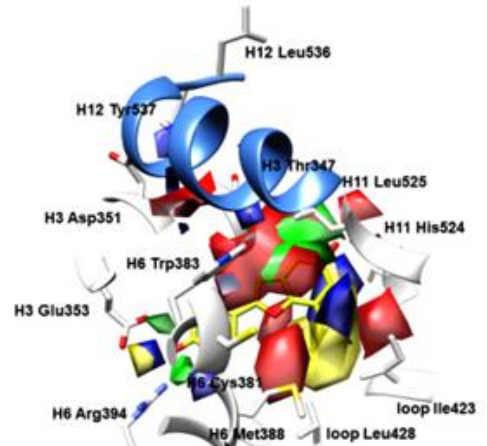
B



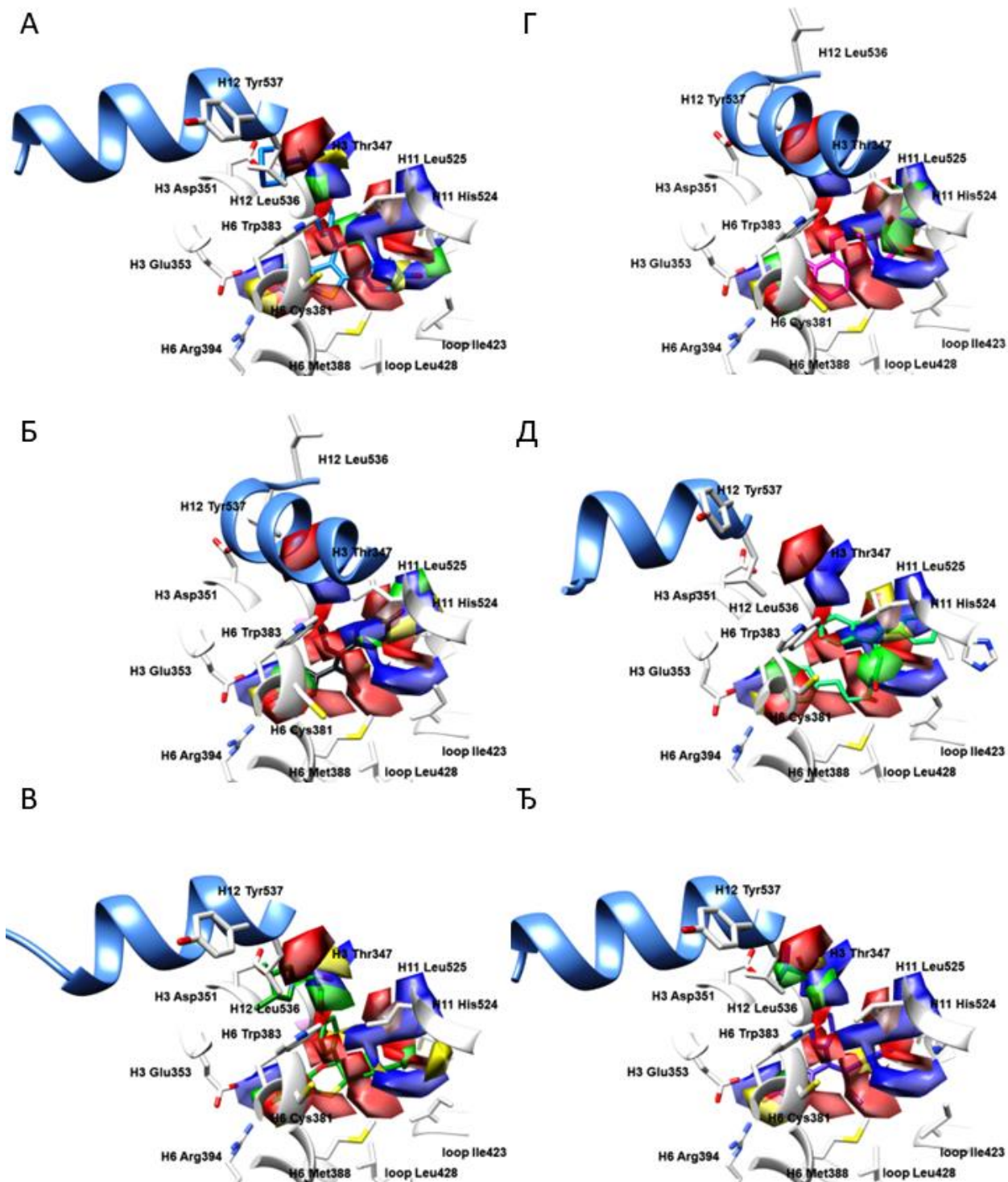
Б



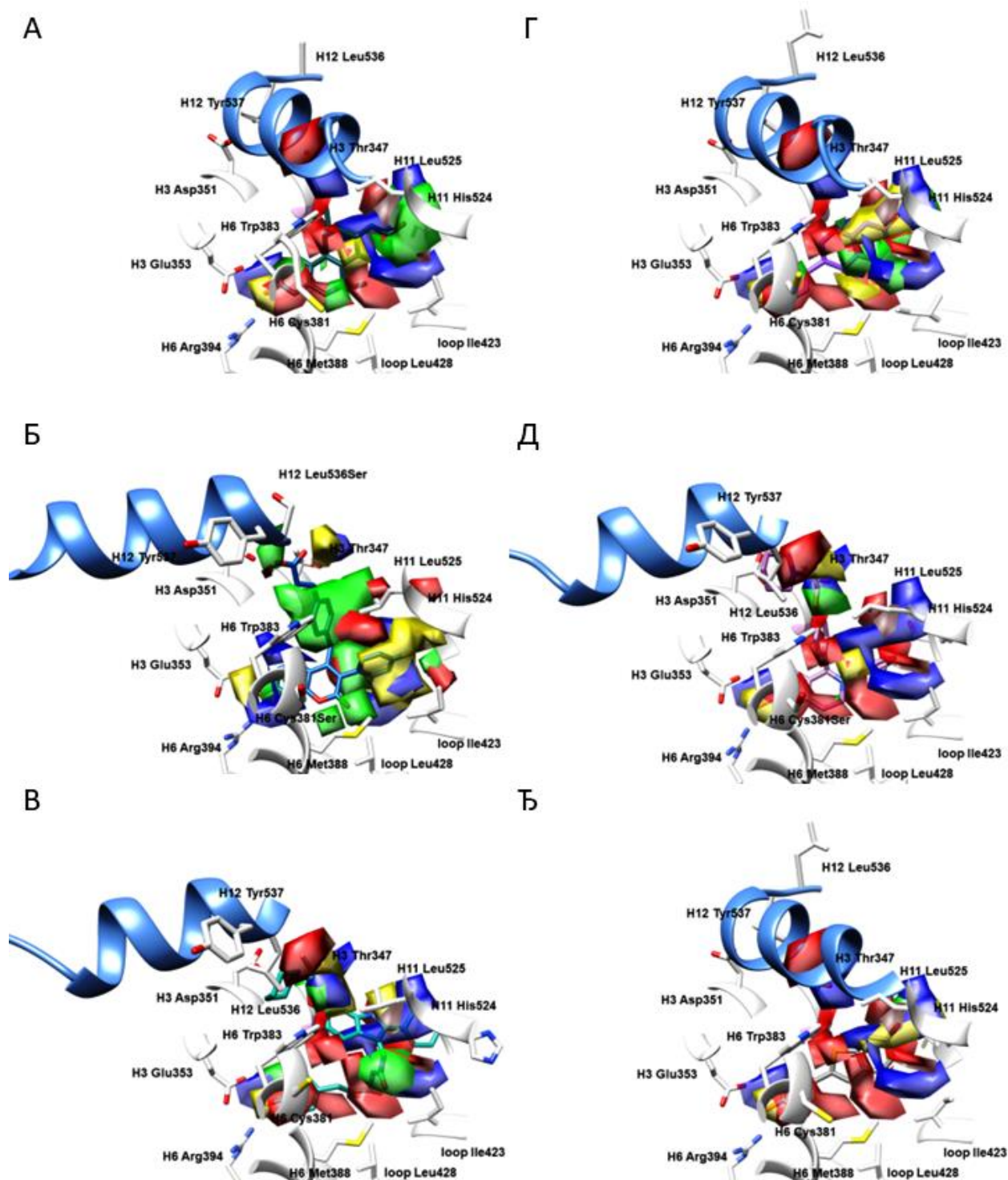
Г



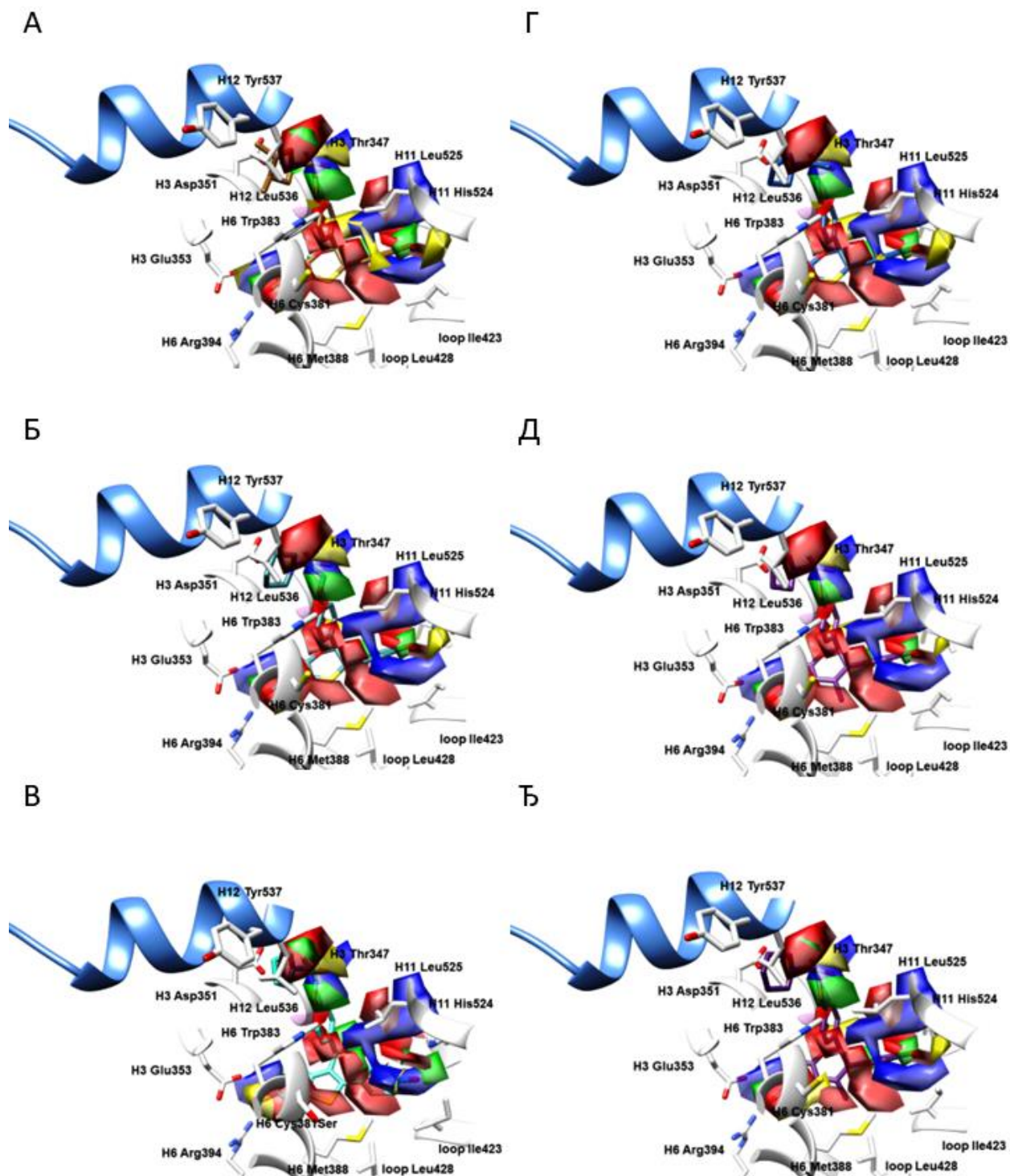
Слика ДМ30. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из NA пробе за **2QA6** (A); **1XQC** (Б); **2B1Z** (B); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



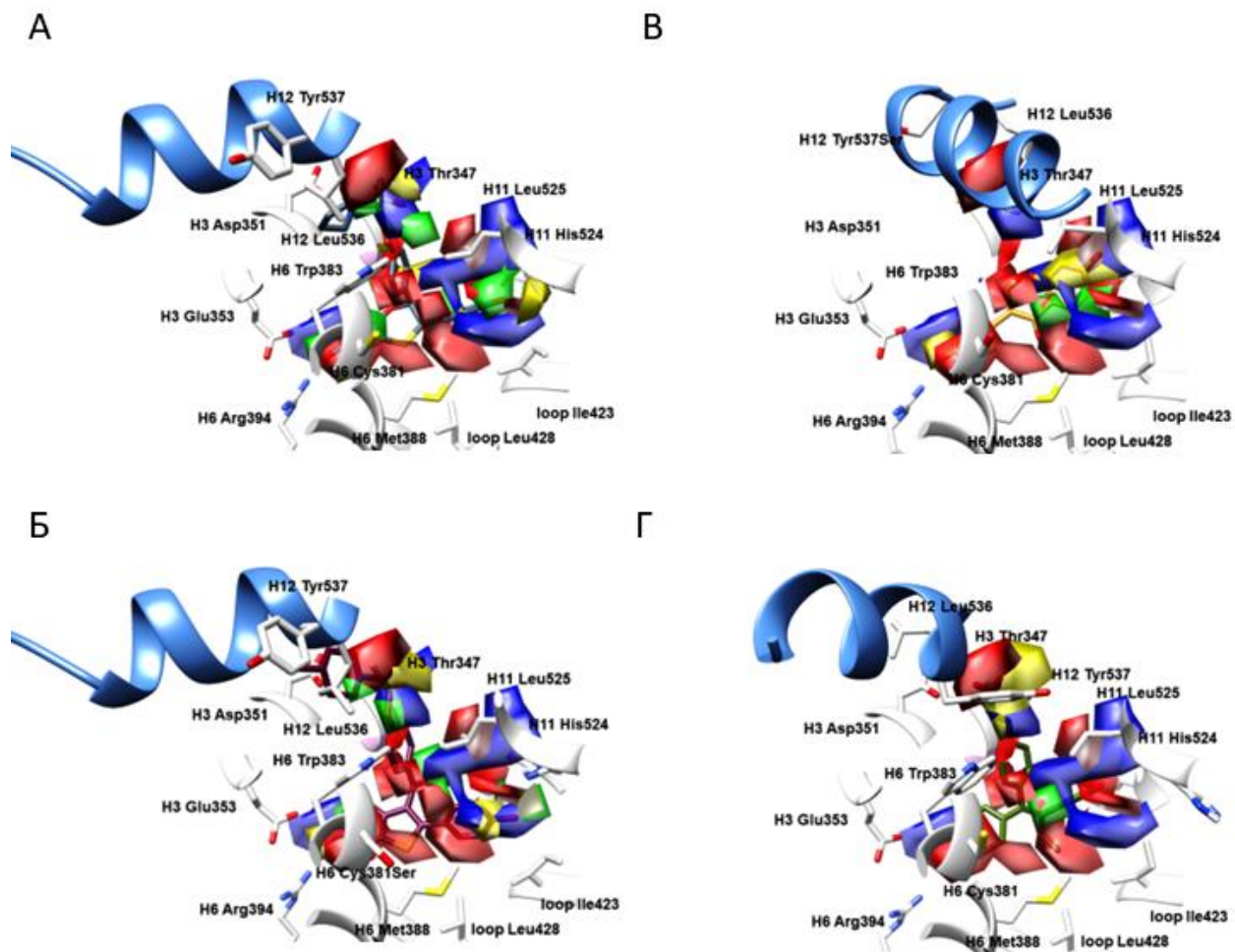
Слика ДМ31. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из е пробе за 1ERR (А); 3ERD (Б); 1XP1 (В); 1ERE (Г); 2IOK (Д); 2BJ4 (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ32. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из е пробе за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

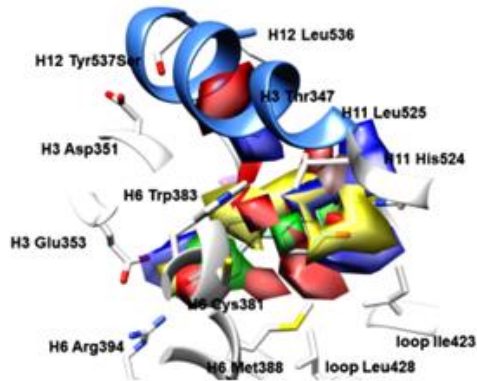


Слика ДМ33. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из е пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ф). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

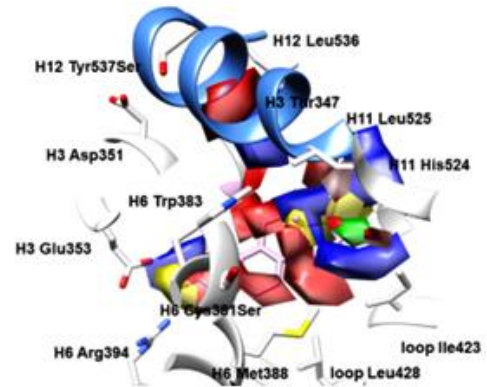


Слика ДМ34. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из е пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

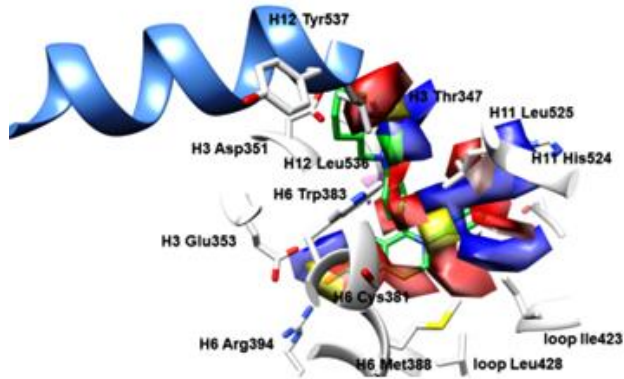
A



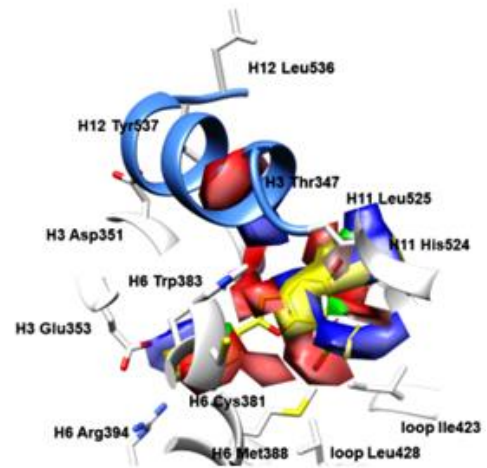
B



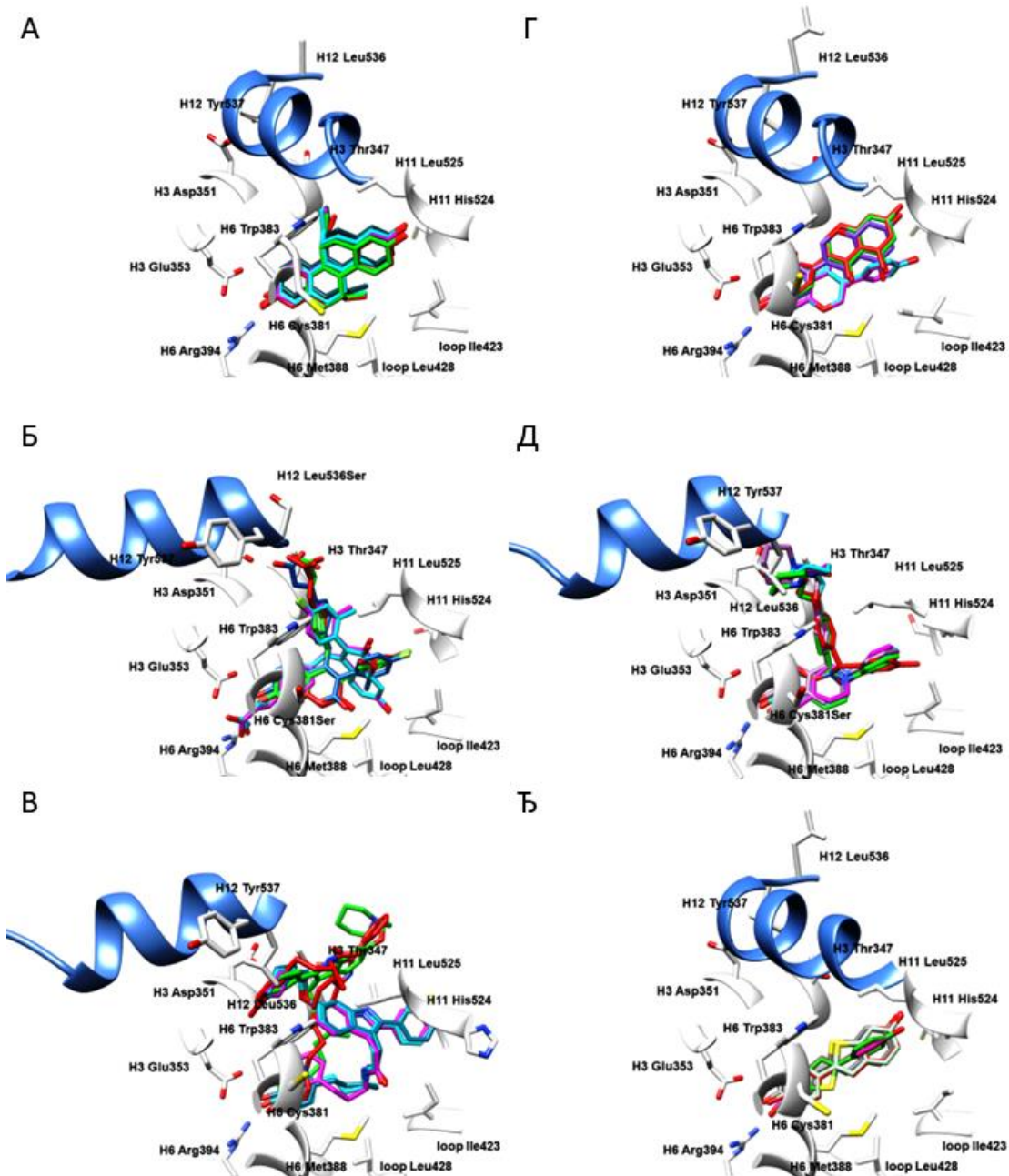
Б



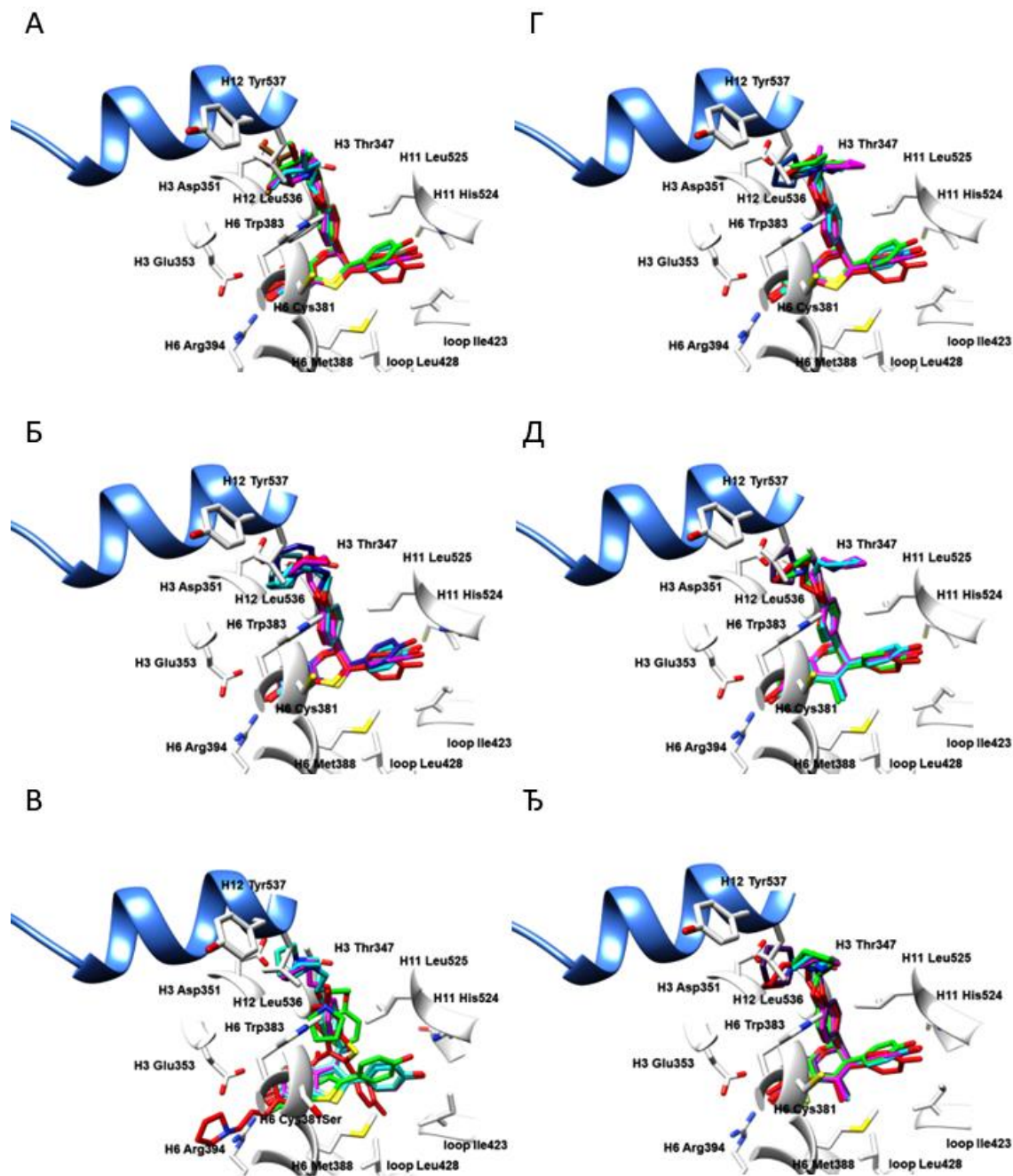
Г



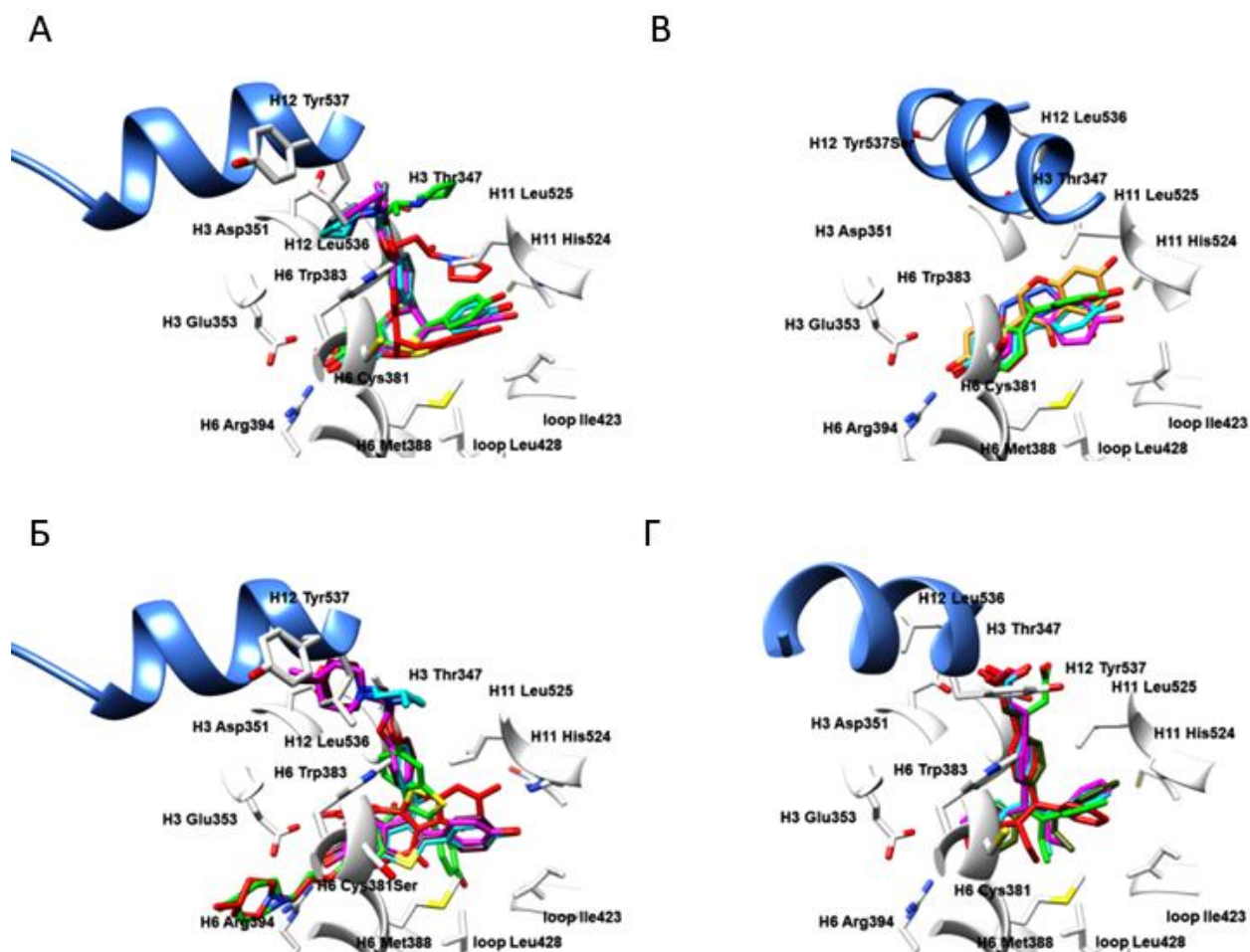
Слика ДМ35. Мапе PLS -коэффицијента (P_{PLS} -коэффицијенти, позитивни црвени, негативни плави) и поља стварних доприноса активности лиганда (L_{ACC} , позитивни зелени, негативни жути) генерисаних из е пробе за **2QA6** (A); **1XQC** (Б); **2B1Z** (B); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ36. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α помоћу програма Vina: **1L2I** (А); ЕС тамно плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **5AK2** (Б); ЕС тамно плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2IOG** (В); ЕС тамно зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1X7R** (Г); ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1UOM** (Д); ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; и **1GWQ** (Ђ) ЕС сива, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

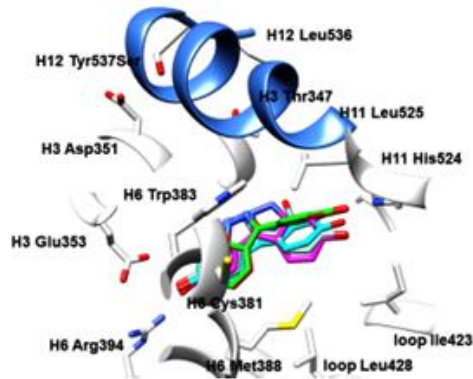


Слика ДМ37. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α помоћу програма Vina: **1XP6** (A); ЕС браон, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1SJ0** (Б); ЕС тамно плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2R6Y** (В); ЕС светло плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1XP9** (Г); ЕС плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1YIM** (Д); ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; и **1YIN** (Ђ) ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

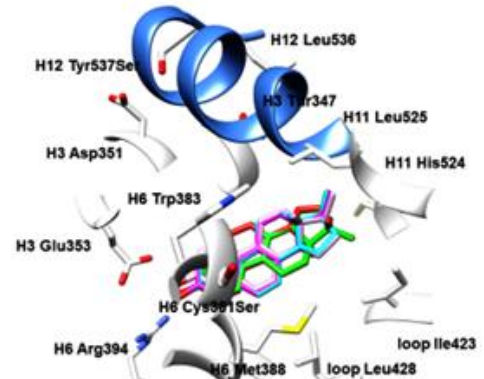


Слика ДМ38. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α помоћу програма Vina: **1XPC** (A); EC сива, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2R6W** (Б); EC тамно црвена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2QA8** (B); EC наранџаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; и **1R5K** (Г) EC тамно зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

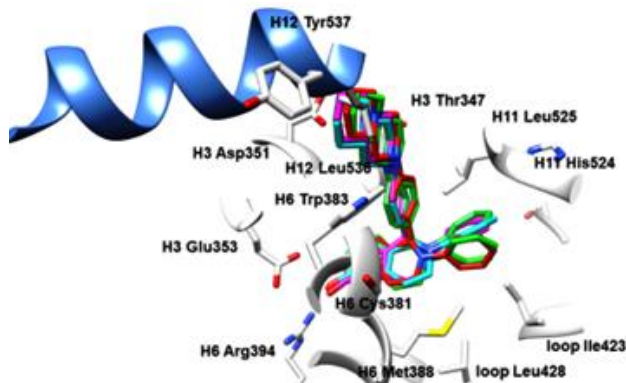
A



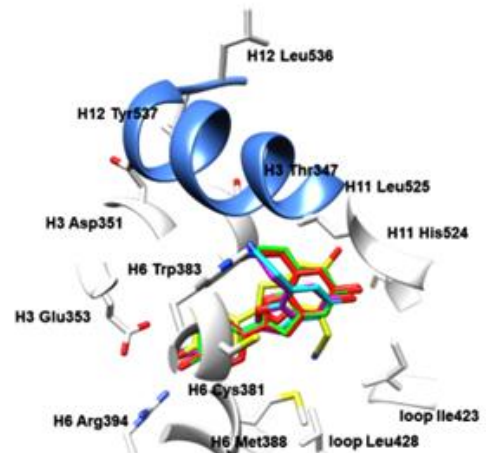
B



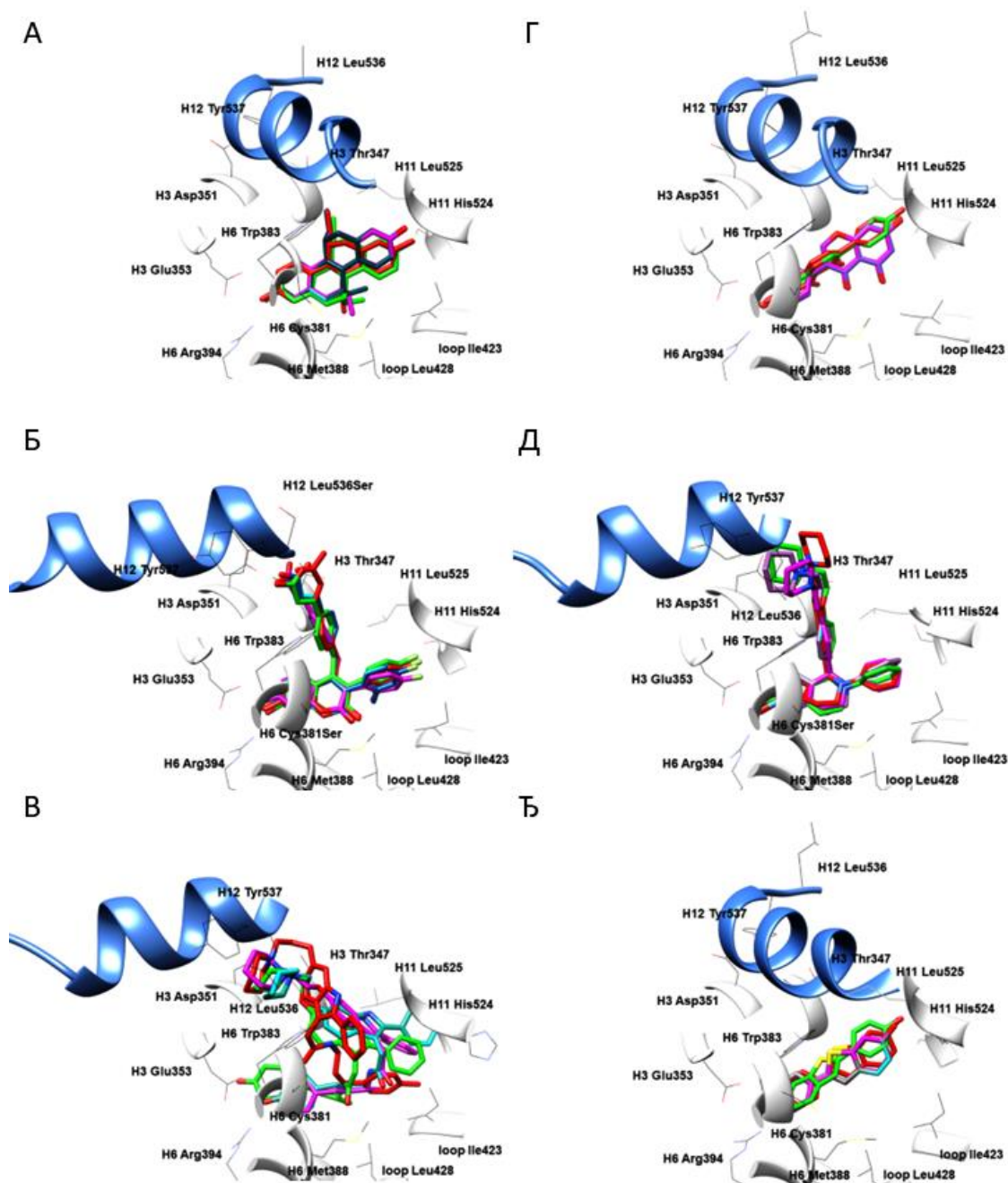
Б



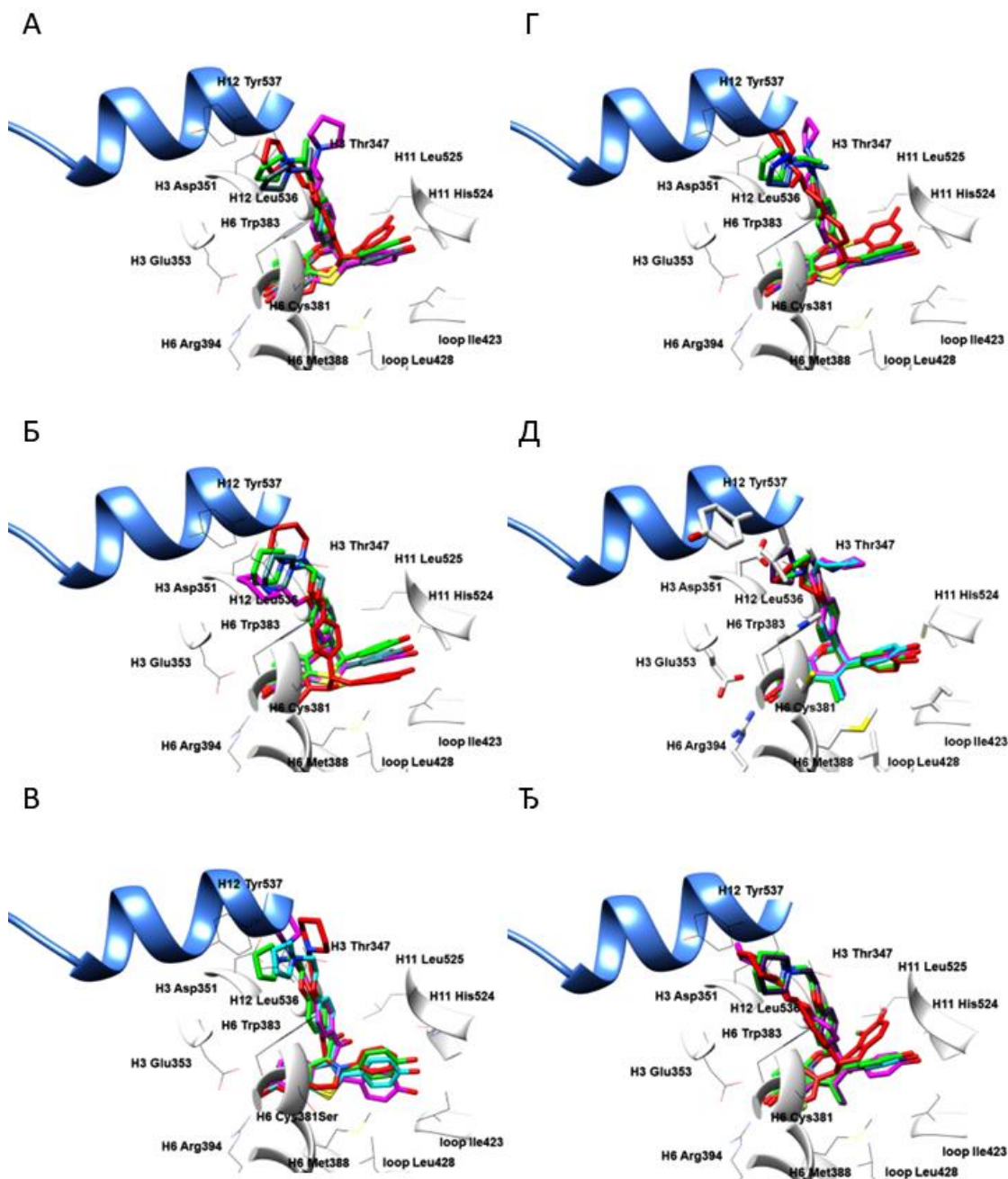
Г



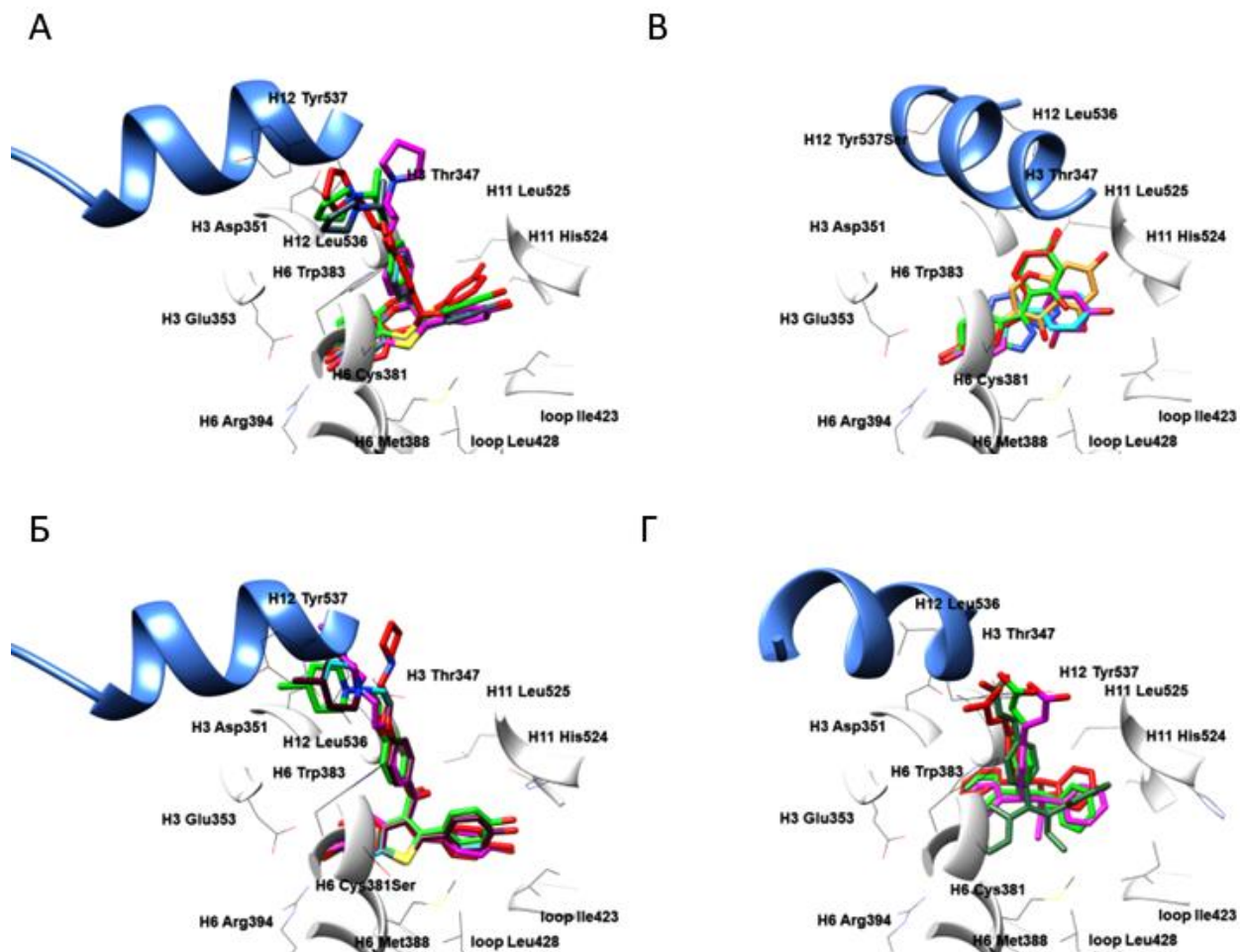
Слика ДМ39. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α помоћу програма Vina: **2QA6** (A); ЕС светло плава, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **1XQC** (Б); ЕС светло зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2B1Z** (B); ЕС светло розе, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; и **1X7E** (Г) ЕС жута, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ40. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру ER α , помоћу програмског пара Obconformer/Open3DALIGN: **1L2I** (A); EC тамно плава, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **5AK2** (Б); EC тамно плава, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **2IOG** (B); EC тамно зелена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1X7R** (Г); EC љубичаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1UOM** (Д); EC љубичаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; и **1GWQ** (Ђ) EC сива, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

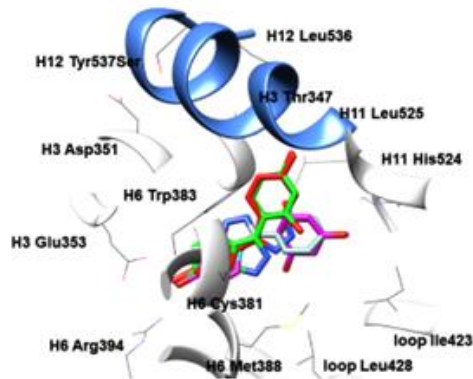


Слика ДМ41. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру ER α , помоћу програмског пара Obconformer/Open3DALIGN: **1XP6** (A); EC браон, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCD зелена, RCCA црвена; **1SJ0** (Б); EC тамно плава, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **2R6Y** (B); EC светло плава, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1XP9** (Г); EC плава, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1YIM** (Д); EC љубичаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; и **1YIN** (Ђ) EC љубичаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

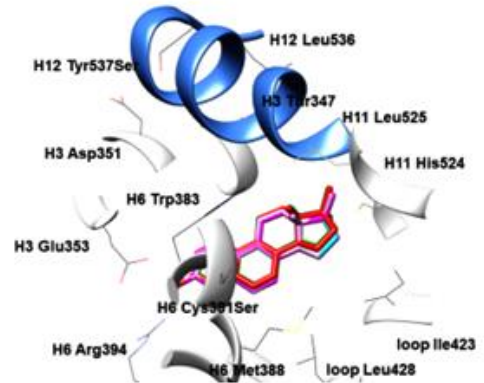


Слика ДМ42. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру ER α , помоћу програмског пара Obconformer/Open3DALIGN: **1XPC** (A); EC сива, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **2R6W** (B); EC тамно црвена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **2QA8** (B); EC наранџаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; и **1R5K** (Г) EC тамно зелена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

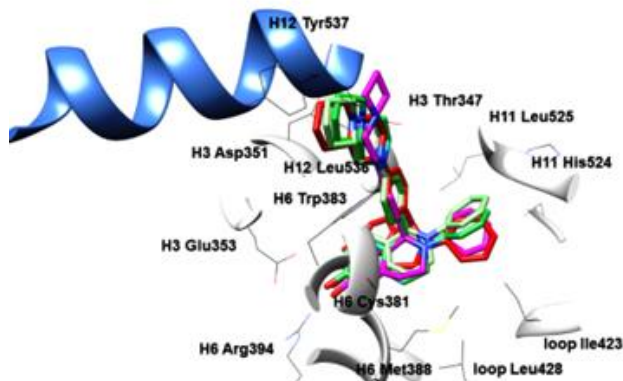
A



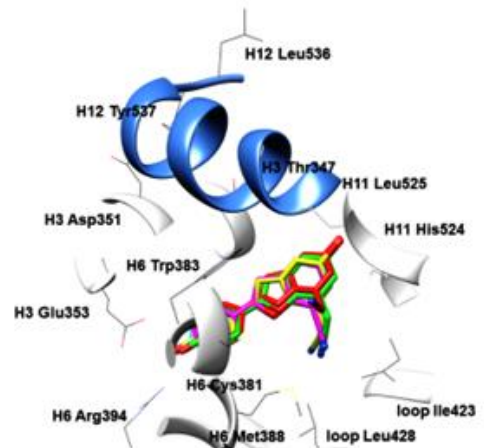
B



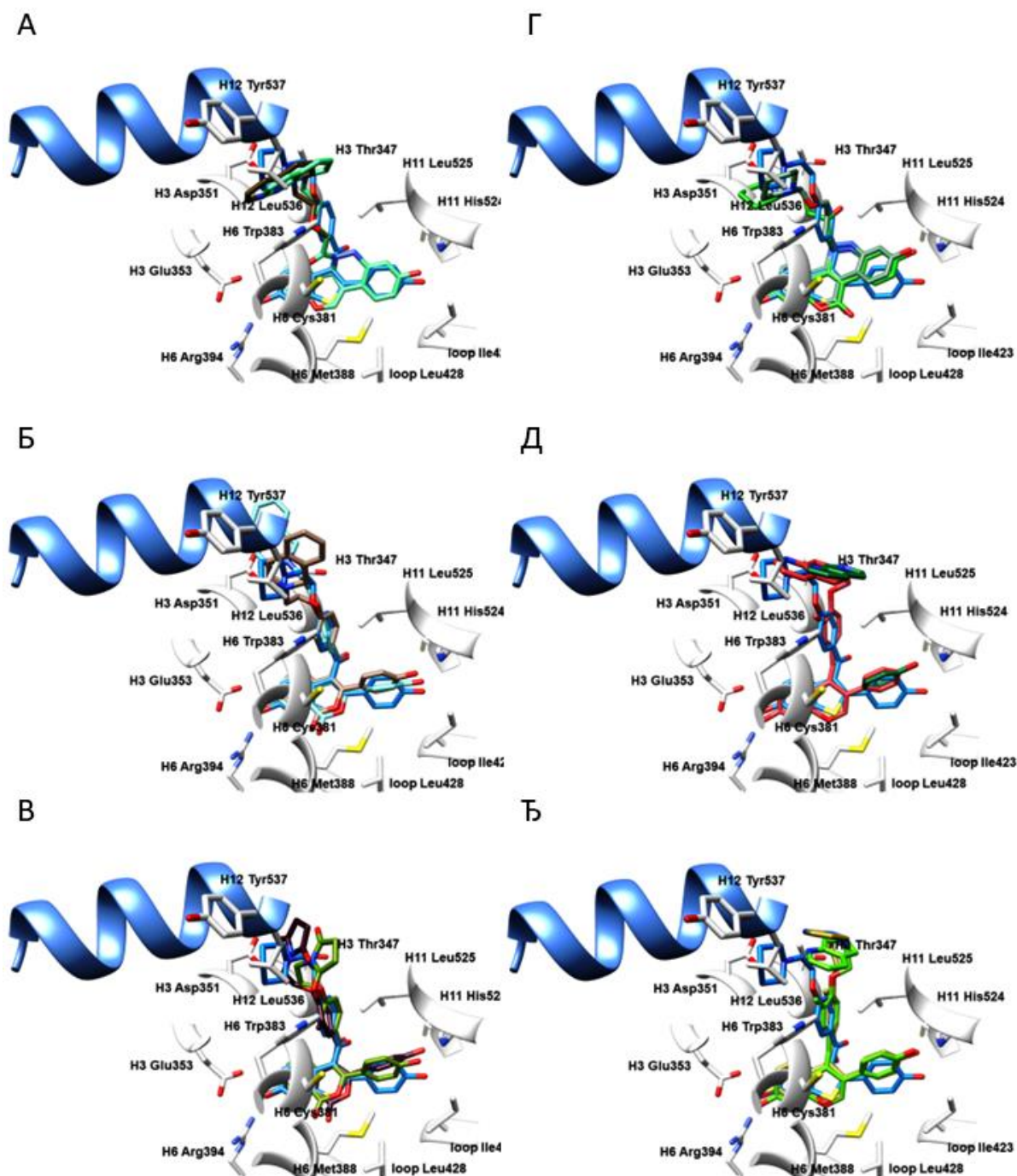
Б



Г



Слика ДМ43. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру ER α , помоћу програмског пара Obconformer/Open3DALIGN: **2QA6** (A); EC светло плава, ECRA б светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1XQC** (Б); EC светло зелена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **2B1Z** (B); EC светло розе, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; и **1X7E** (Г) EC жута, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ44. Преклапање између дизајнираних једињења **3DQ-1e** (А); SBC љубичаста, LBC тамно зелена; **3DQ-1c** (Б); SBC црвена, LBC љубичаста; **3DQ-2c** (В); SBC зелена, LBC браон; **3DQ-3a** (Г); SBC браон, LBC плава; **3DQ-1d** (Д); SBC зелена, LBC тамно црвена; **3DQ-2d** (Ђ). SBC наранџаста, LBC жута; и **1ERE**, ЕС плава, унутар ER α активног центра. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом

Додатни материјал II
за ДОКТОРСКУ ДИСЕРТАЦИЈУ:
*Антагонисти естроген рецептора α : Рационални
дизајн нових супресаната рака дојке базиран на 3-D
QSAR, COMBINEr и 3-D фармакофорним
студијама*

Садржај

- Слика ДМ1. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-A1**.
Слика ДМ2. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-A1**.
Слика ДМ3. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-A1**.
Слика ДМ4. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A1**.
Слика ДМ5. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-A2**.
Слика ДМ6. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-A2**.
Слика ДМ7. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-A2**.
Слика ДМ8. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A2**.
Слика ДМ9. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-A2-I**.
Слика ДМ10. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-A2-I**.
Слика ДМ11. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A2-I**.
Слика ДМ12. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-A2-II**.
Слика ДМ13. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-A2-II**.
Слика ДМ14. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A2-II**.
Слика ДМ15. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-A3**.
Слика ДМ16. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-A3**.
Слика ДМ17. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-A3**.
Слика ДМ18. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A3**.
Слика ДМ19. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a**.
Слика ДМ20. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a**.
Слика ДМ21. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a**.
Слика ДМ22. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a**.
Слика ДМ23. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a***.
Слика ДМ24. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a***.
Слика ДМ25. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a***.
Слика ДМ26. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a***.
Слика ДМ27. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-1a**.
Слика ДМ28. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-1a**.
Слика ДМ29. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1a**.
Слика ДМ30. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1a**.
Слика ДМ31. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-1a***.
Слика ДМ32. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-1a***.
Слика ДМ33. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1a***.
Слика ДМ34. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1a***.
Слика ДМ35. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-R2a**.
Слика ДМ36. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-R2a**.
Слика ДМ37. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R2a**.
Слика ДМ38. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-R2a**.
Слика ДМ39. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a**.
Слика ДМ40. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a**.
Слика ДМ41. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a**.
Слика ДМ42. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a**.
Слика ДМ43. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a***.
Слика ДМ44. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a***.

Слика ДМ45. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a** *.
Слика ДМ46. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a** *.
Слика ДМ47. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-2a**.
Слика ДМ48. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-2a**.
Слика ДМ49. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-2a**.
Слика ДМ50. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-2a**.
Слика ДМ51. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-2a** *.
Слика ДМ52. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-2a** *.
Слика ДМ53. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-2a** *.
Слика ДМ54. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-2a** *.
Слика ДМ55. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R3a**.
Слика ДМ56. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R3a**.
Слика ДМ57. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DQ-R3a**.
Слика ДМ58. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R3a**.
Слика ДМ59. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-R3a**.
Слика ДМ60. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-R3a**.
Слика ДМ61. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R3a**.
Слика ДМ62. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-R3a**.
Слика ДМ63. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a**.
Слика ДМ64. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a**.
Слика ДМ65. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a**.
Слика ДМ66. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a**.
Слика ДМ67. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a** *.
Слика ДМ68. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a** *.
Слика ДМ69. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a** *.
Слика ДМ70. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a** *.
Слика ДМ71. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-3a**.
Слика ДМ72. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-3a**.
Слика ДМ73. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-3a**.
Слика ДМ74. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-3a**.
Слика ДМ75. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-3a** *.
Слика ДМ76. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-3a** *.
Слика ДМ77. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-3a** *.
Слика ДМ78. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-3a** *.
Слика ДМ79. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-A4**.
Слика ДМ80. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-A4**.
Слика ДМ81. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-A4**.
Слика ДМ82. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A4**.
Слика ДМ83. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-R4a)**.
Слика ДМ84. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-R4a)**.
Слика ДМ85. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-R4a)**.
Слика ДМ86. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R4a**.
Слика ДМ87. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R4a**.
Слика ДМ88. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R4a**.
Слика ДМ89. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-R4a**.
Слика ДМ90. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-R4a**.

Слика ДМ91. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R4a**.
Слика ДМ92. ^{17}O NMR **3DQ-R4a**.
Слика ДМ93. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-4a**.
Слика ДМ94. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-4a**.
Слика ДМ95. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-4a**.
Слика ДМ96. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-4a**.
Слика ДМ97. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-4a**.
Слика ДМ98. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-4a**.
Слика ДМ99. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-4a**.
Слика ДМ100. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-4a**.
Слика ДМ101. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR1)**.
Слика ДМ102. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR1)**.
Слика ДМ103. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR1)**.
Слика ДМ104. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR1)**.
Слика ДМ105. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR2)**.
Слика ДМ106. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR2)**.
Слика ДМ107. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR2)**.
Слика ДМ108. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR2)**.
Слика ДМ109. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR1**.
Слика ДМ110. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR1**.
Слика ДМ111. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR1**.
Слика ДМ112. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR1**.
Слика ДМ113. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR2**.
Слика ДМ114. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR2**.
Слика ДМ115. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR2**.
Слика ДМ116. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR2**.
Слика ДМ117. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RR1**.
Слика ДМ118. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RR1**.
Слика ДМ119. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RR1**.
Слика ДМ120. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RR1**.
Слика ДМ121. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RR2**.
Слика ДМ122. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RR2**.
Слика ДМ123. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RR2**.
Слика ДМ124. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RR2**.
Слика ДМ125. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RB1**.
Слика ДМ126. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RB1**.
Слика ДМ127. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RB1**.
Слика ДМ128. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RB1**.
Слика ДМ129. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RB2**.
Слика ДМ130. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RB2**.
Слика ДМ131. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RB2**.
Слика ДМ132. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RB2**.
Слика ДМ133. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RB3**.
Слика ДМ134. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RB3**.
Слика ДМ135. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RB3**.
Слика ДМ136. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RB3**.

Слика ДМ183. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-C3-4**.
Слика ДМ184. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-C3-4**.
Слика ДМ185. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-C3-4**.
Слика ДМ186. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-C3-4**.
Слика ДМ187. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1c**.
Слика ДМ188. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1c**.
Слика ДМ189. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1c**.
Слика ДМ190. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1c**.
Слика ДМ191. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2c**.
Слика ДМ192. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2c**.
Слика ДМ193. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2c**.
Слика ДМ194. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2c**.
Слика ДМ195. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-1c**.
Слика ДМ196. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-1c**.
Слика ДМ197. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1c**.
Слика ДМ198. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1c**.
Слика ДМ199. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-2c**.
Слика ДМ200. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-2c**.
Слика ДМ201. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-2c**.
Слика ДМ202. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-2c**.
Слика ДМ203. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-R1d**.
Слика ДМ204. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-R1d**.
Слика ДМ205. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R1d**.
Слика ДМ206. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RD3**.
Слика ДМ207. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RD3**.
Слика ДМ208. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RD3**.
Слика ДМ209. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RD3**.
Слика ДМ210. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-D1**.
Слика ДМ211. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-D1**.
Слика ДМ212. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-D1**.
Слика ДМ213. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-D2**.
Слика ДМ214. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-D2**.
Слика ДМ215. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-D2**.
Слика ДМ216. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-D3**.
Слика ДМ217. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-D3**.
Слика ДМ218. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-D3**.
Слика ДМ219. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1d,2d**.
Слика ДМ220. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1d,2d**.
Слика ДМ221. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1d,2d**.
Слика ДМ222. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-1d**.
Слика ДМ223. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-1d**.
Слика ДМ224. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1d**.
Слика ДМ225. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1d**.
Слика ДМ226. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-2d**.
Слика ДМ227. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-2d**.
Слика ДМ228. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-2d**.

Слика ДМ229. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-2d**.
Слика ДМ230. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-E1**.
Слика ДМ231. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-E1**.
Слика ДМ232. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-E1**.
Слика ДМ233. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-E1**.
Слика ДМ234. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E**.
Слика ДМ235. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E**.
Слика ДМ236. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E**.
Слика ДМ237. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E***.
Слика ДМ238. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E***.
Слика ДМ239. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E***.
Слика ДМ240. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E**.
Слика ДМ241. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E**.
Слика ДМ242. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E**.
Слика ДМ243. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E**.
Слика ДМ244. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E***.
Слика ДМ245. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E***.
Слика ДМ246. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E***.
Слика ДМ247. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E***.
Слика ДМ248. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-E1**.
Слика ДМ249. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-E1**.
Слика ДМ250. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-E1**.
Слика ДМ251. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-E1**.
Слика ДМ252. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-E2**.
Слика ДМ253. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-E2**.
Слика ДМ254. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-E2**.
Слика ДМ255. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-E2**.
Слика ДМ256. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-E3**.
Слика ДМ257. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-E3**.
Слика ДМ258. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-E3**.
Слика ДМ259. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-E3**.
Слика ДМ260. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-E3-I**.
Слика ДМ261. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-E3-I**.
Слика ДМ262. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-E3-I**.
Слика ДМ263. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-E3-II**.
Слика ДМ264. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-E3-II**.
Слика ДМ265. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-E3-II**.
Слика ДМ266. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-E4**.
Слика ДМ267. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-E4**.
Слика ДМ268. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-E4**.
Слика ДМ269. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-E4**.
Слика ДМ270. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e**.
Слика ДМ271. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e**.
Слика ДМ272. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e**.
Слика ДМ273. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e**.
Слика ДМ274. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e***.

Слика ДМ275. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e***.

Слика ДМ276. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e***.

Слика ДМ277. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e***.

Слика ДМ278. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-1e**.

Слика ДМ279. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-1e**.

Слика ДМ280. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1e**.

Слика ДМ281. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1e**.

Слика ДМ282. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-1e***.

Слика ДМ283. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-1e***.

Слика ДМ284. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1e***.

Слика ДМ285. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1e***.

Слика ДМ286. HPLC спектар једињења **3DQ-1a**.

Слика ДМ287. HPLC спектар једињења **3DQ-2a**.

Слика ДМ288. HPLC спектар једињења **3DQ-3a**.

Слика ДМ289. HPLC спектар једињења **3DQ-4a**.

Слика ДМ290. HPLC спектар једињења **3DQ-1b**.

Слика ДМ291. HPLC спектар једињења **3DQ-2b**.

Слика ДМ292. HPLC спектар једињења **3DQ-3b**.

Слика ДМ293. HPLC спектар једињења **3DQ-1c**.

Слика ДМ294. HPLC спектар једињења **3DQ-2c**.

Слика ДМ295. HPLC спектар једињења **3DQ-1d**.

Слика ДМ296. HPLC спектар једињења **3DQ-2d**.

Слика ДМ297. HPLC спектар једињења **3DQ-1e**.

Слика ДМ298. Антагонизам естроген репептора α у присуству **3DQ-1e** (А); **3DQ-1c** (Б); **3DQ-2c** (В); **3DQ-3a** (Г); **3DQ-1d** (Д); **3DQ-2d** (Ђ).

Слика ДМ299. Антагонизам естроген репептора α у присуству **3DQ-2a*** (А); **3DQ-1a*** (Б); **3DQ-1e*** (В); **3DQ-3a*** (Г).

Слика ДМ300. Антагонизам естроген репептора β у присуству **3DQ-4a** (А); **3DQ-2a** (Б); **3DQ-1a** (В); **3DQ-1b** (Г); **3DQ-2b** (Д); **3DQ-3b** (Ђ).

Слика ДМ301. Антагонизам естроген репептора β у присуству **3DQ-1e** (А); **3DQ-1c** (Б); **3DQ-2c** (В); **3DQ-3a** (Г); **3DQ-1d** (Д); **3DQ-2d** (Ђ).

Слика ДМ302. Антагонизам естроген репептора β у присуству **3DQ-2a*** (А); **3DQ-1a*** (Б); **3DQ-1e*** (В); **3DQ-3a*** (Г).

Слика ДМ303. Биоактивне конформације **3DQ-1e** (А); **3DQ-1c** (Б); **3DQ-2c** (В); **3DQ-3a** (Г); **3DQ-1d** (Д); **3DQ-2d** (Ђ) унутар активног центра ER α . Аминокиселине су приказане белом бојом, хеликс H12 приказан је плавом бојом.

Слика ДМ304. Антипролиферативна активност **3DQ-1e** (А); **3DQ-1c** (Б); **3DQ-2c** (В); **3DQ-3a** (Г); **3DQ-1d** (Д); **3DQ-2d** (Ђ) против MCF-7 cell ћелијских линија.

Слика ДМ305. Антипролиферативна активност **3DQ-4a** (А); **3DQ-2a** (Б); **3DQ-1a** (В); **3DQ-1b** (Г); **3DQ-2b** (Д); **3DQ-3b** (Ђ) против MDA-MB-231 ћелијских линија.

Слика ДМ306. Антипролиферативна активност **3DQ-1e** (А); **3DQ-1c** (Б); **3DQ-2c** (В); **3DQ-3a** (Г); **3DQ-1d** (Д); **3DQ-2d** (Ђ) против MDA-MB-231 ћелијских линија.

Слика ДМ307. Антипролиферативна активност **3DQ-1e** (А); **3DQ-1c** (Б); **3DQ-2c** (В); **3DQ-3a** (Г); **3DQ-1d** (Д); **3DQ-2d** (Ђ) против Ishikawa ћелијских линија.

Слика ДМ308. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-2a** у концентрацији од 0,1 nM (А); E₂ у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији

концентрацији од 1 nM (Б); **4-ОНТ** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Слика ДМ318. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-2d** у концентрацији од 1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-ОНТ** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-2d** у концентрацији од 10 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОНТ** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

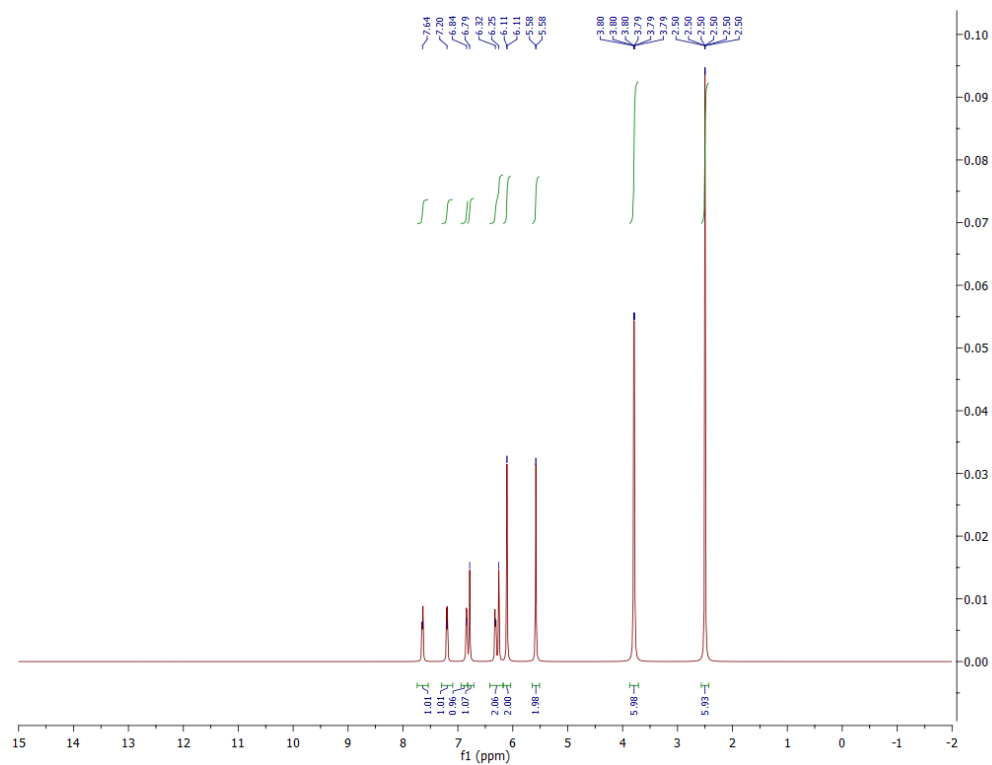
Слика ДМ319. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-2a** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-2a** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.

Слика ДМ320. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-1a** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-1a** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.

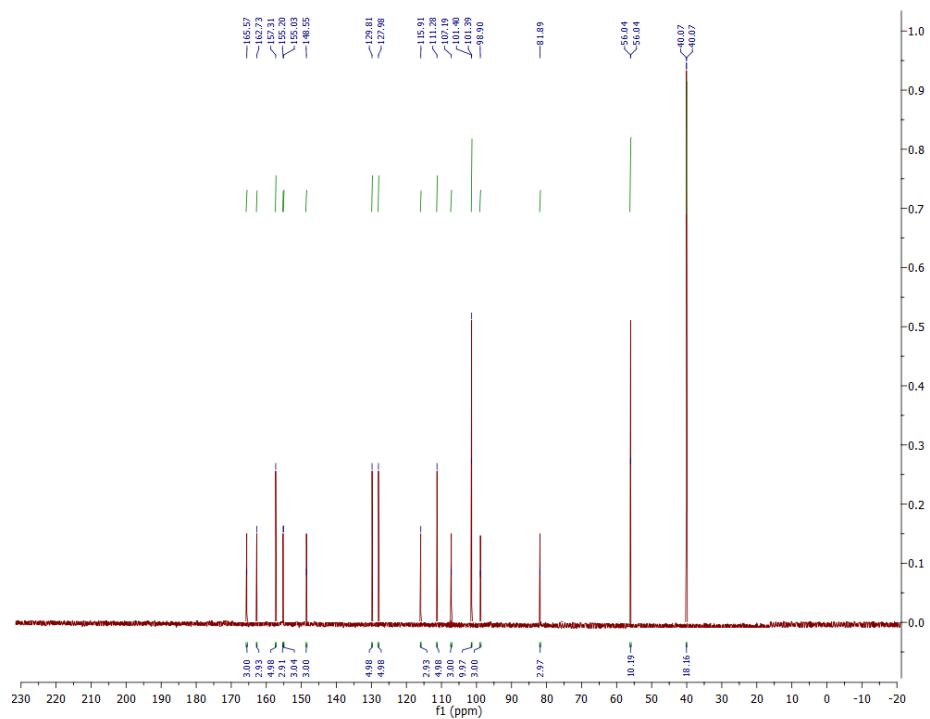
Слика ДМ321. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-1b** у концентрацији од 5 mg/kg

Табела ДМ1. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз биохемијске маркере серума.

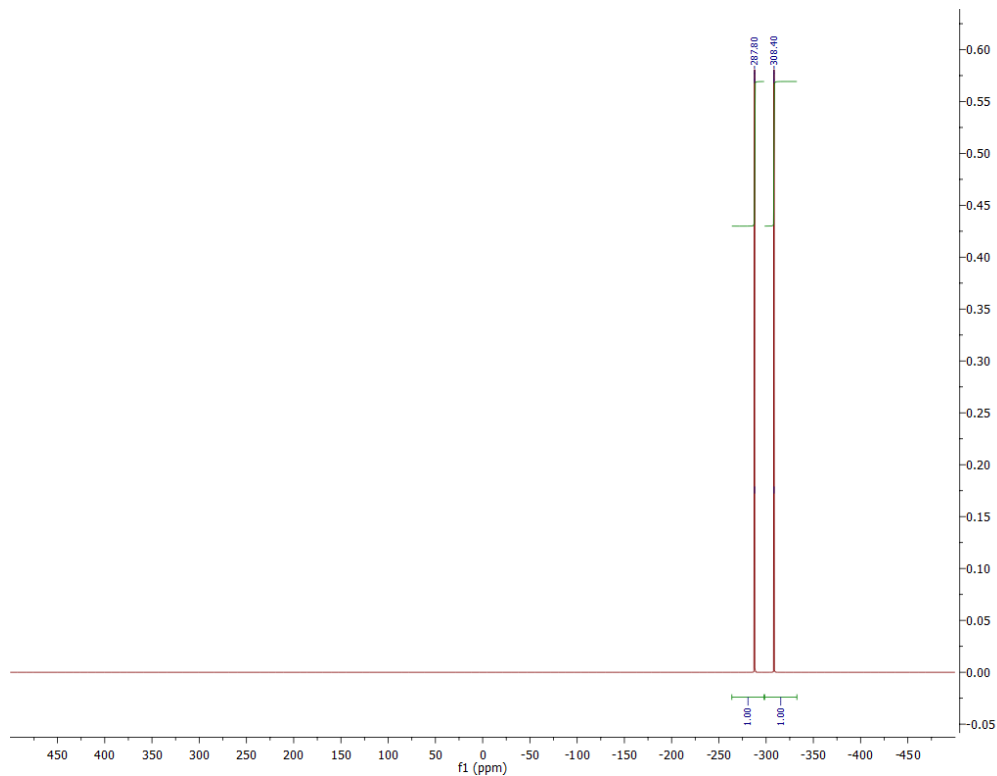
Табела ДМ2. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз маркере оксидативног оштећења јетре.



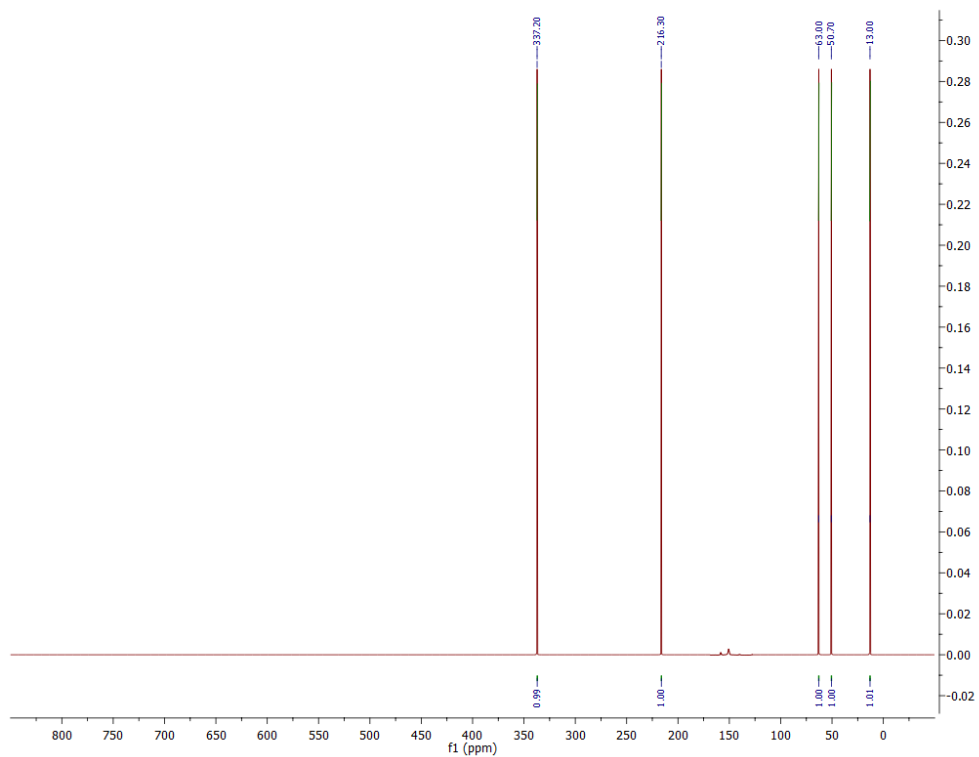
Слика ДМ1. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-A1.



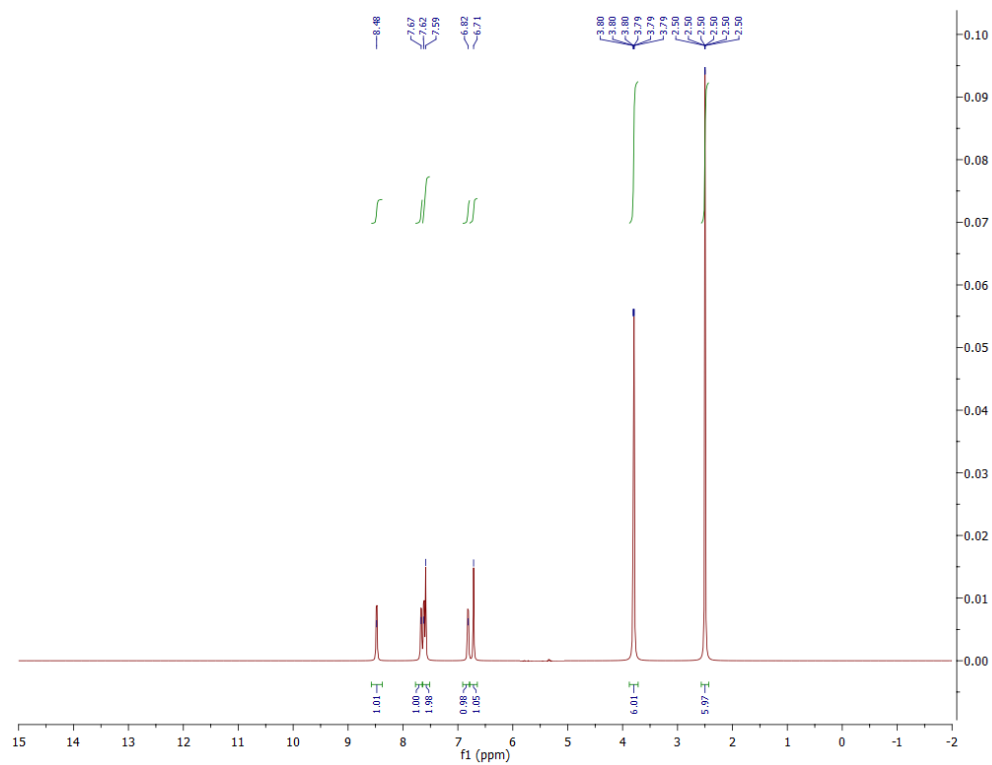
Слика ДМ2. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-A1.



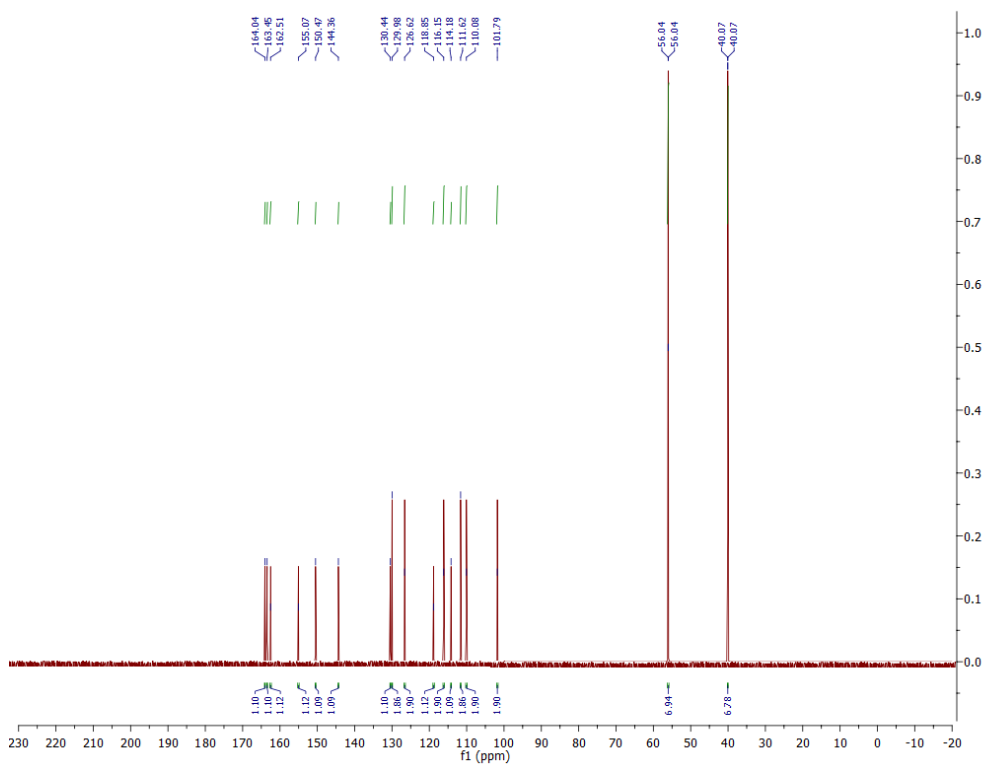
Слика ДМ3. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-A1**.



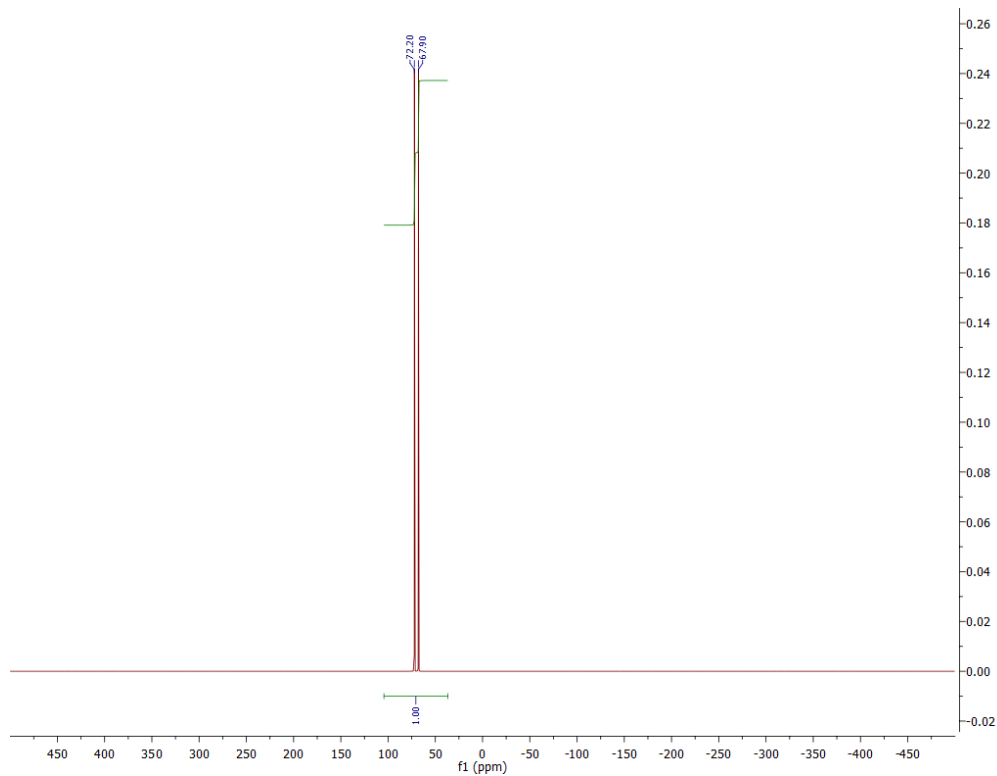
Слика ДМ4. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A1**.



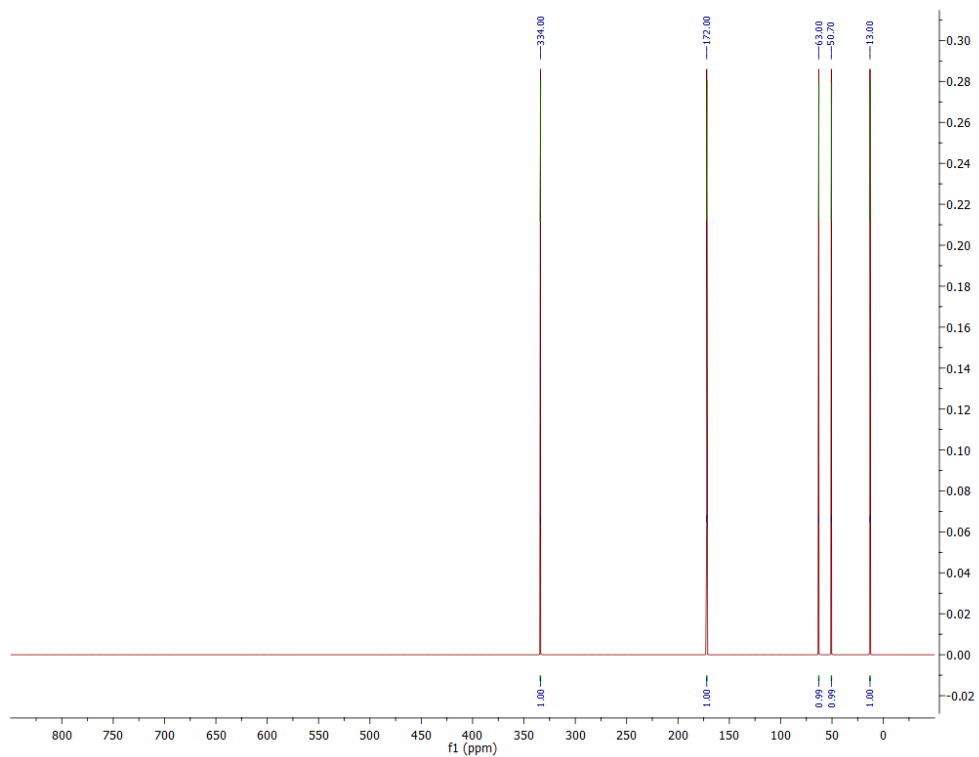
Слика ДМ5. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-A2**.



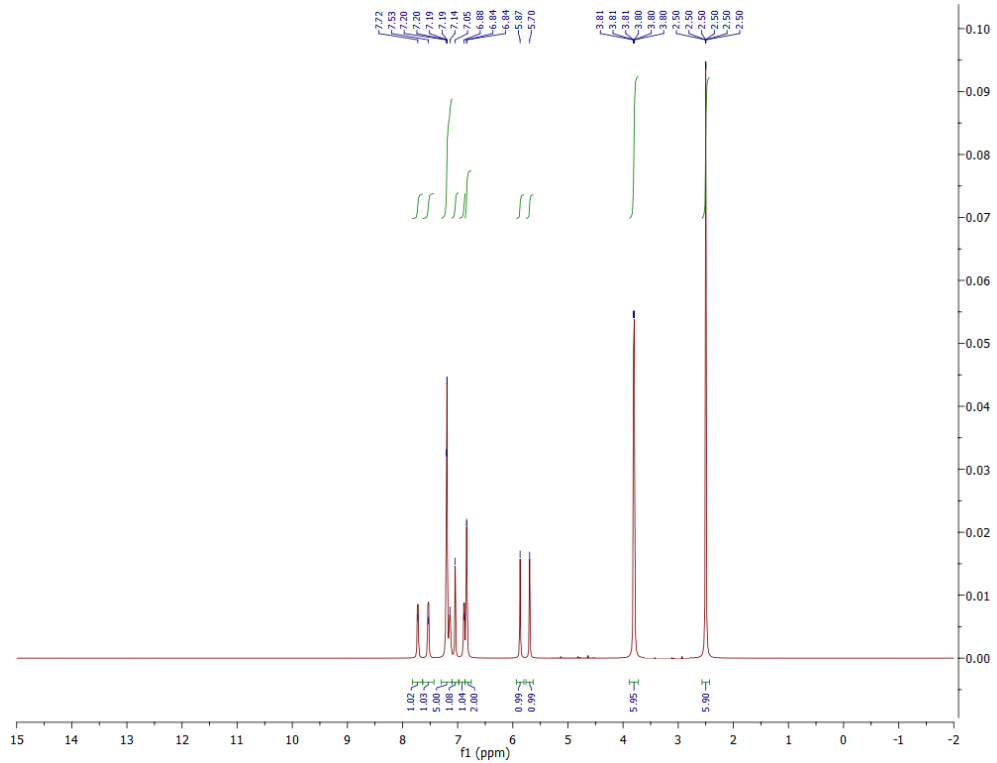
Слика ДМ6. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-A2**.



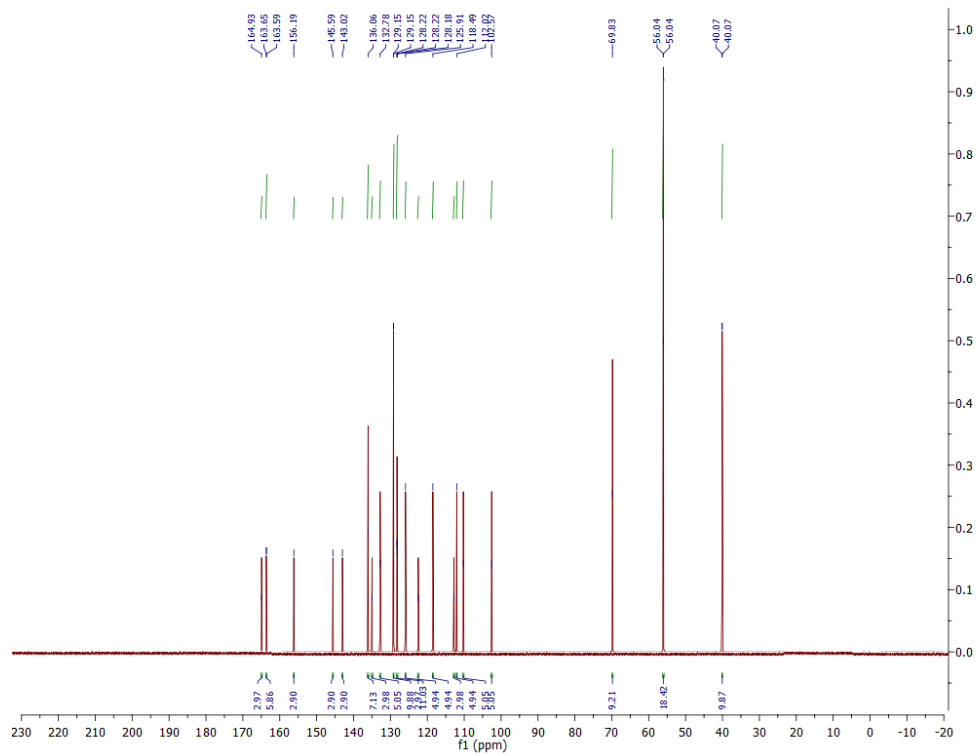
Слика ДМ7. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-A2**.



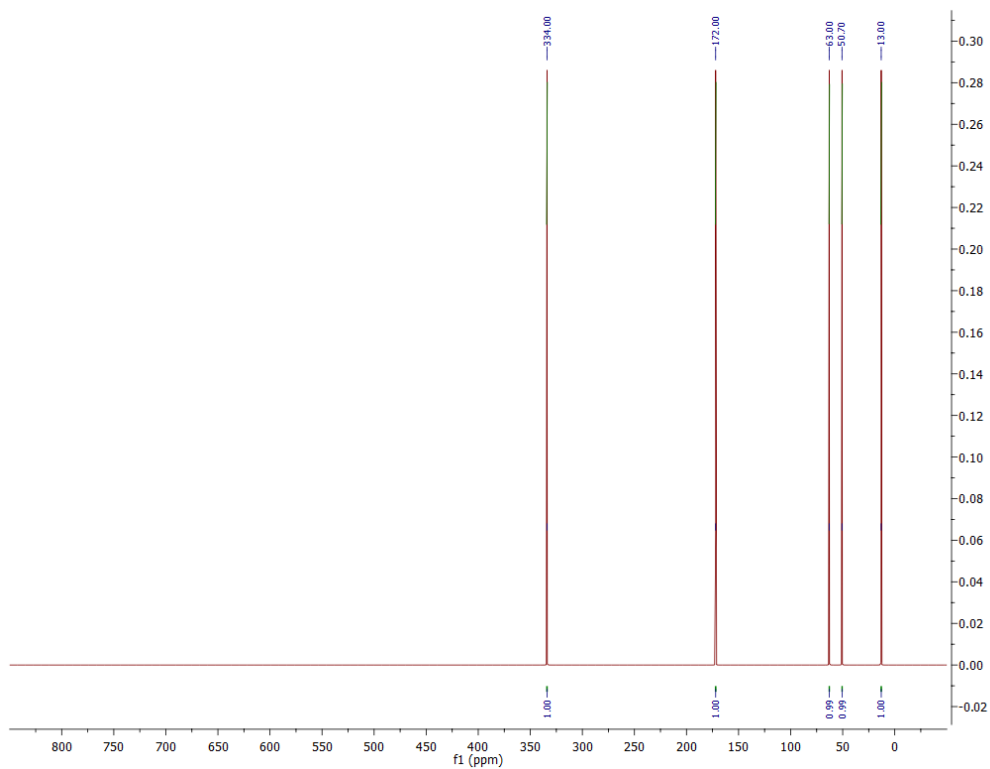
Слика ДМ8. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A2**.



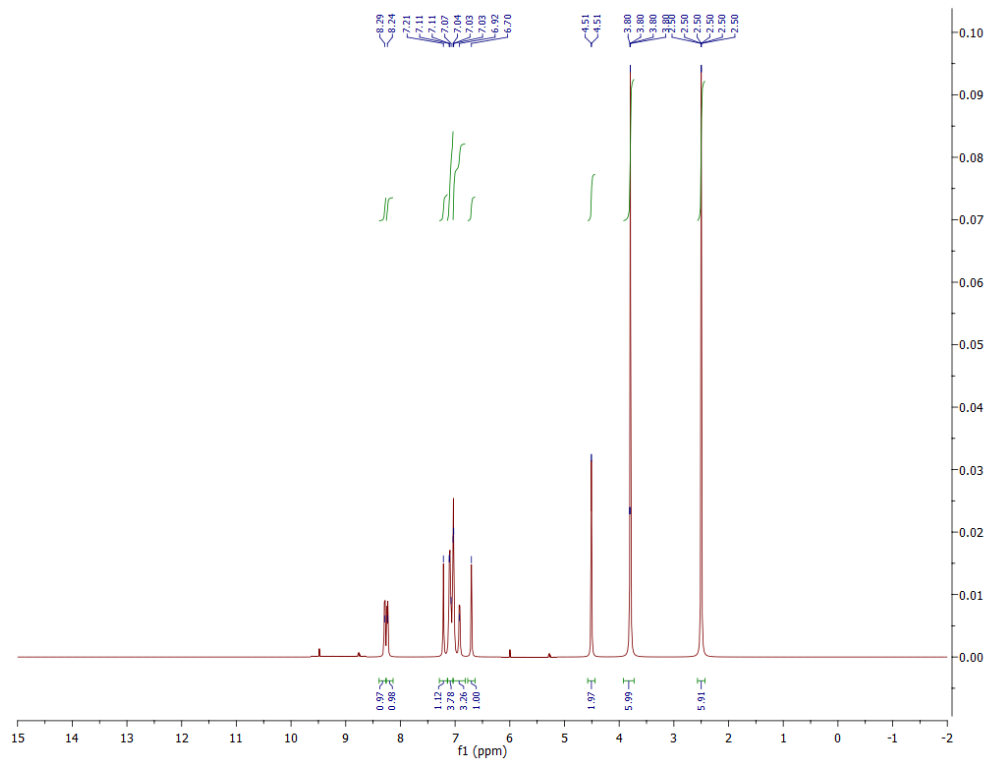
Слика ДМ9. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-A2-I**.



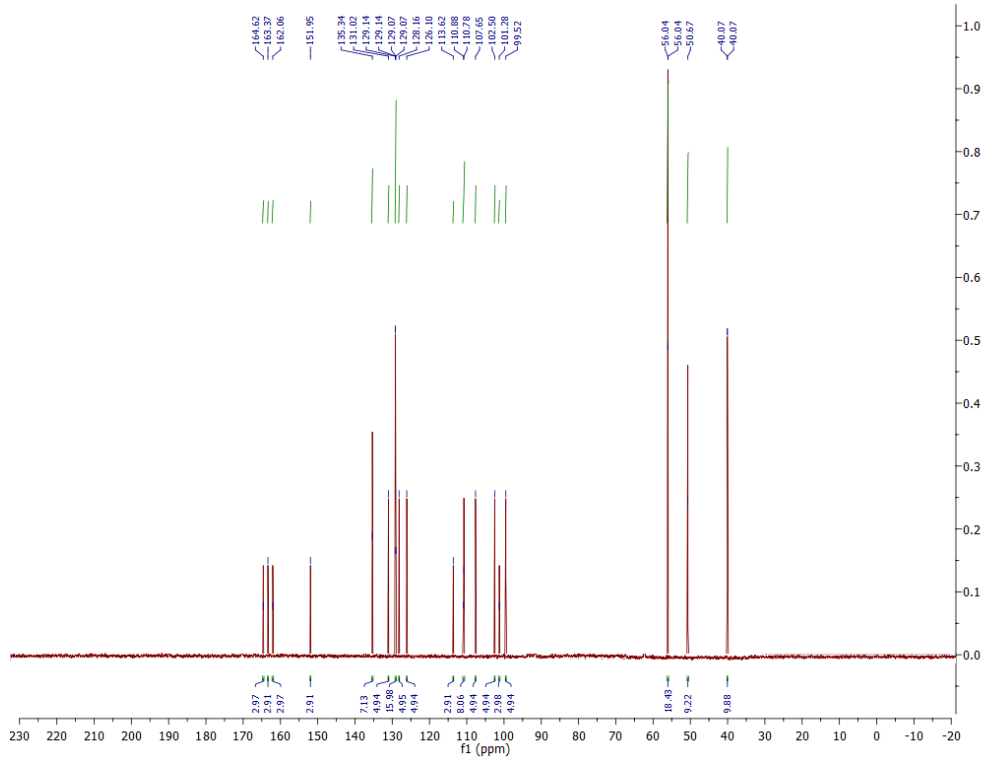
Слика ДМ10. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-A2-I**.



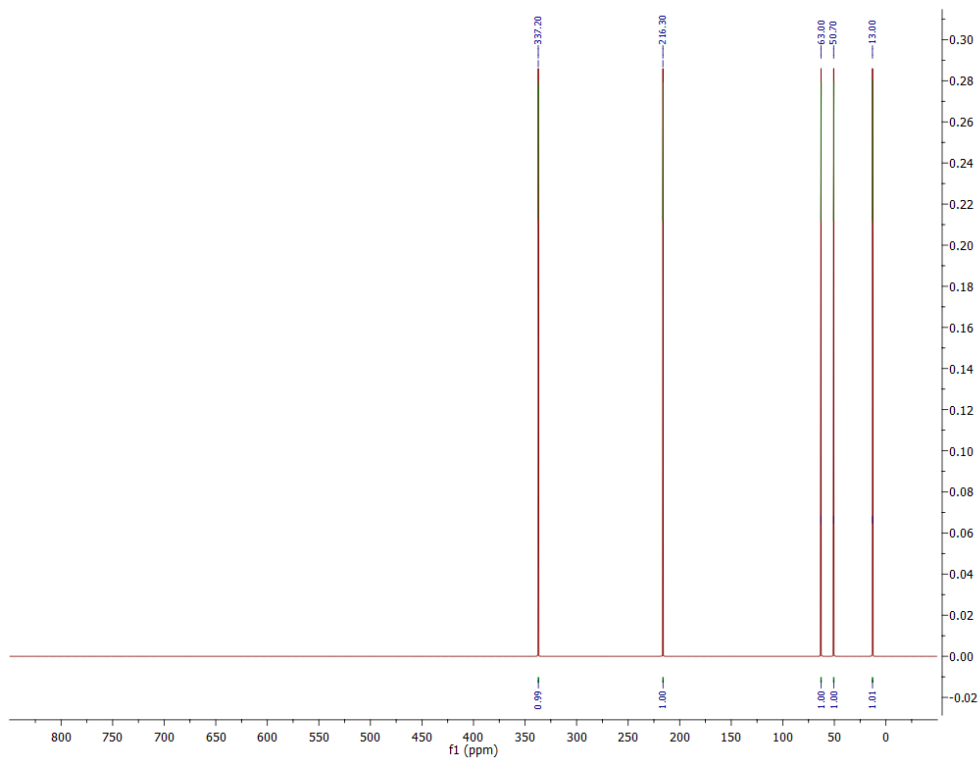
Слика ДМ11. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A2-I**.



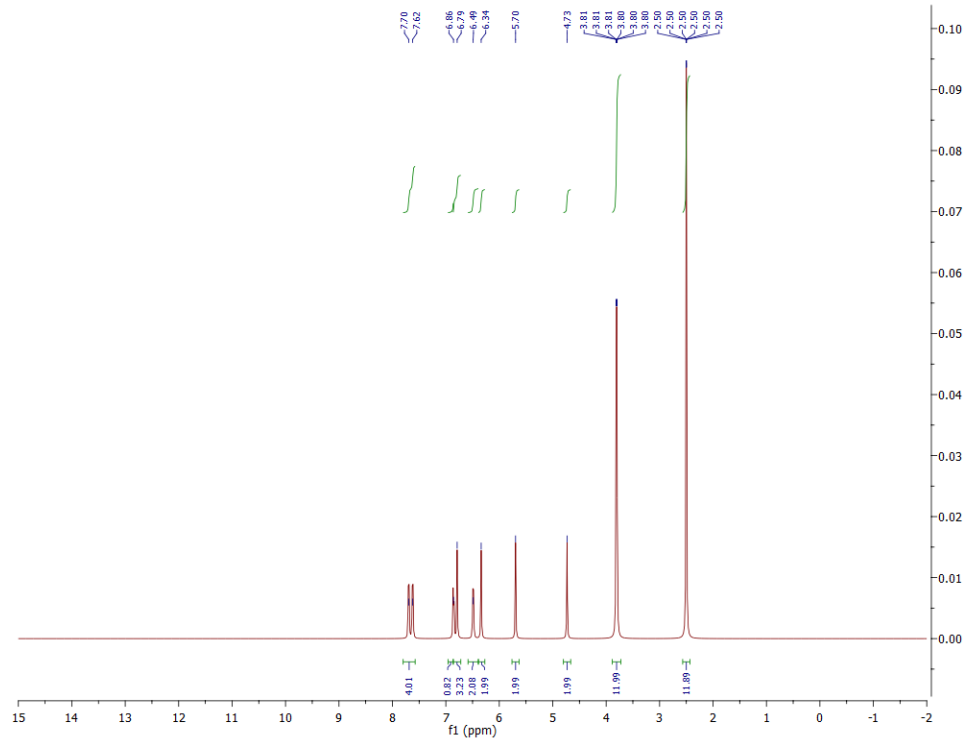
Слика ДМ12. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-A2-II**.



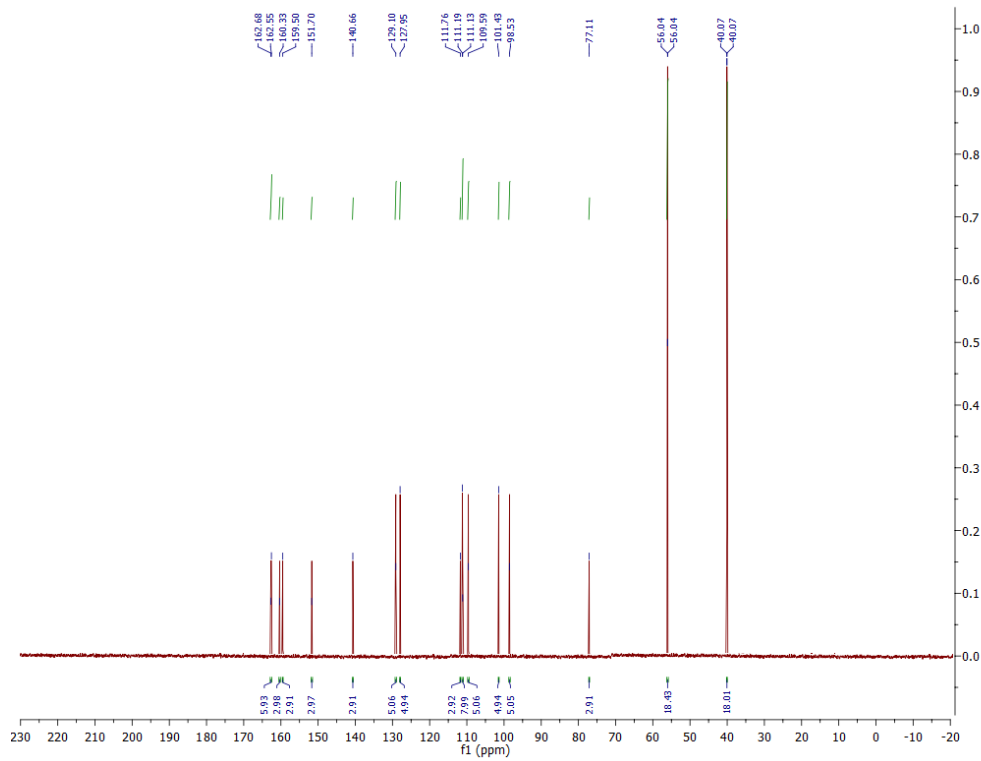
Слика ДМ13. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-A2-II**.



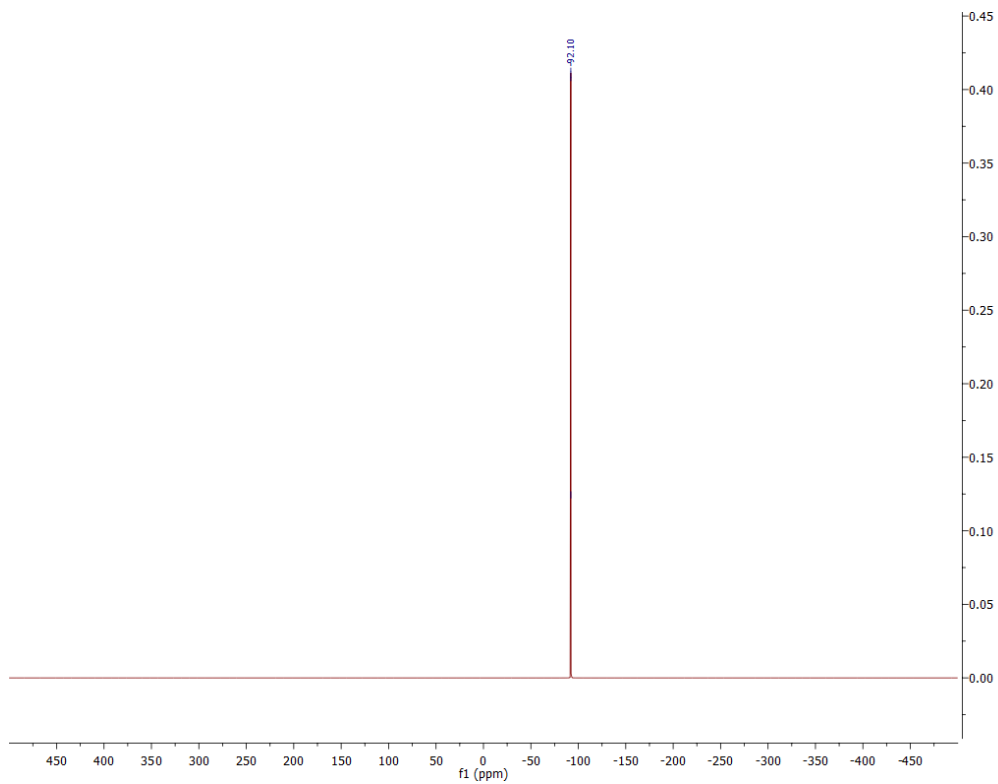
Слика ДМ14. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A2-II**.



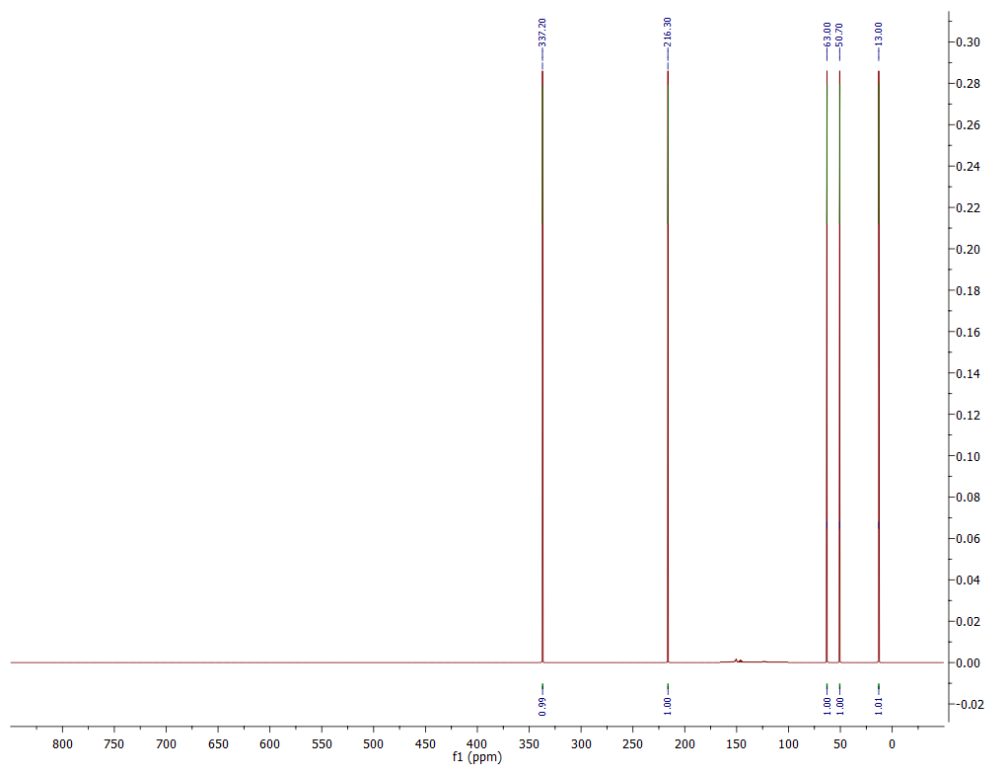
Слика ДМ15. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-A3.



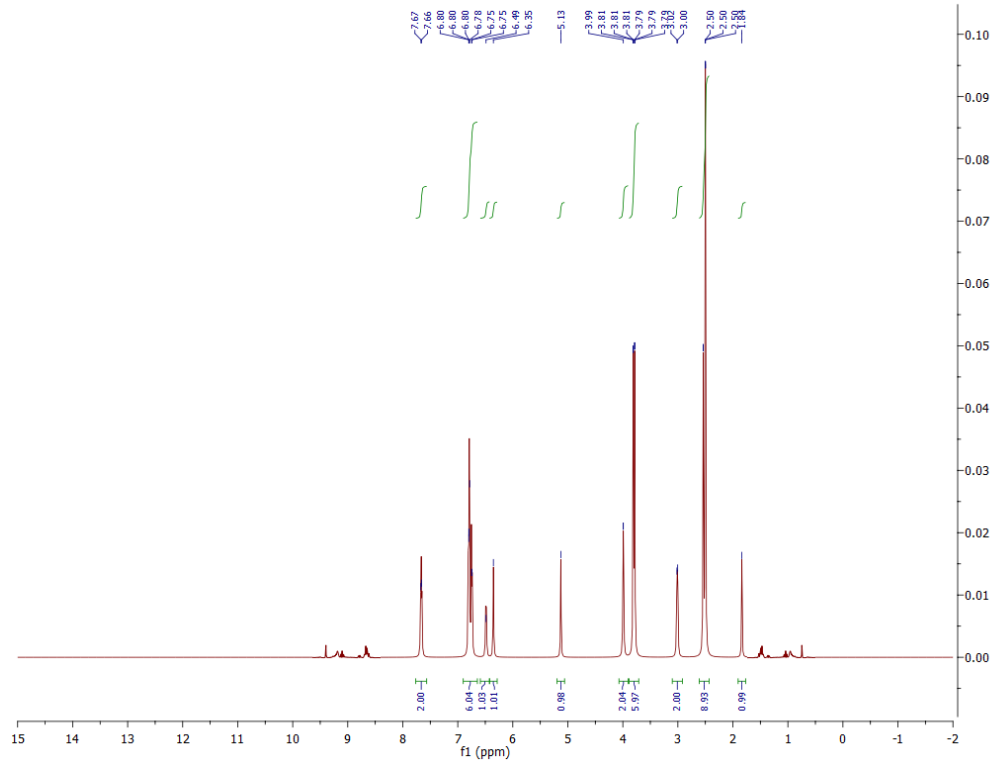
Слика ДМ16. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-A3.



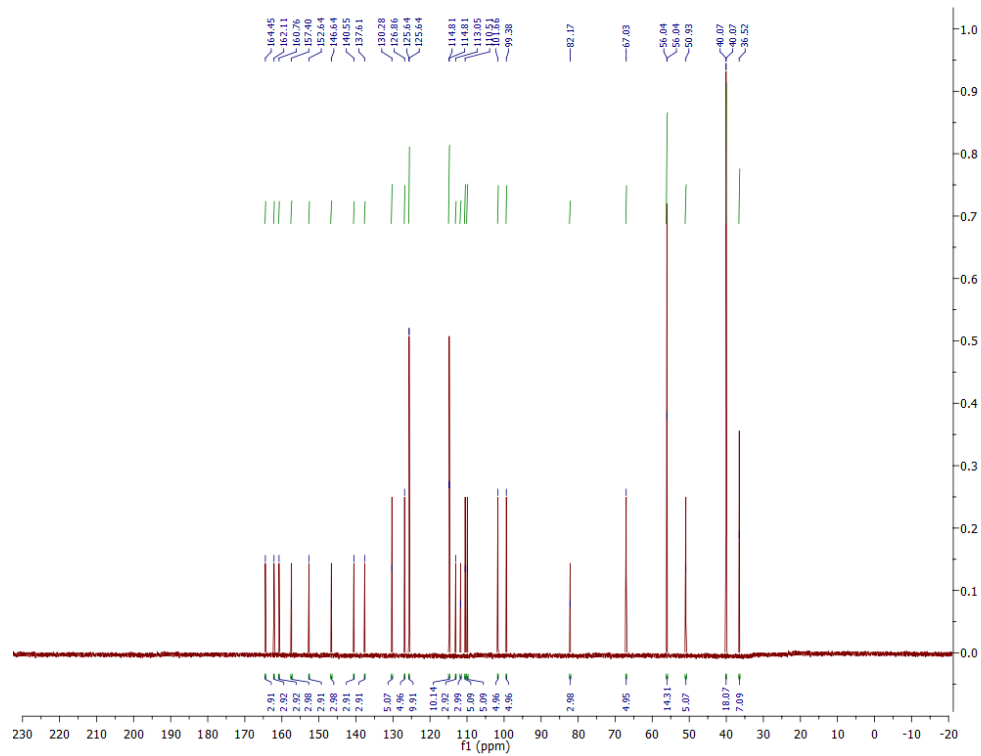
Слика ДМ17. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-A3**.



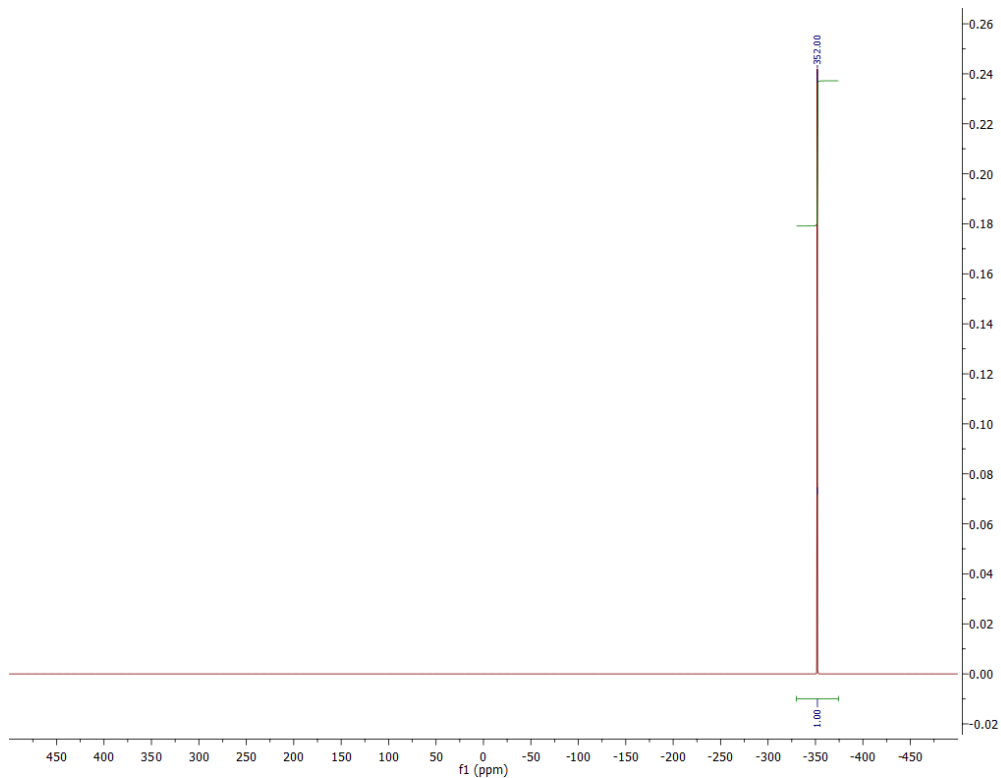
Слика ДМ18. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A3**.



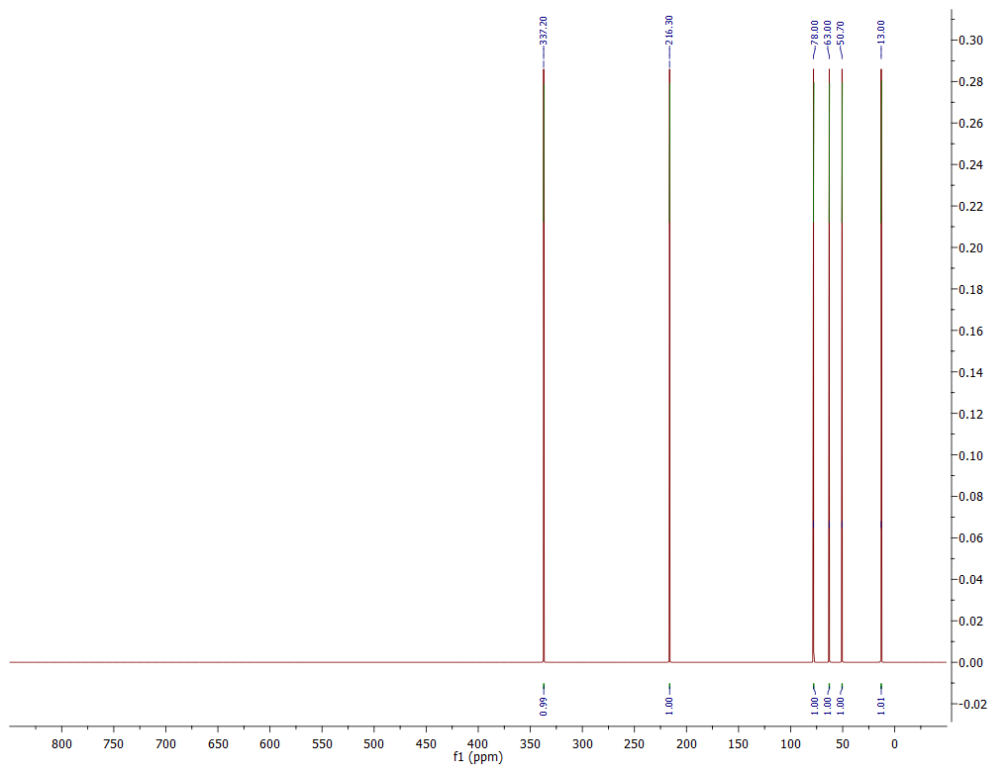
Слика ДМ19. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a**.



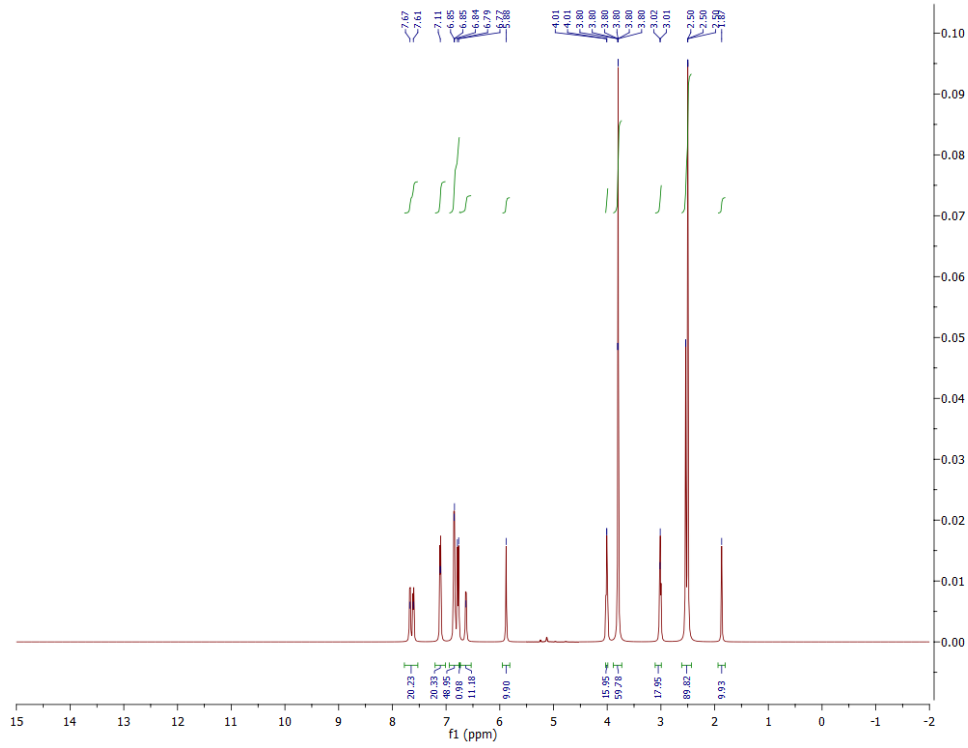
Слика ДМ20. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a**.



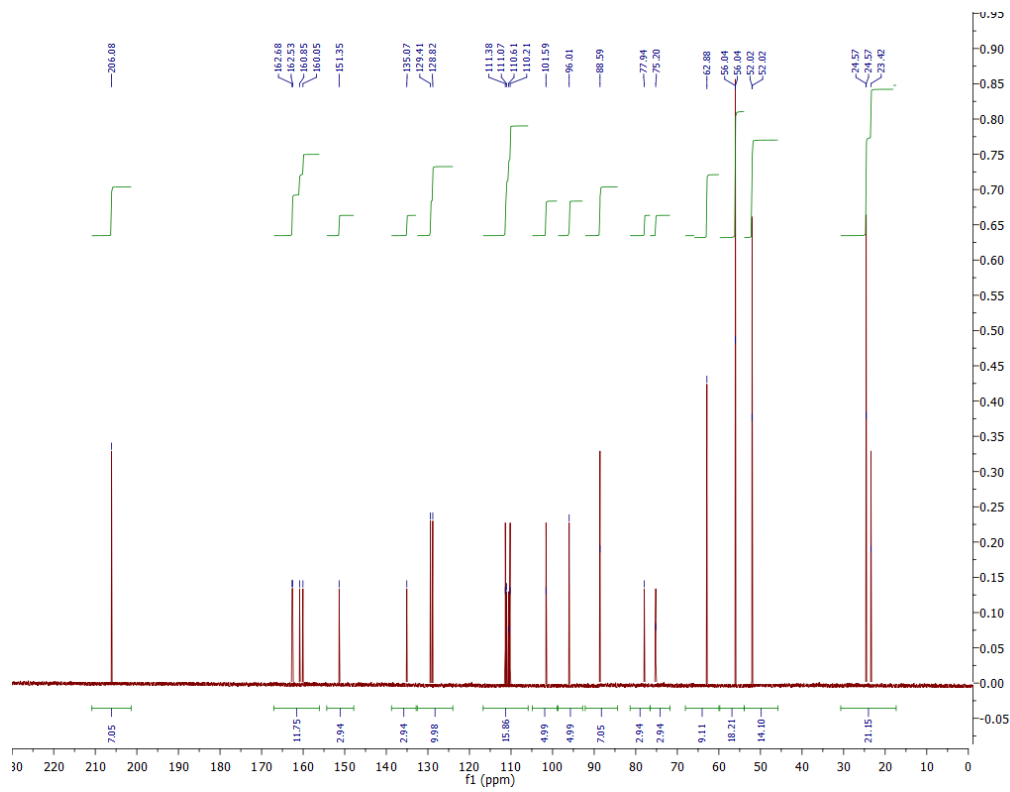
Слика ДМ21. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a**.



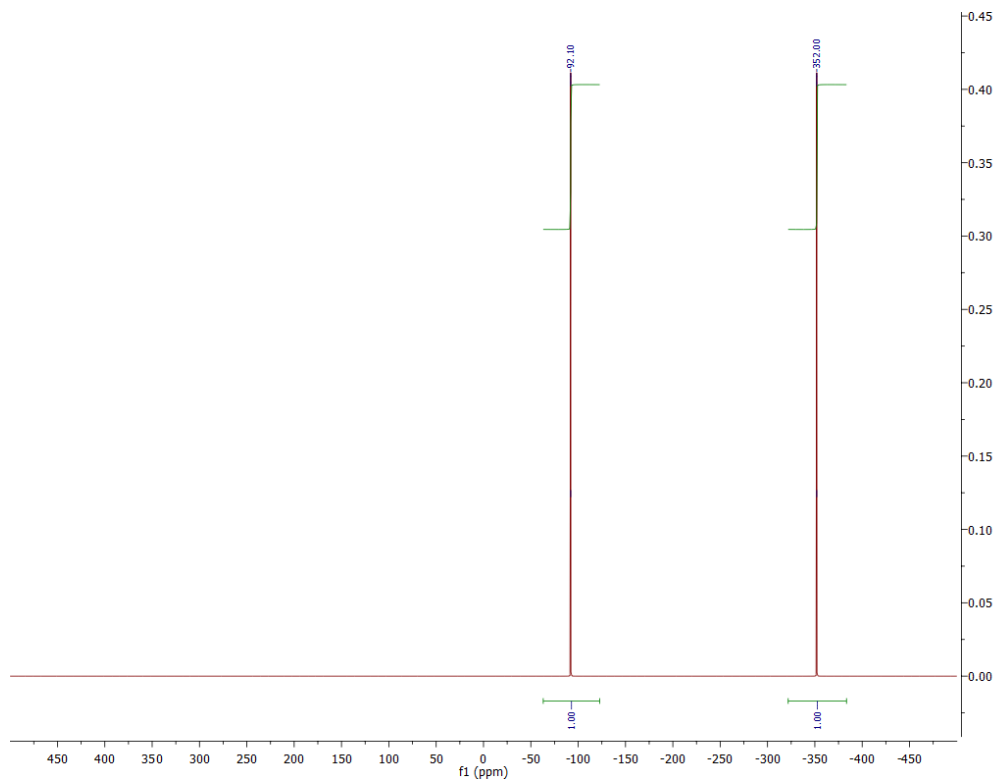
Слика ДМ22. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a**.



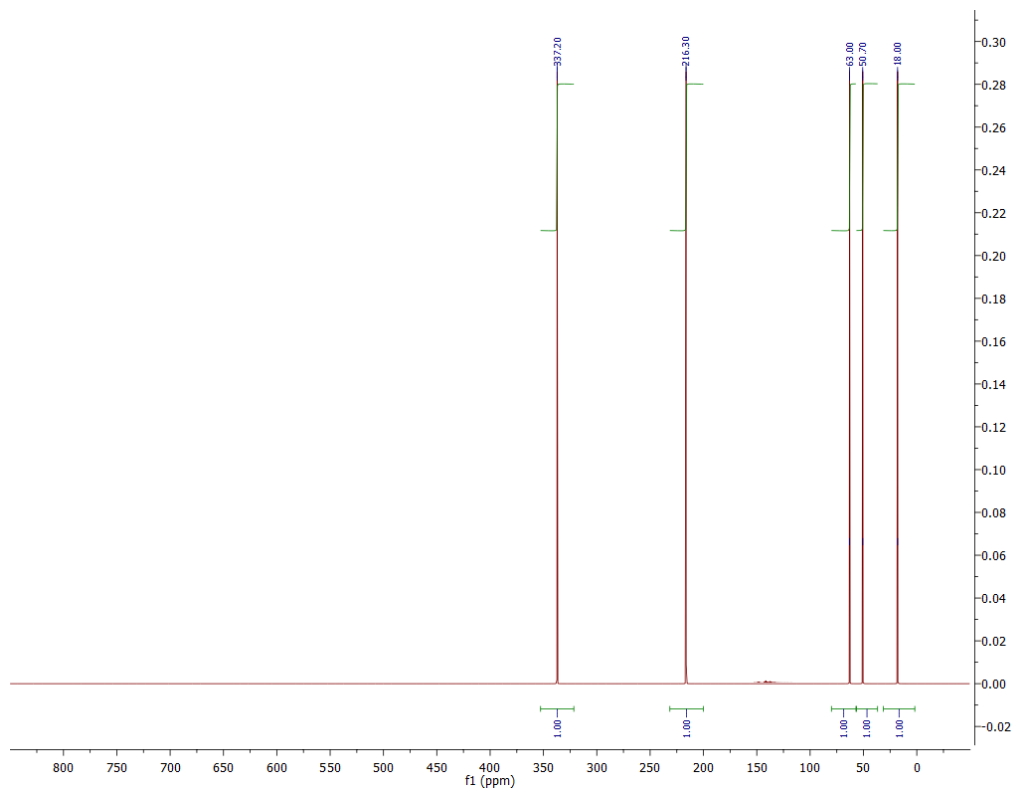
Слика ДМ23. ¹H NMR спектар једињења 3DQ-Pro-1a*.



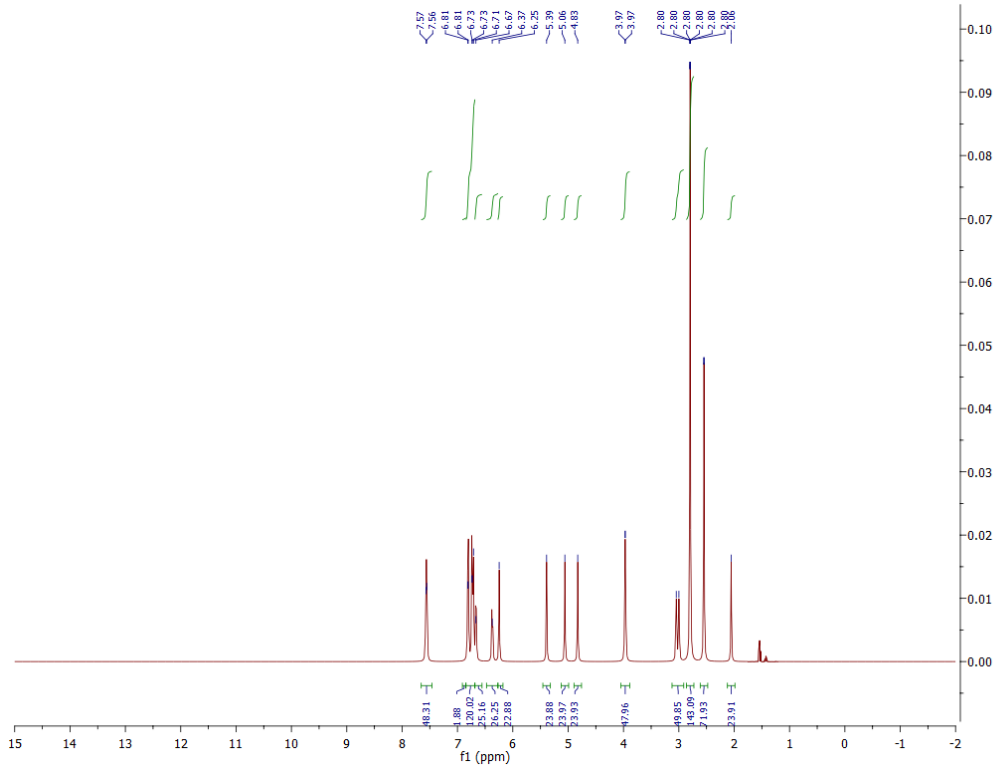
Слика ДМ24. ¹³C NMR спектар једињења 3DQ-Pro-1a*.



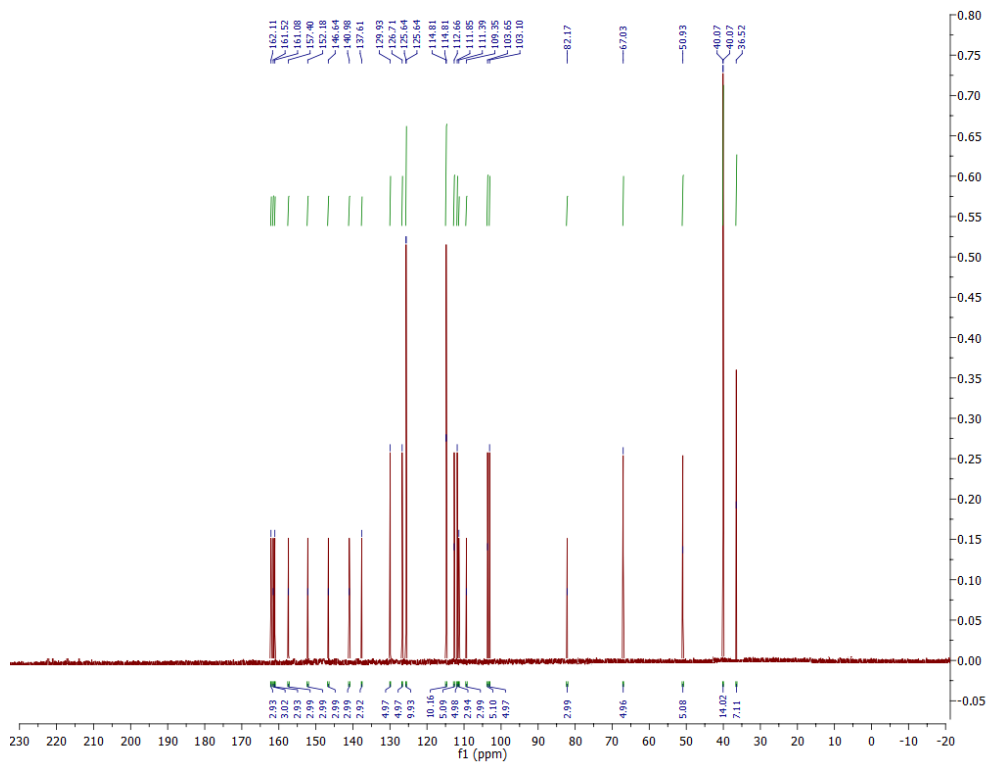
Слика ДМ25. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a***.



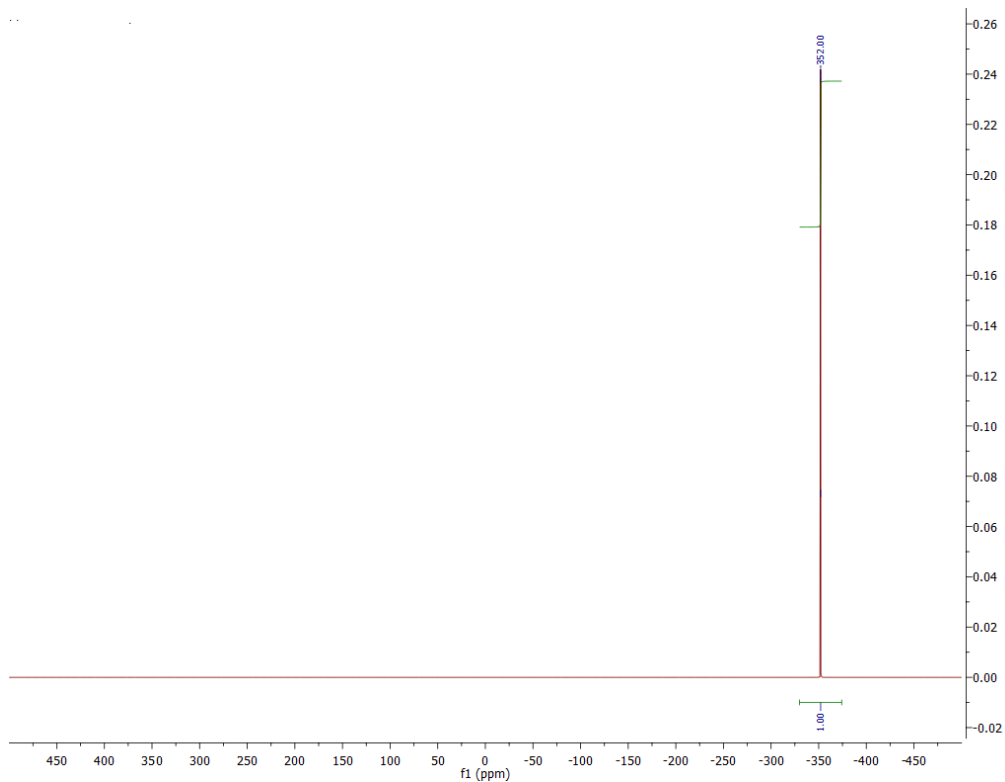
Слика ДМ26. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1a***.



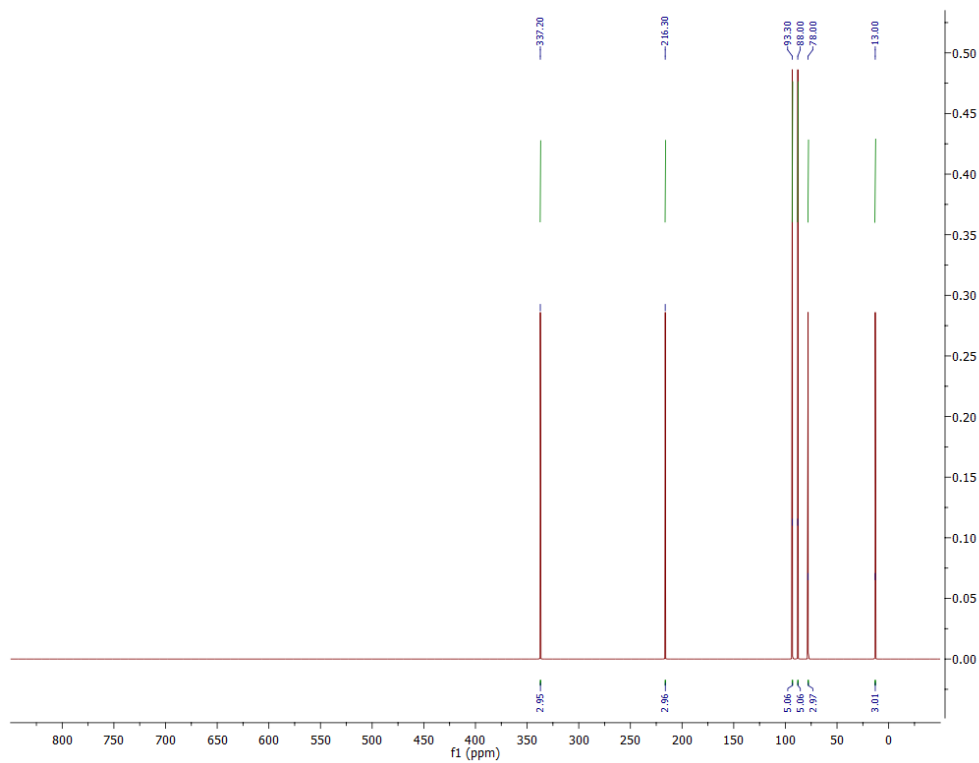
Слика ДМ27. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-1a**.



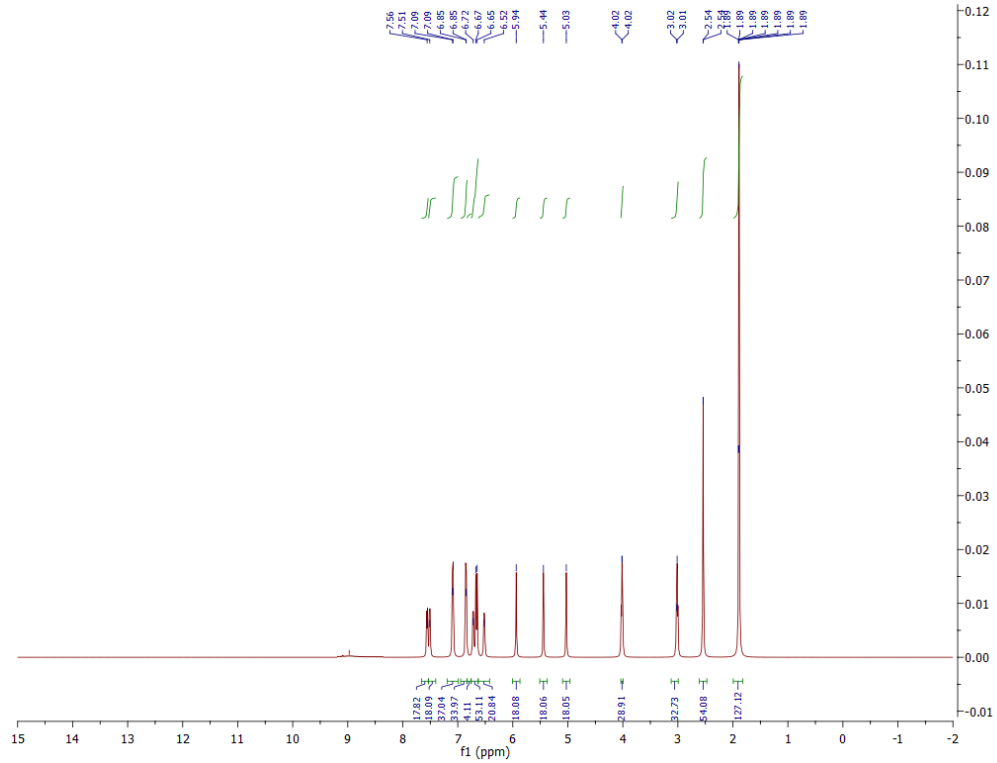
Слика ДМ28. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-1a**.



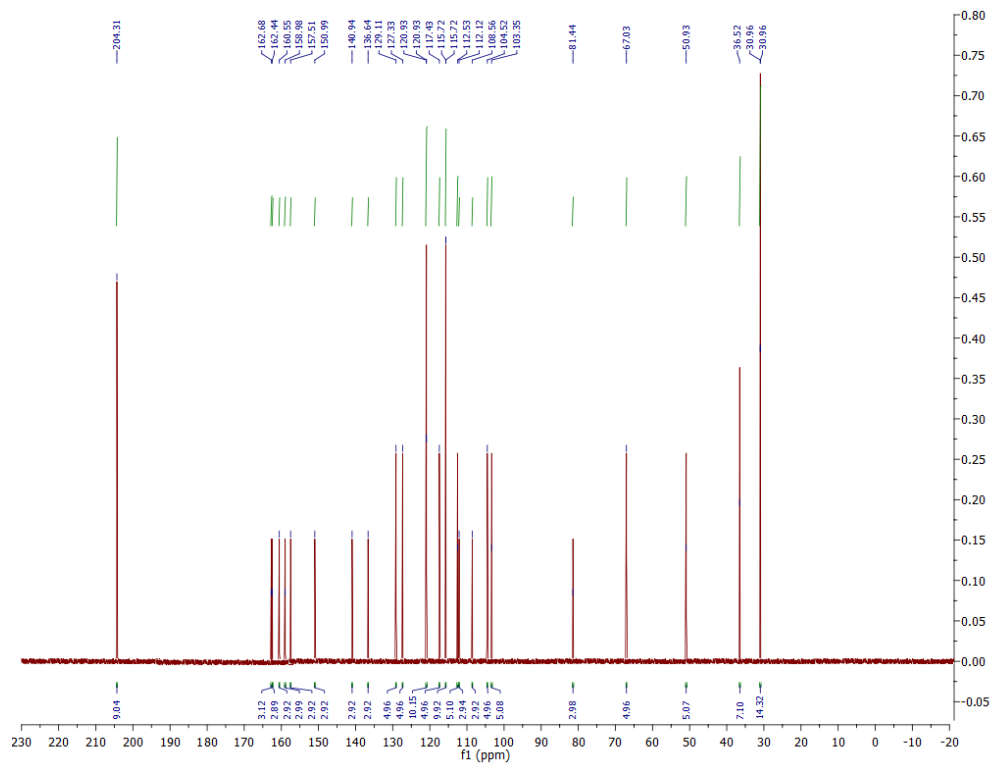
Слика ДМ29. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1a**.



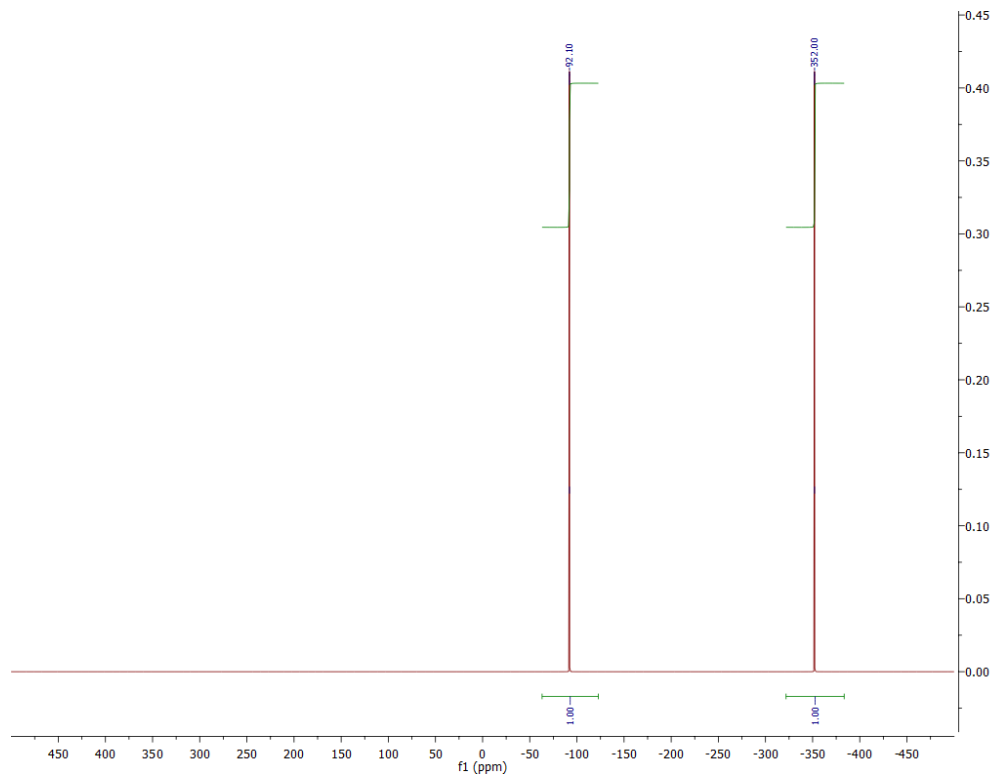
Слика ДМ30. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1a**.



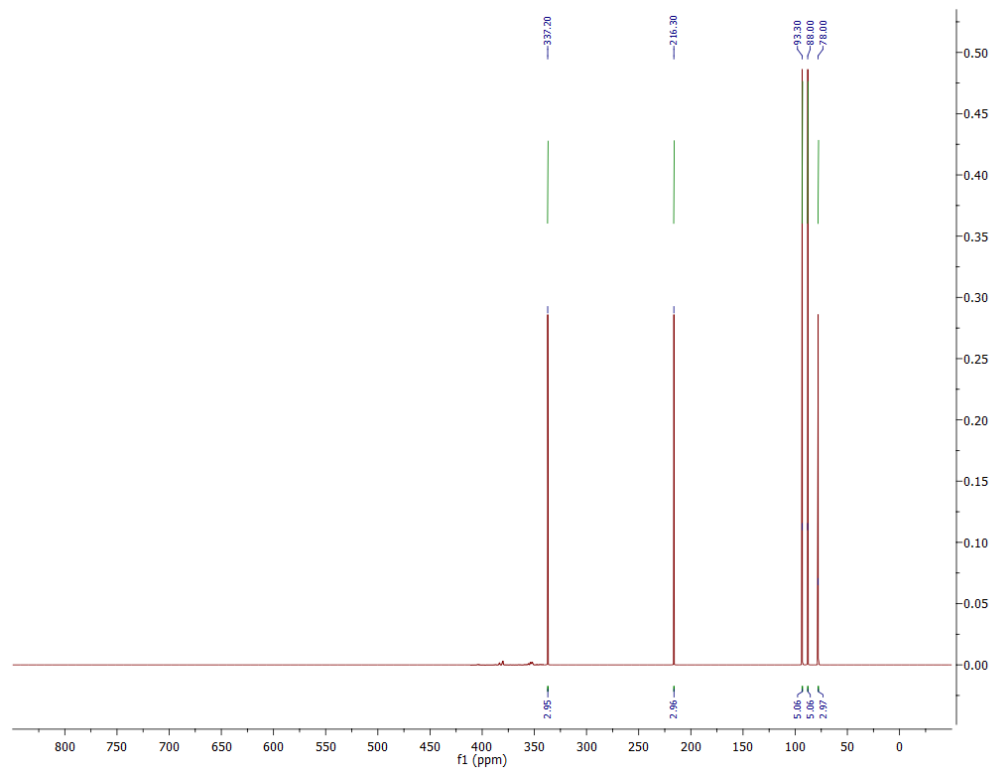
Слика ДМ31. ¹H NMR спектар једињења 3DQ-1a*.



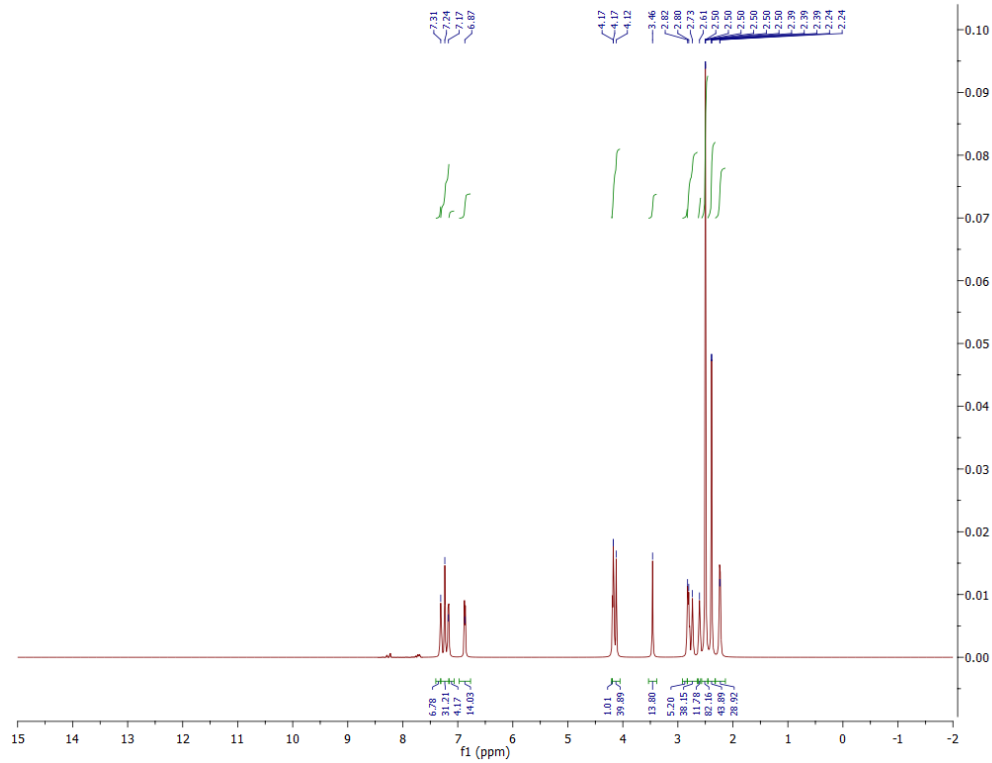
Слика ДМ32. ¹³C NMR спектар једињења 3DQ-1a*.



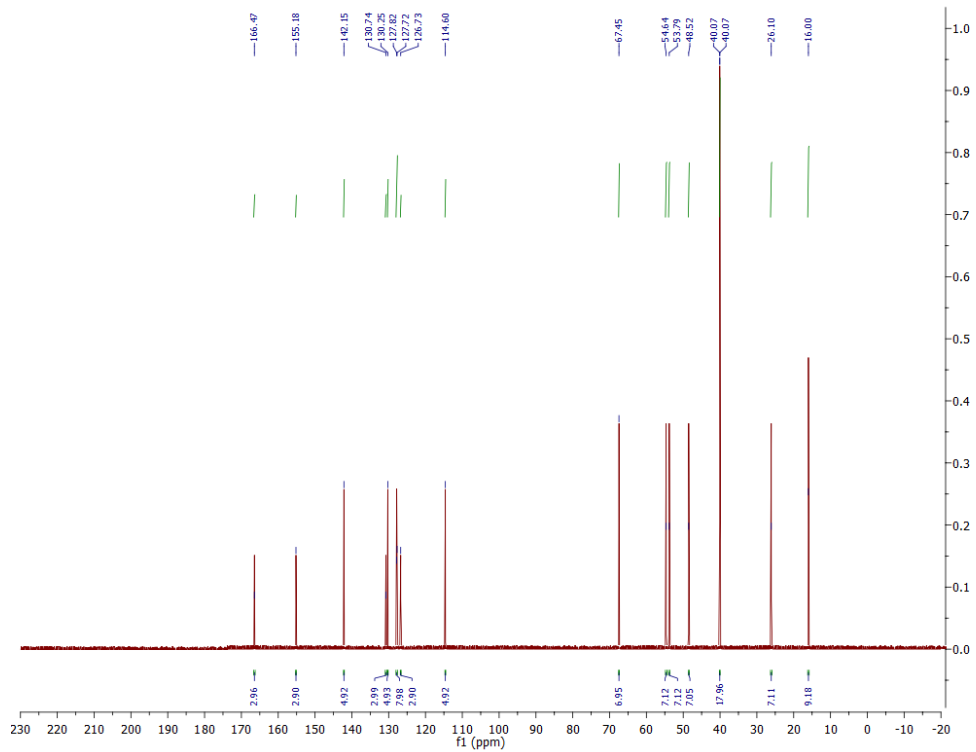
Слика ДМ33. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1a***.



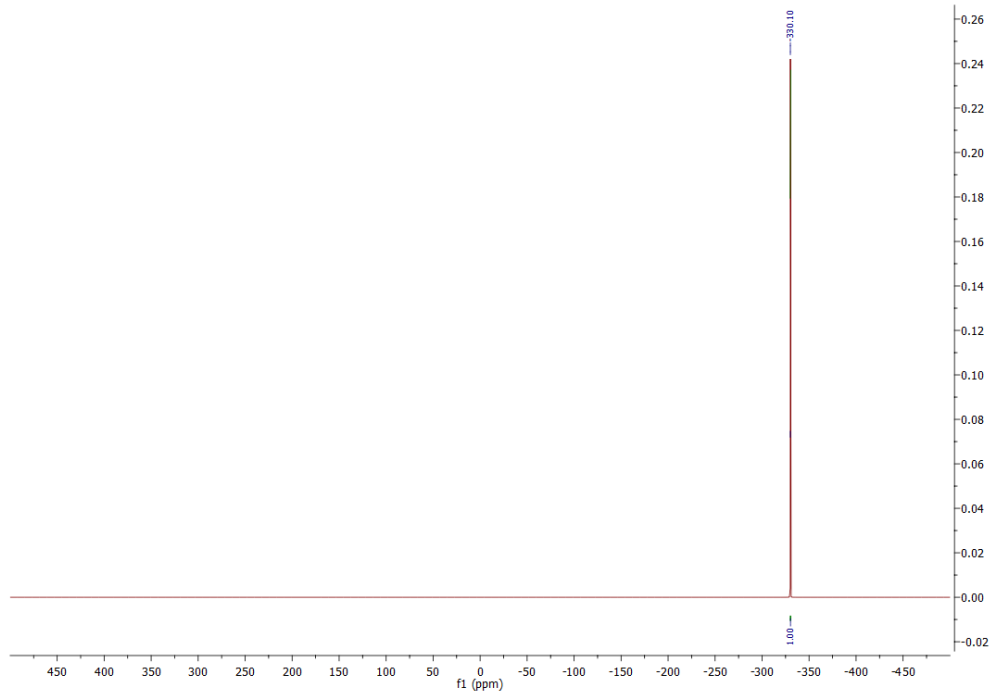
Слика ДМ34. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1a***.



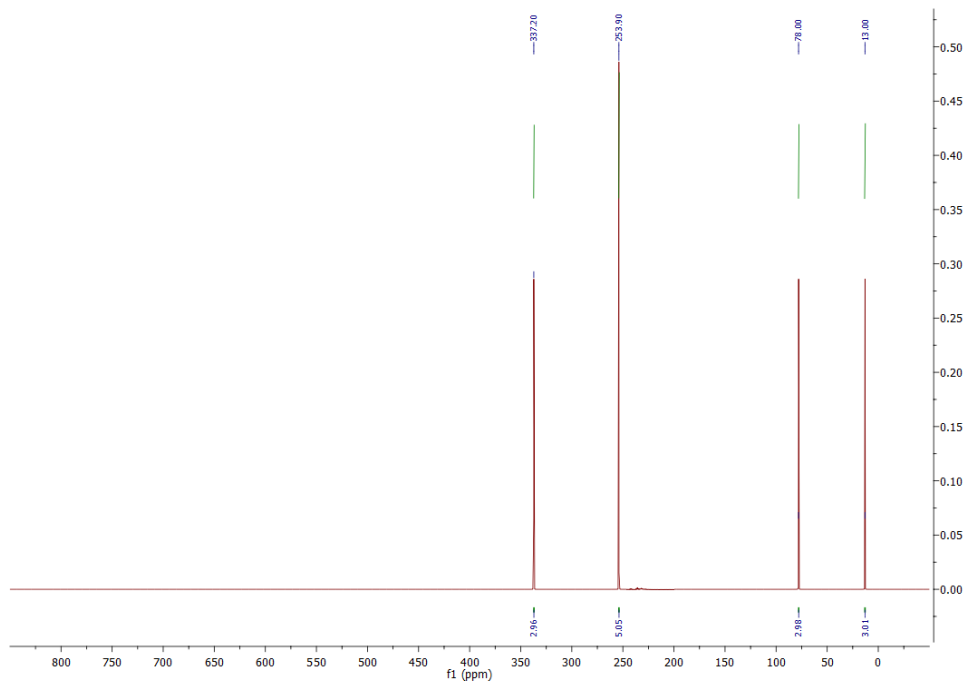
Слика ДМ35. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-R2a**.



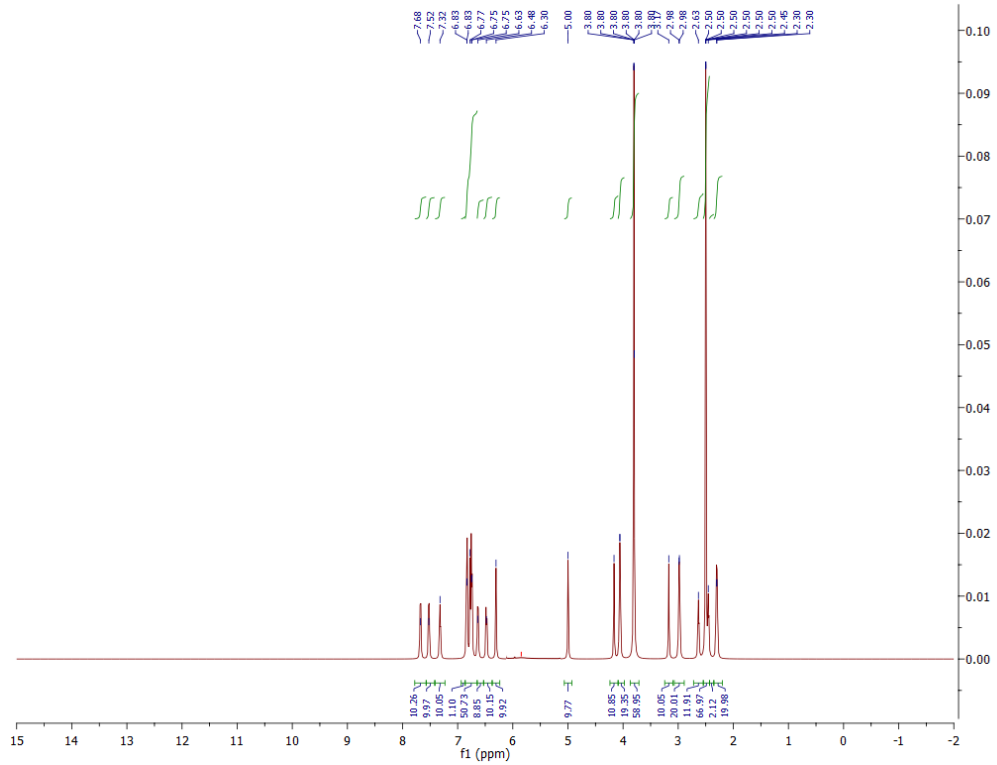
Слика ДМ36. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-R2a**.



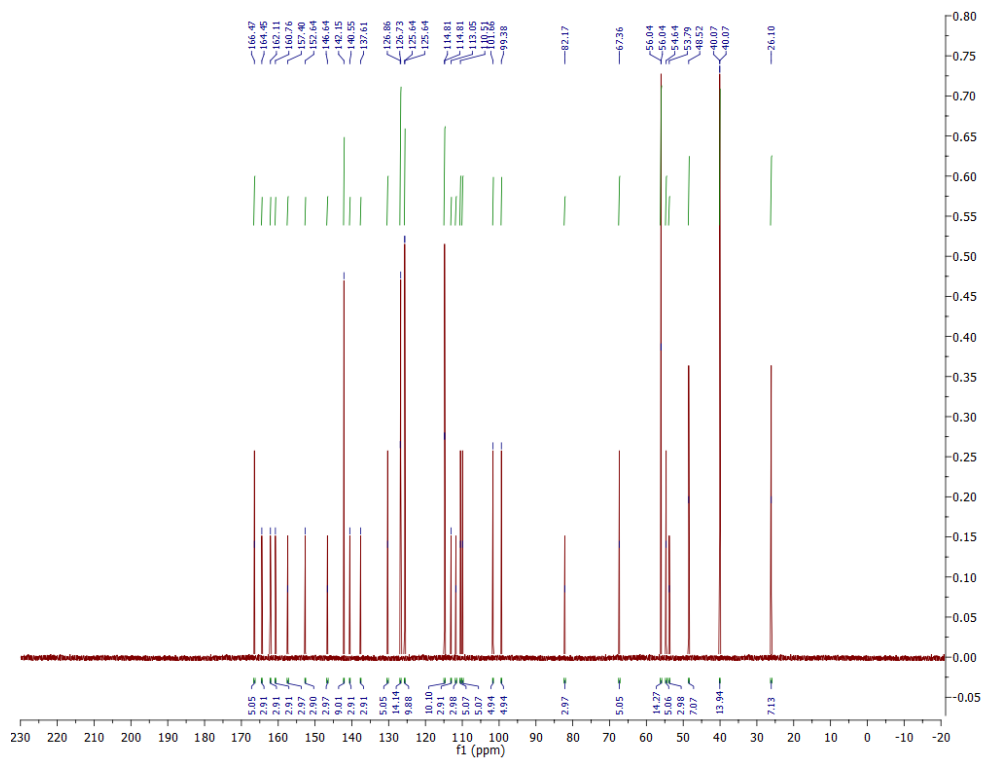
Слика ДМ37. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R2a**.



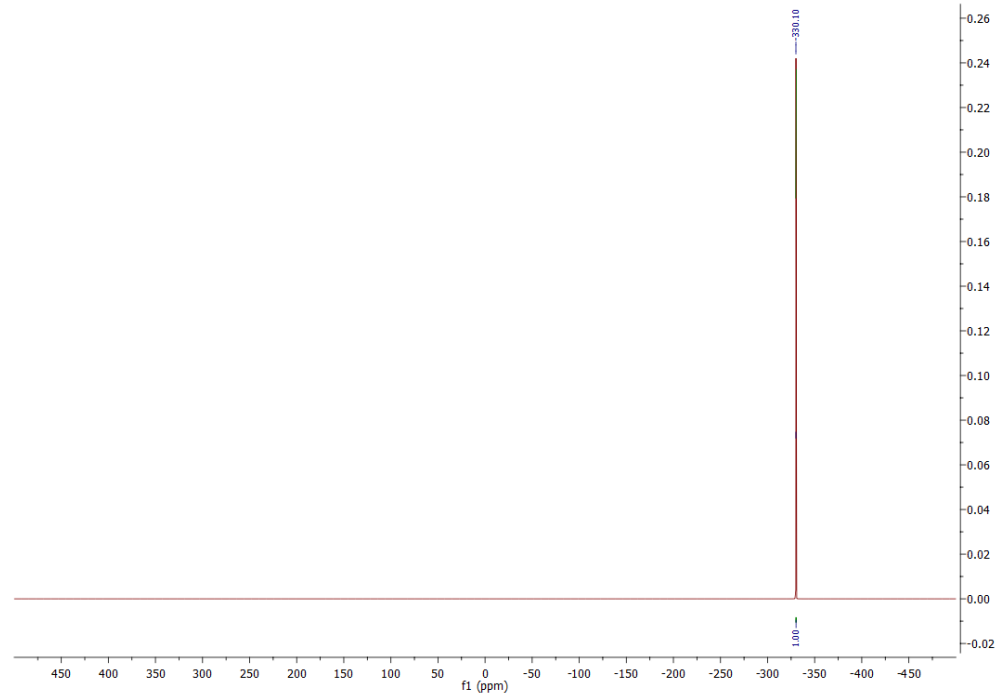
Слика ДМ38. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-R2a**.



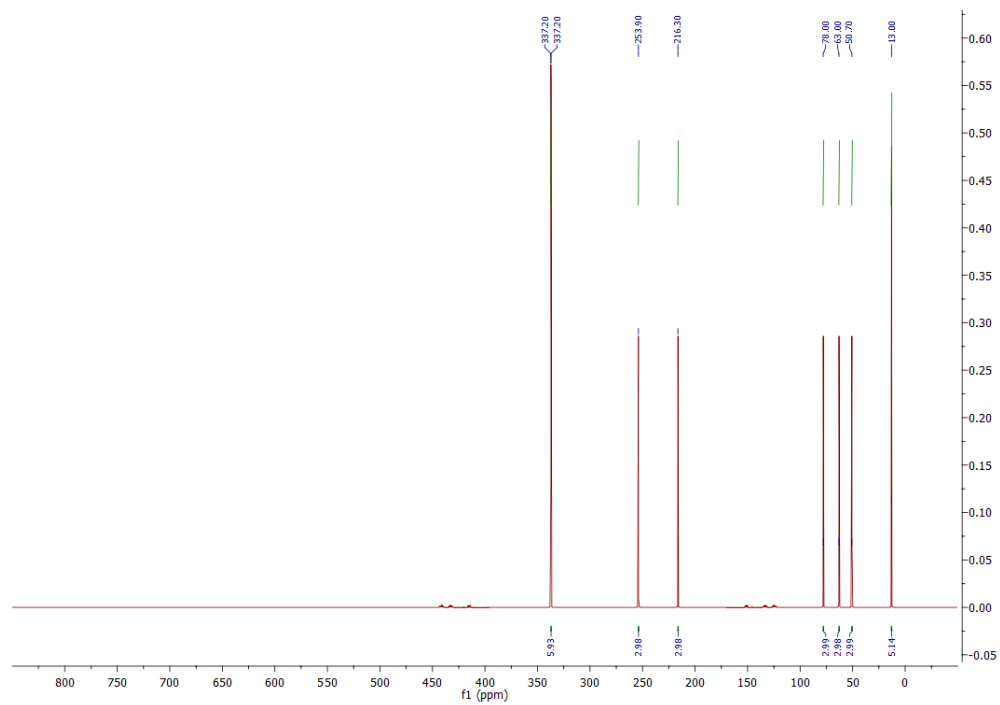
Слика ДМ39. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a**.



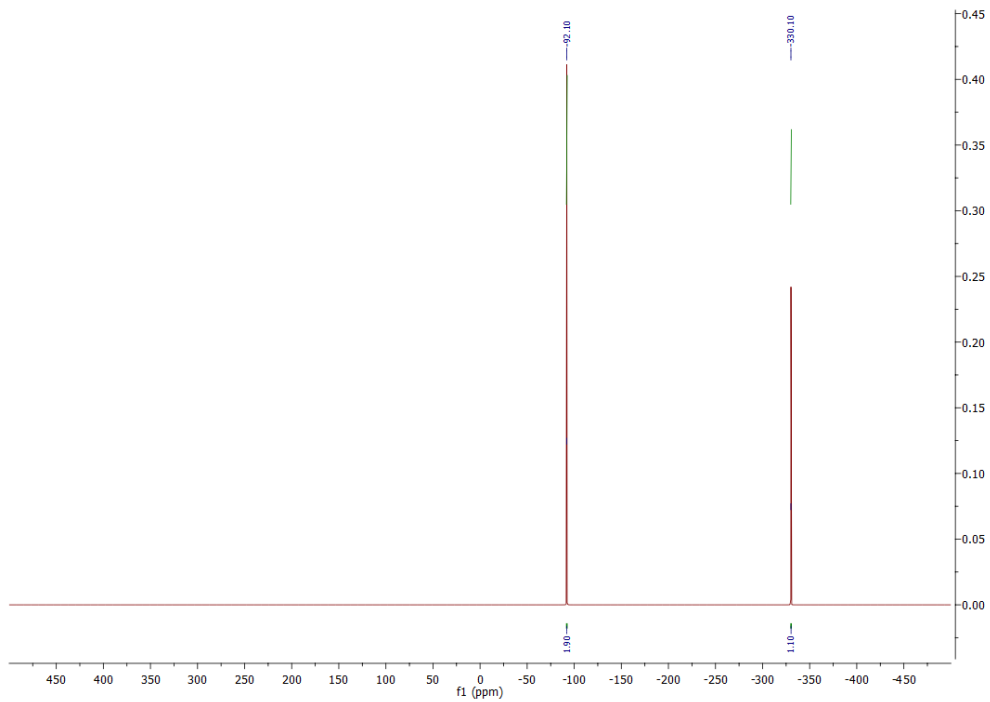
Слика ДМ40. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a**.



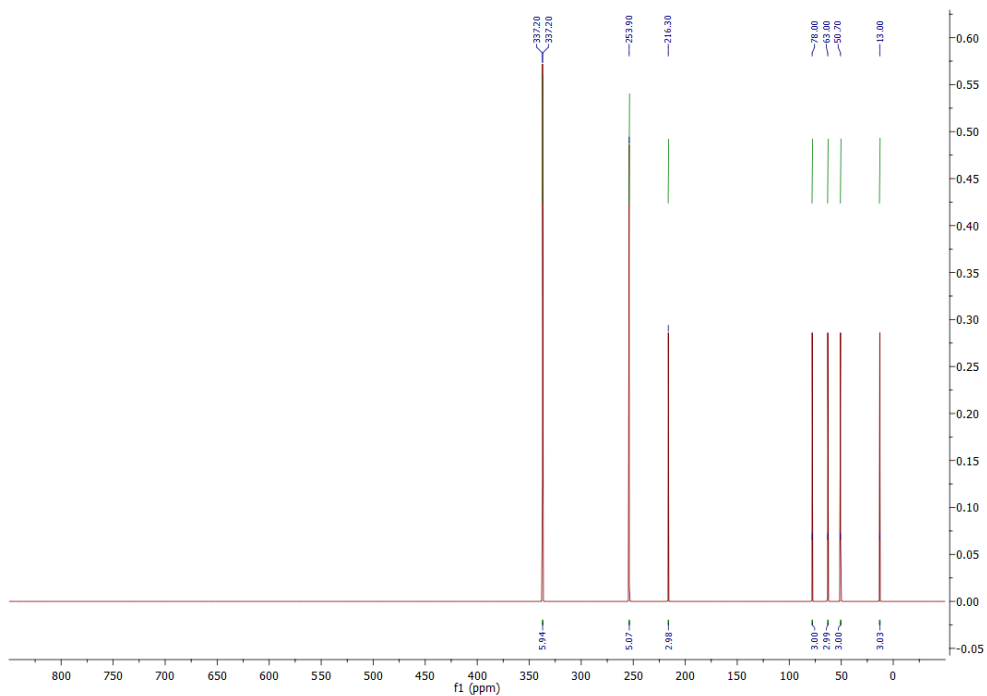
Слика ДМ41. ¹⁵N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a**.



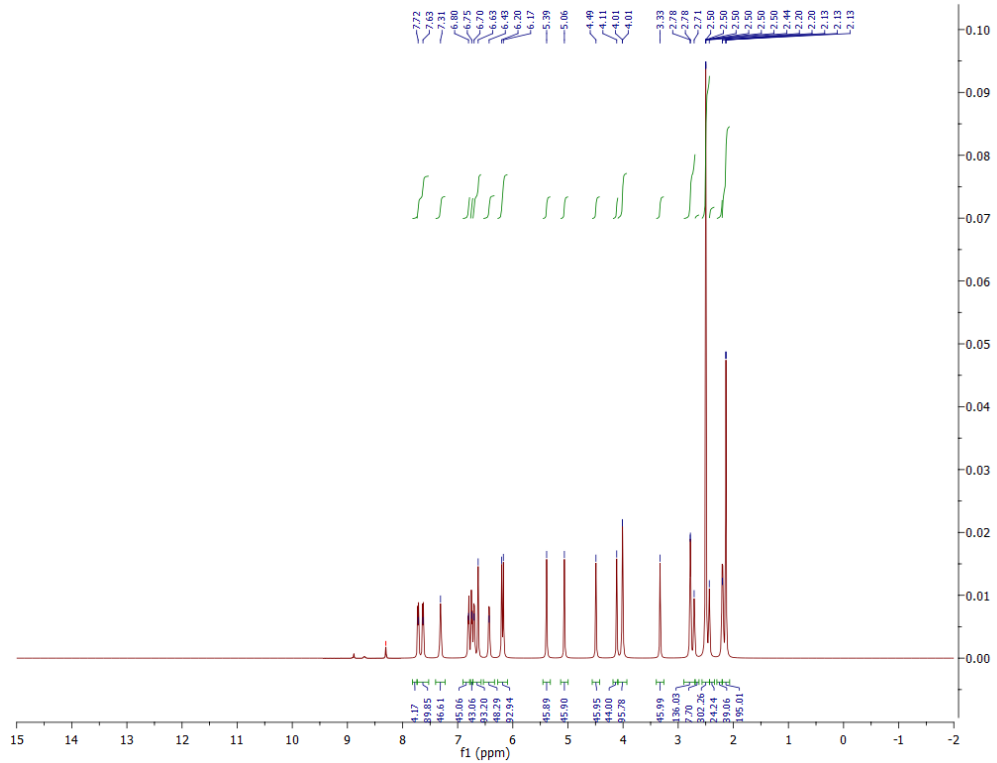
Слика ДМ42. ¹⁷O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a**.



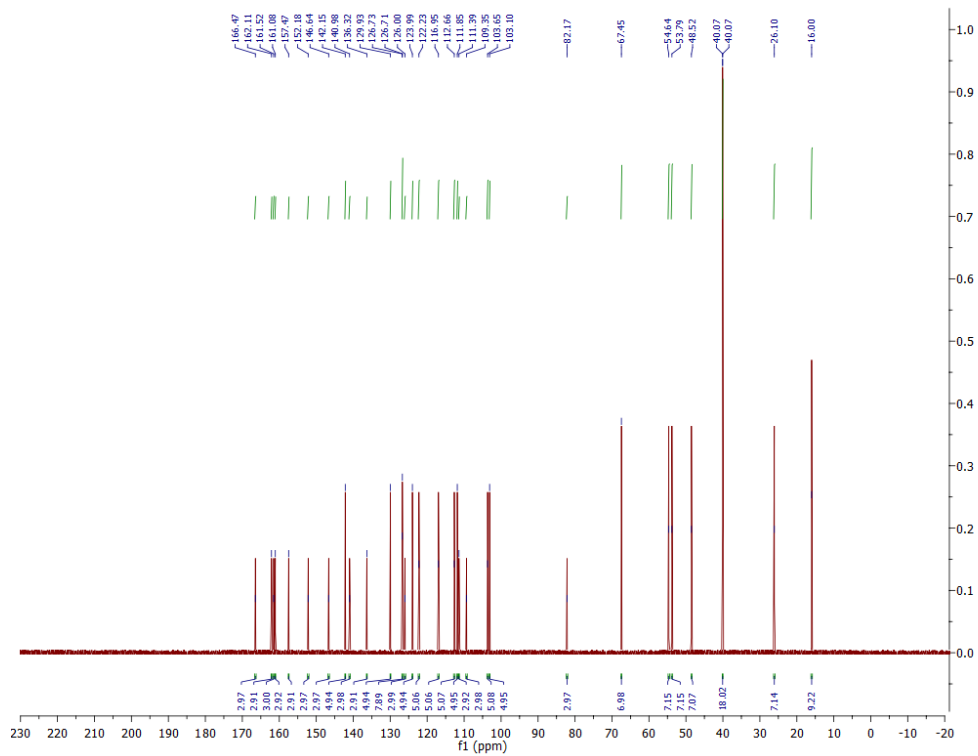
Слика ДМ45. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a***.



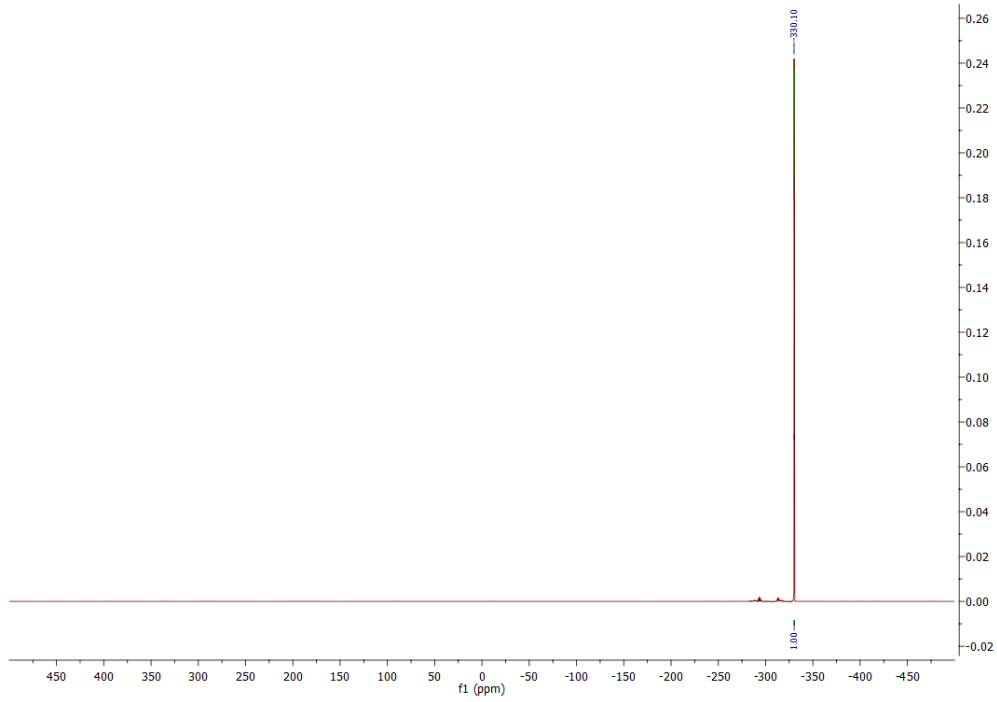
Слика ДМ46. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2a***.



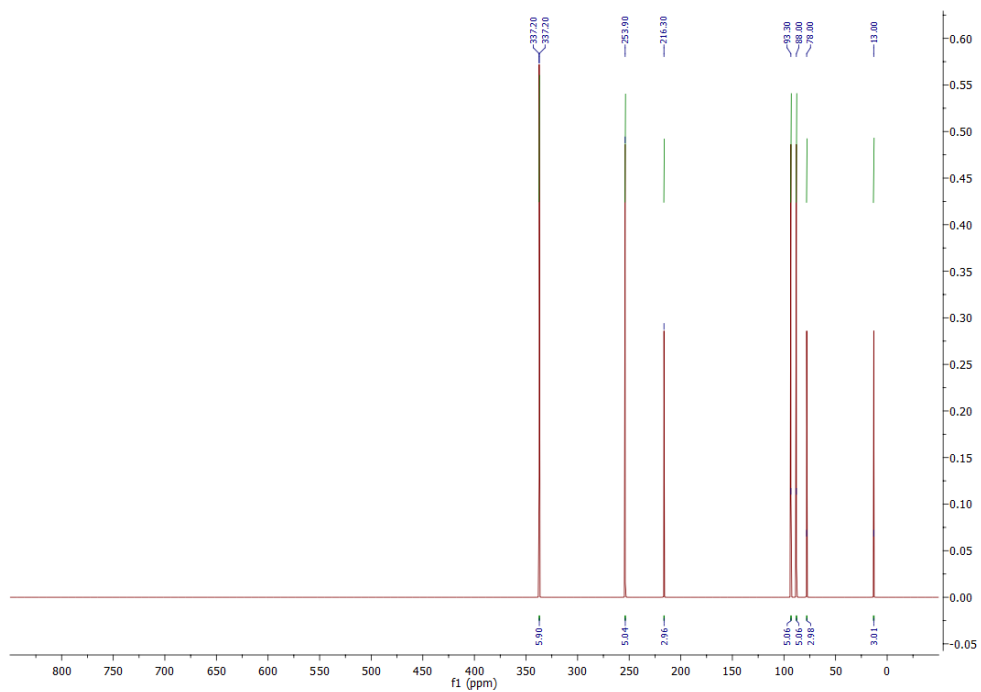
Слика ДМ47. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-2a**.



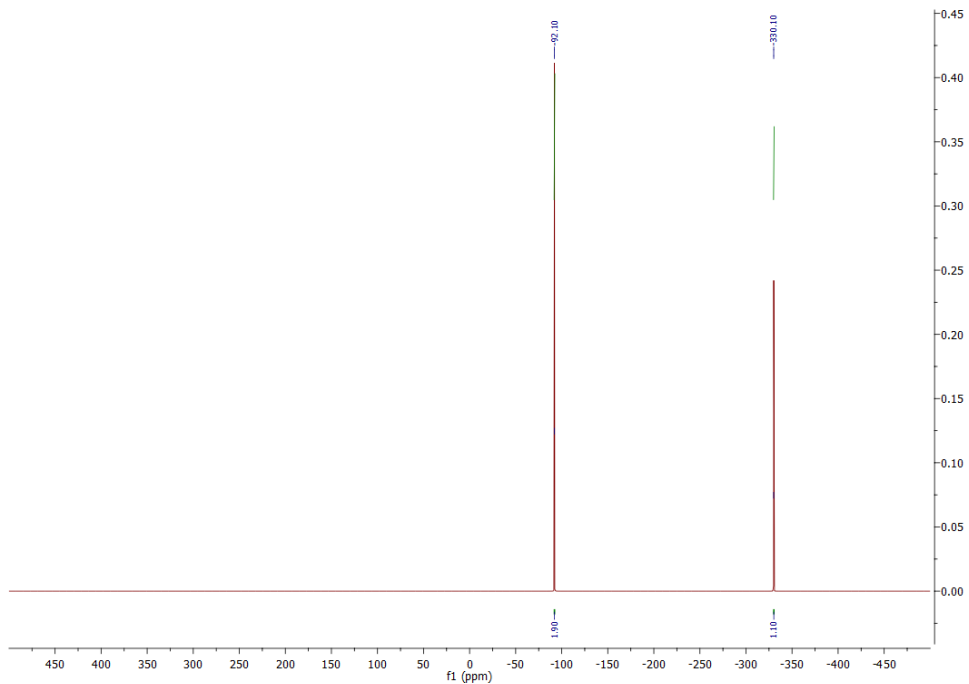
Слика ДМ48. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-2a**.



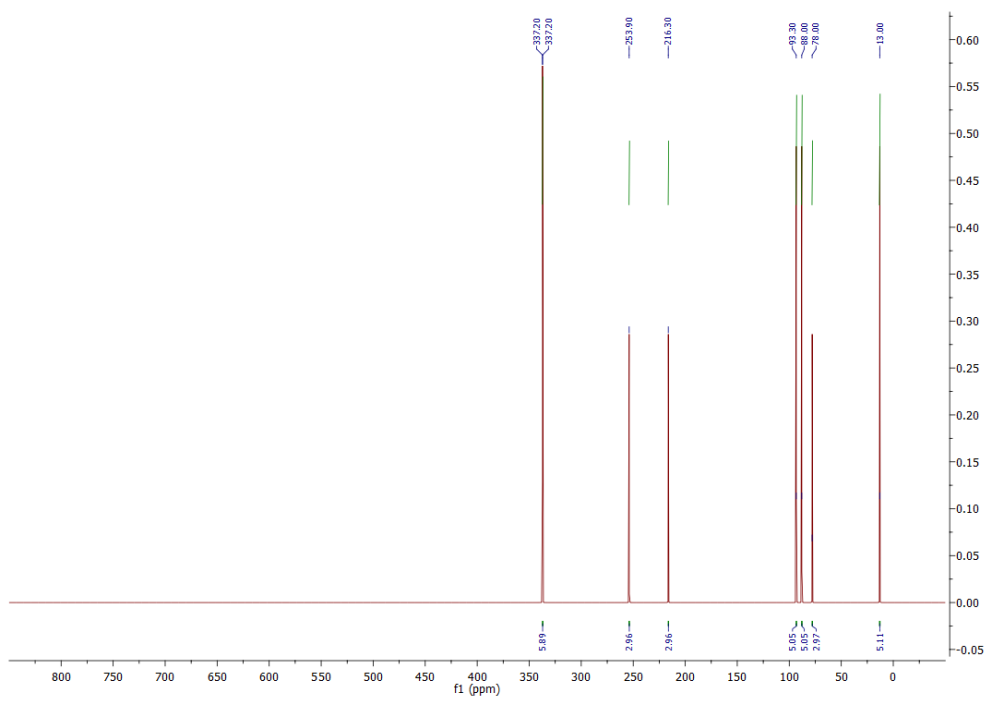
Слика ДМ49. ¹⁵N NMR спектар једињења **3DQ-2a**.



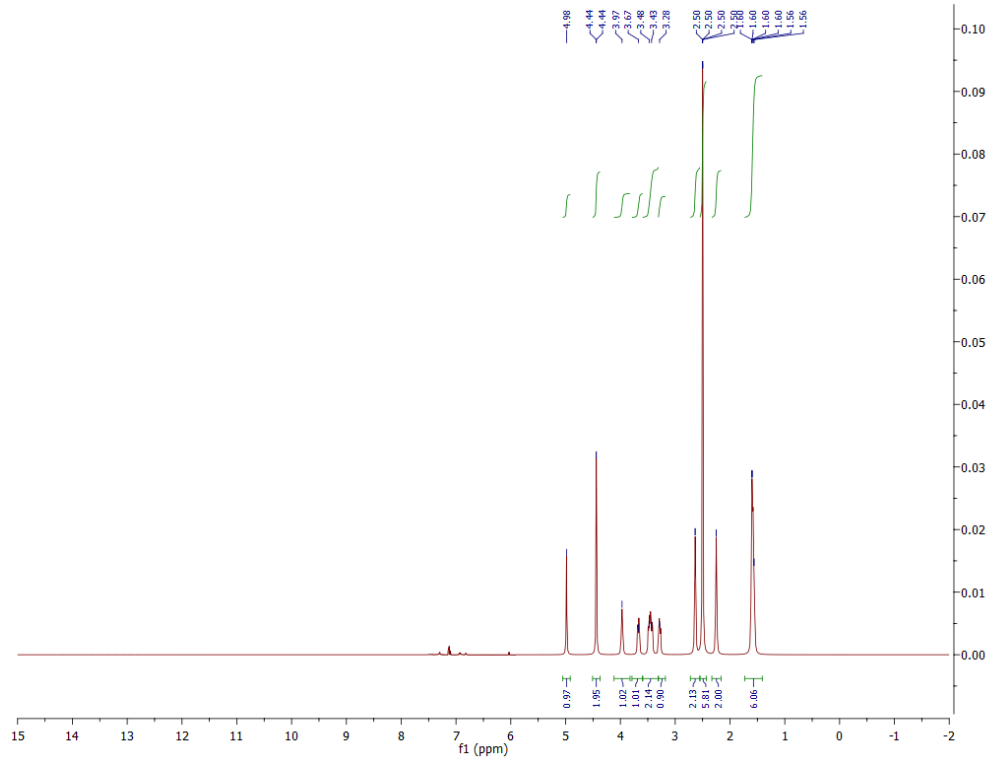
Слика ДМ50. ¹⁷O NMR спектар једињења **3DQ-2a**.



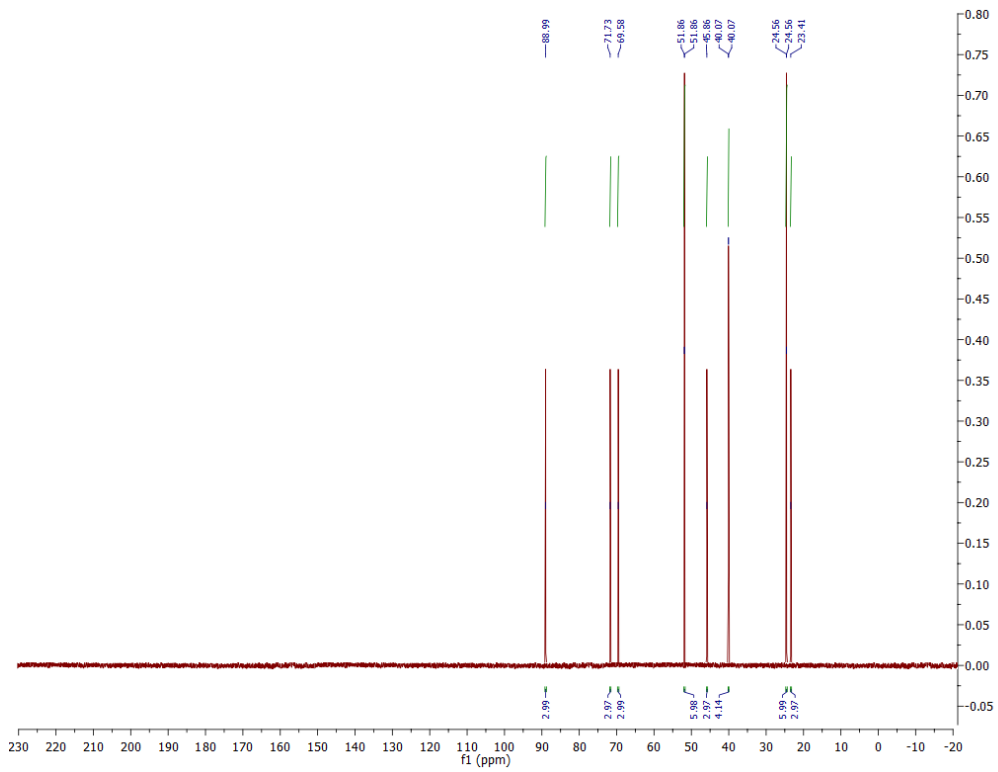
Слика ДМ53. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-2a***.



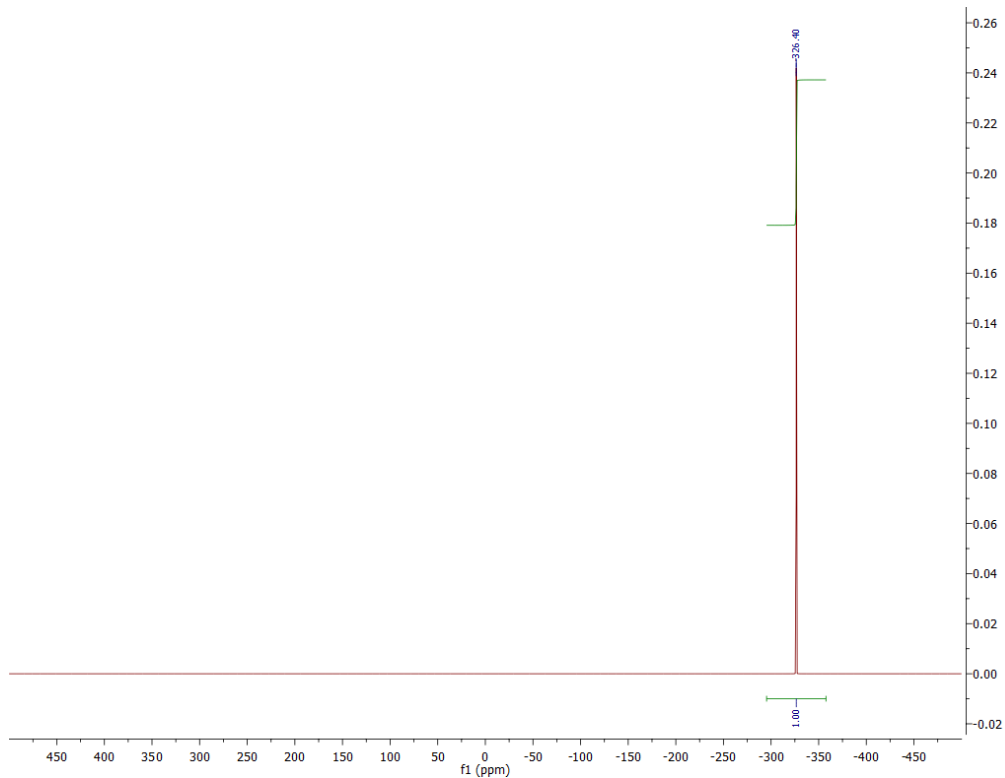
Слика ДМ54. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-2a***.



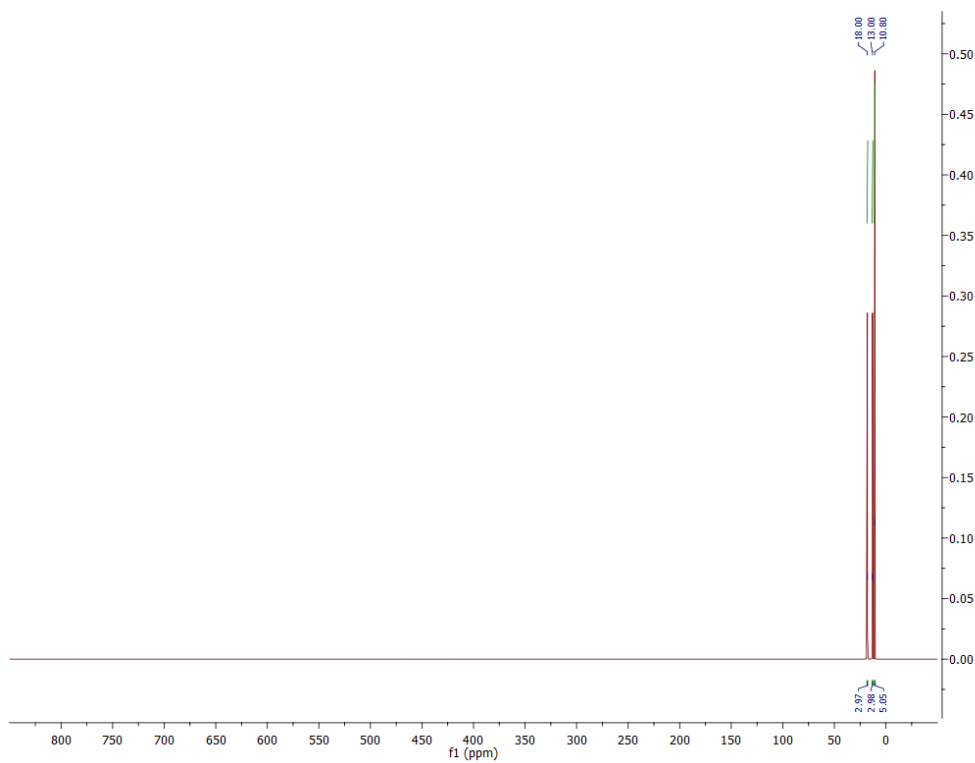
Слика ДМ55. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R3a**.



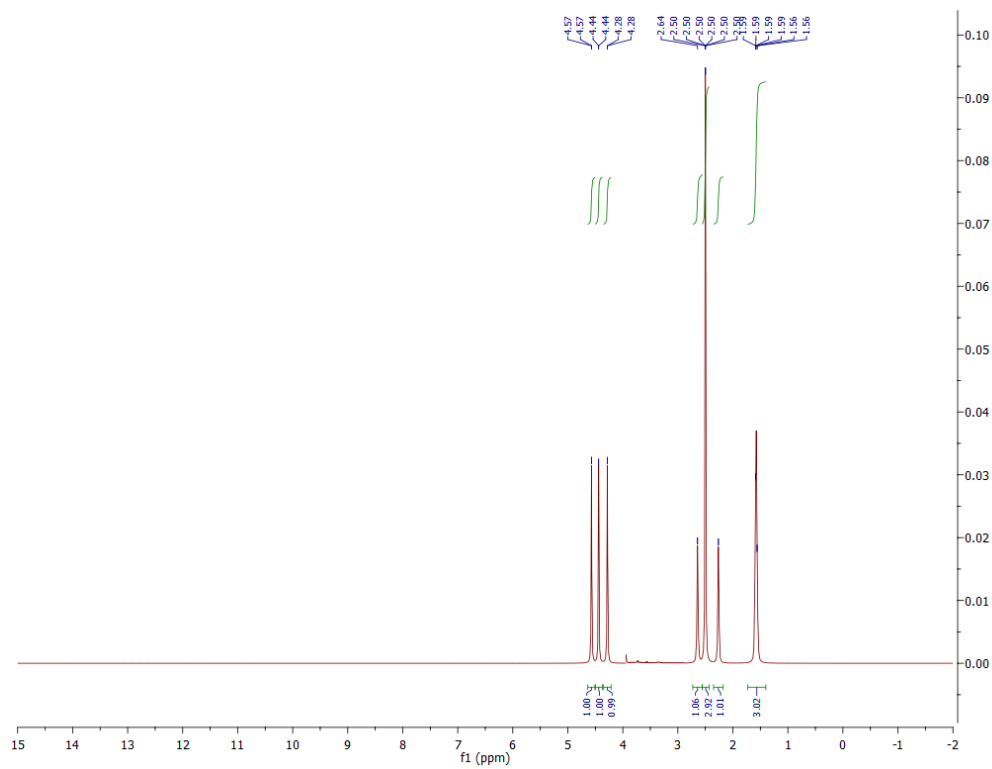
Слика ДМ56. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R3a**.



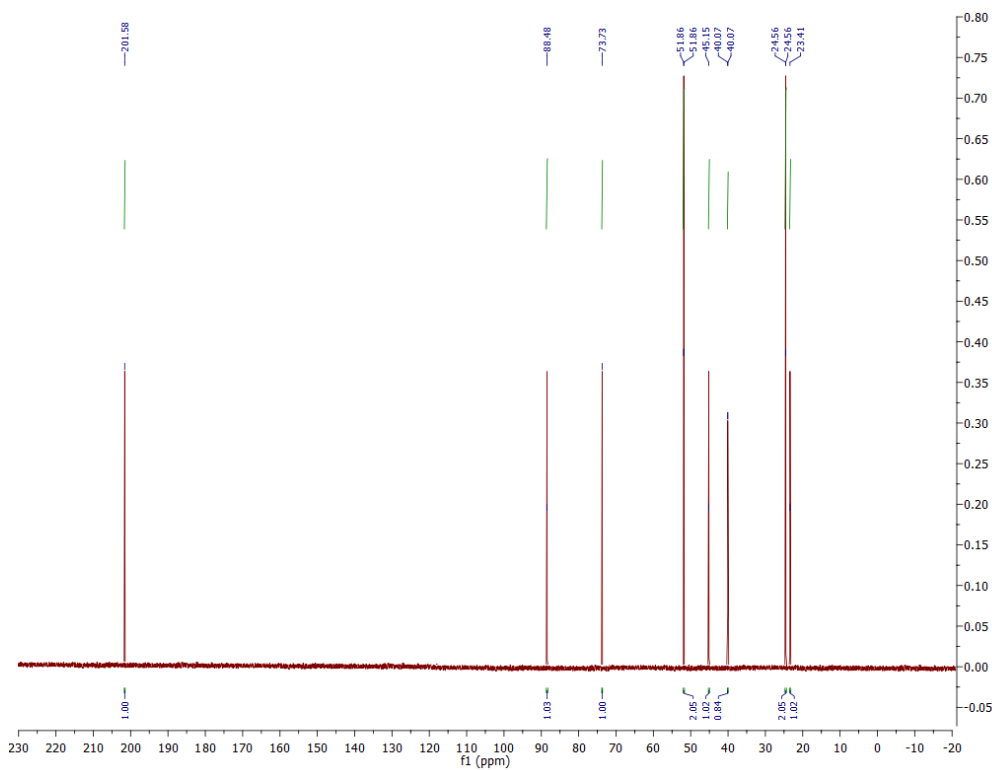
Слика ДМ57. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DQ-R3a**.



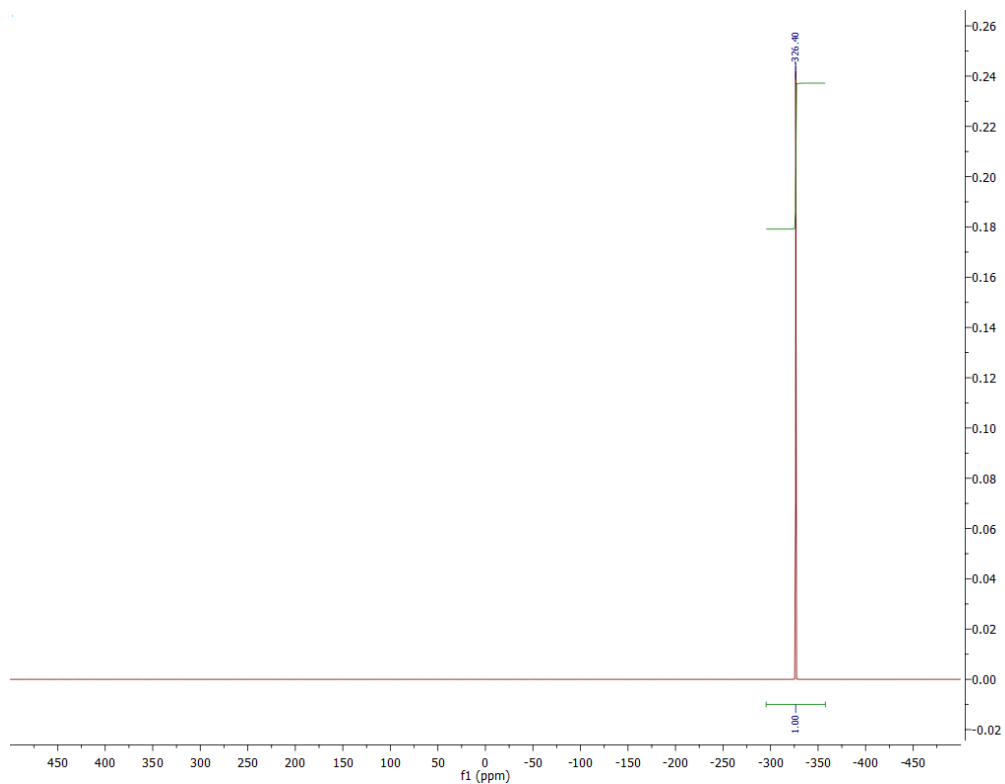
Слика ДМ58. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R3a**.



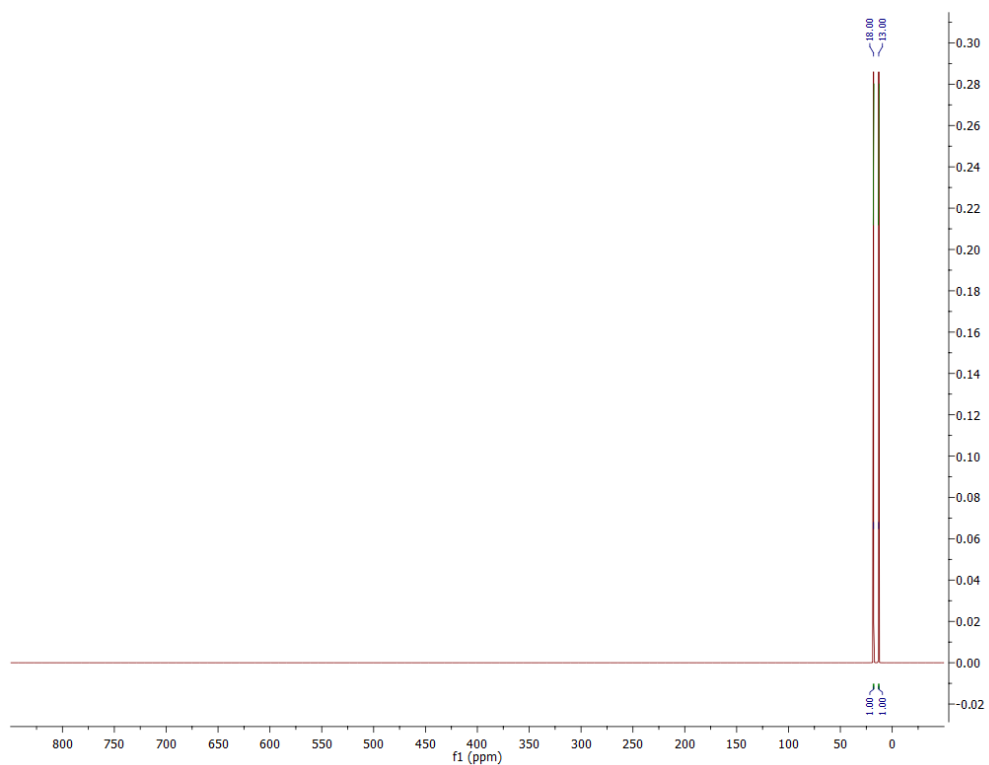
Слика ДМ59. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-R3a**.



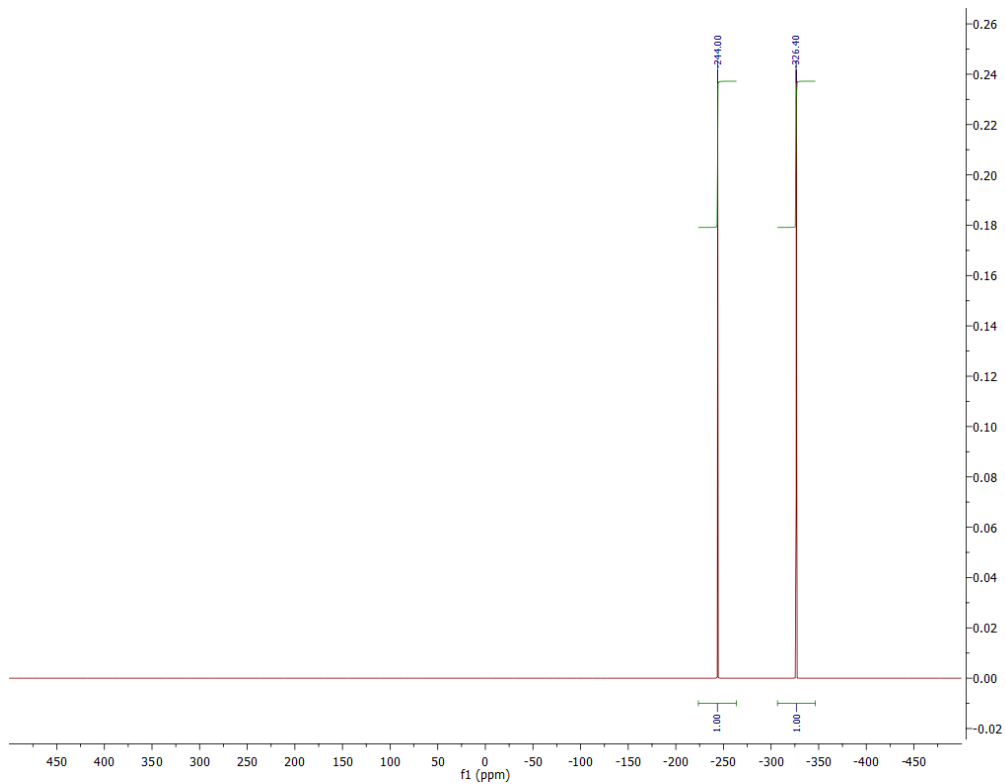
Слика ДМ60. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-R3a**.



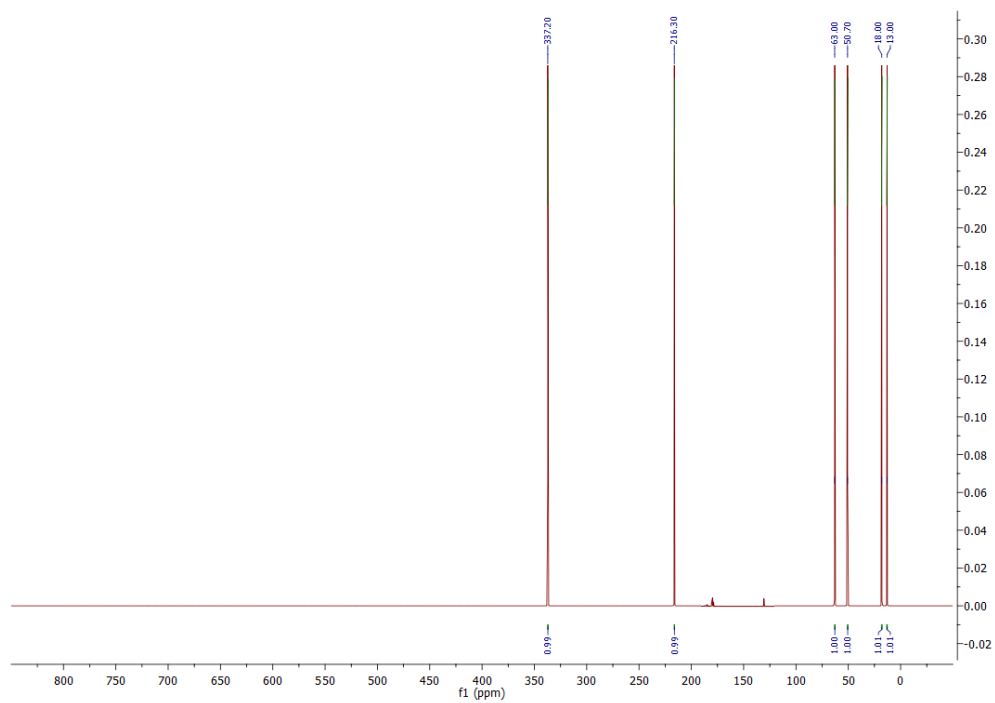
Слика ДМ61. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R3a**.



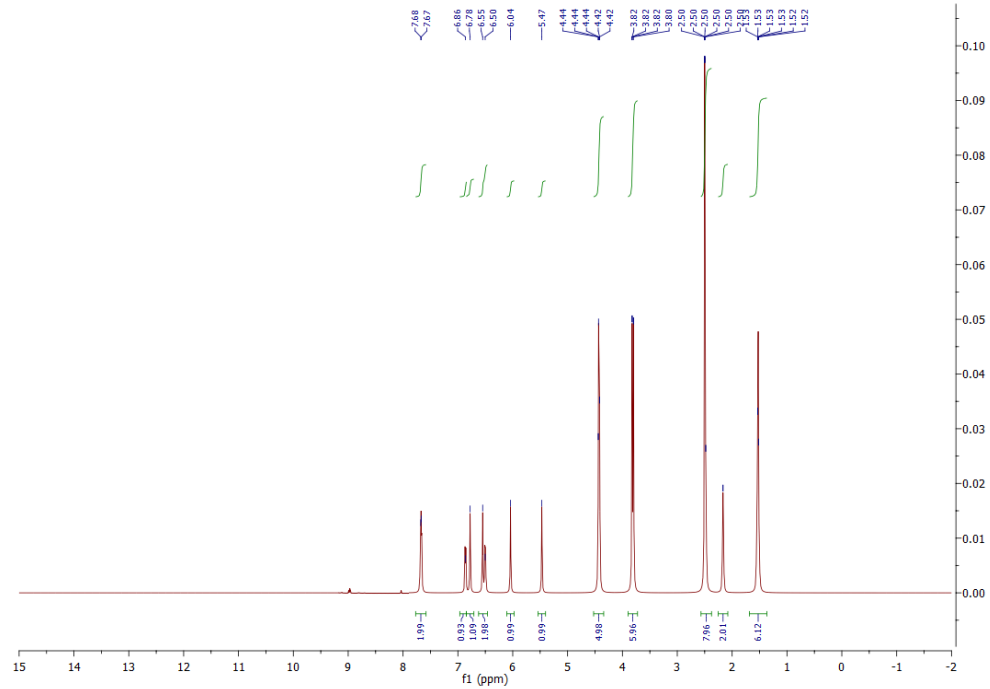
Слика ДМ62. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-R3a**.



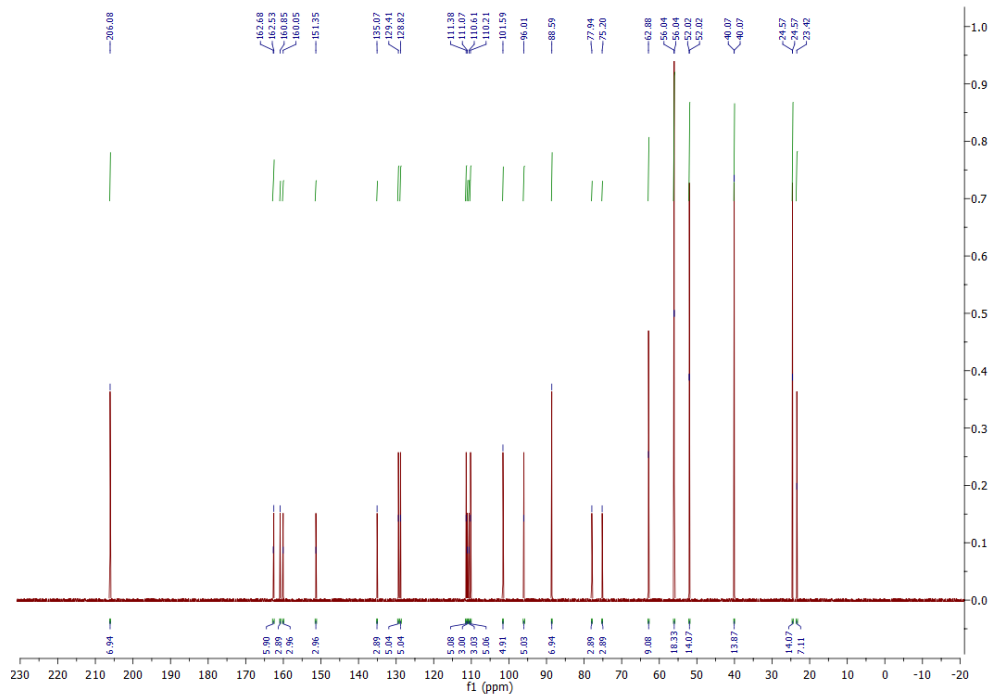
Слика ДМ65. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a**.



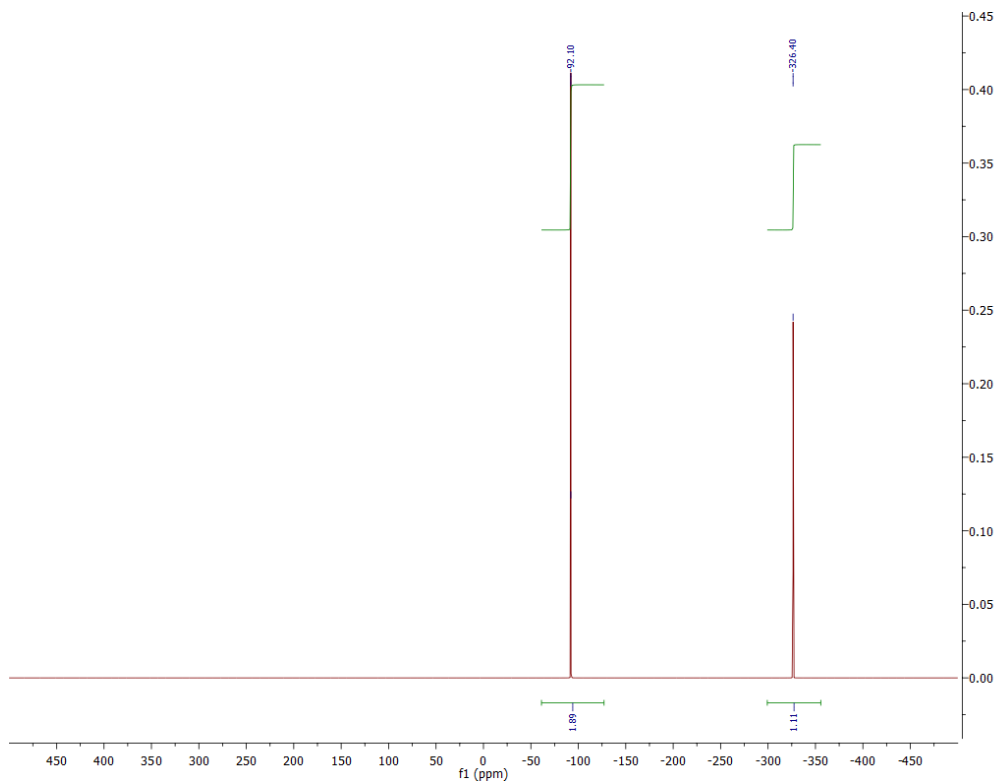
Слика ДМ66. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a**.



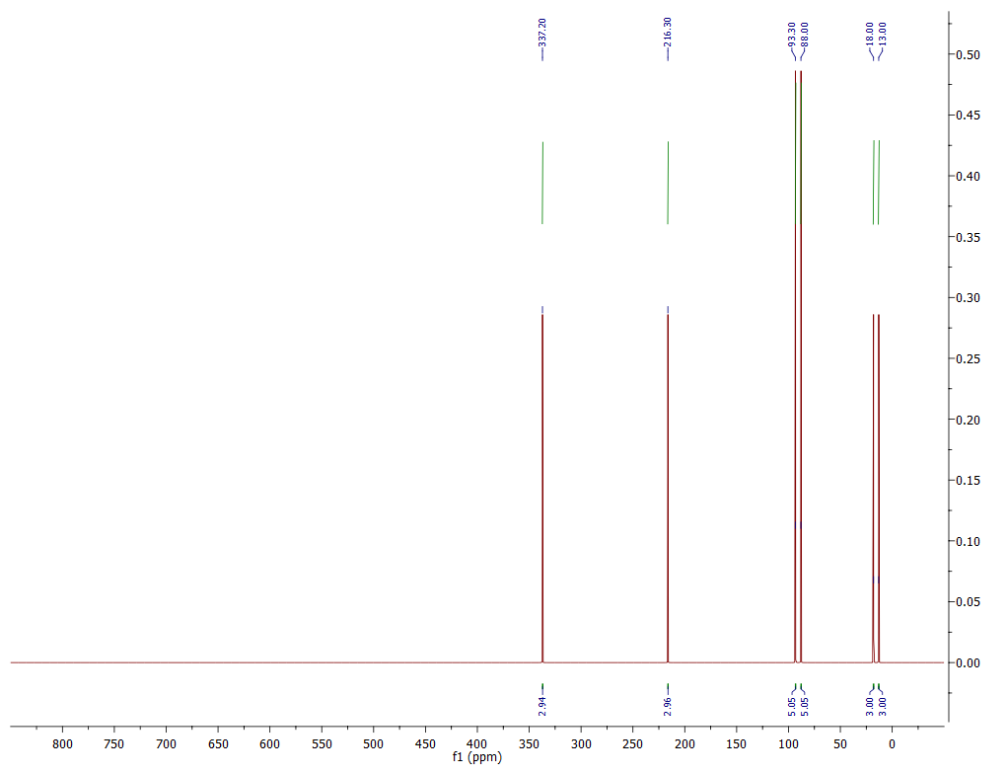
Слика ДМ67. ¹H NMR спектар једињења 3DQ-Pro-3a*.



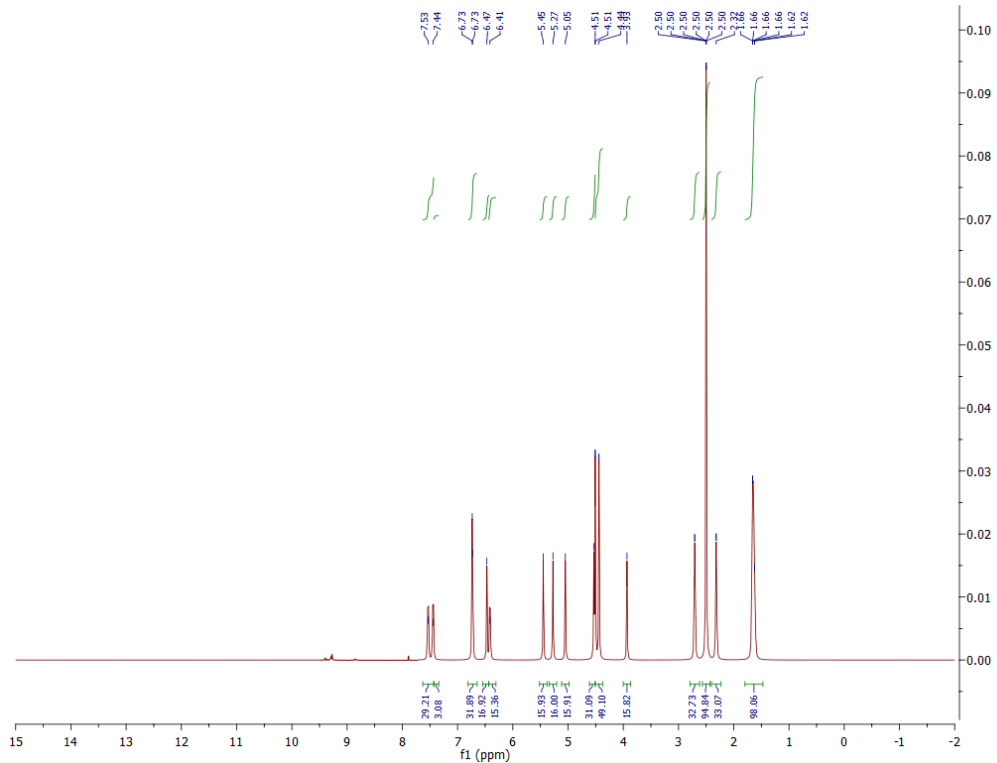
Слика ДМ68. ¹³C NMR спектар једињења 3DQ-Pro-3a*.



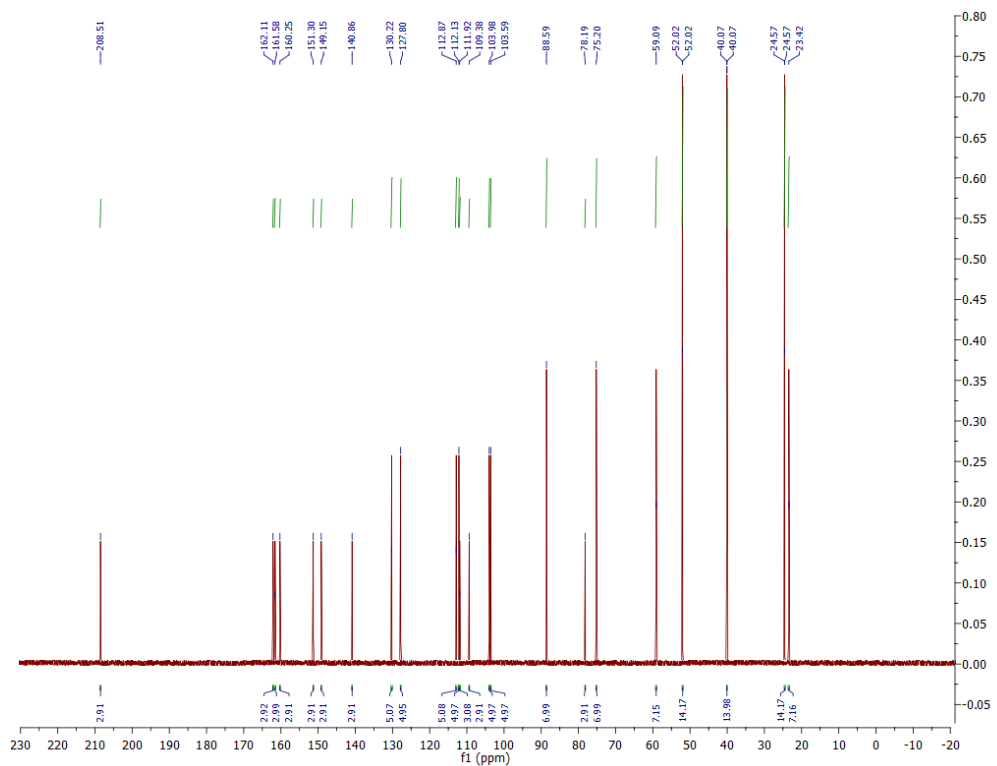
Слика ДМ69. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a***.



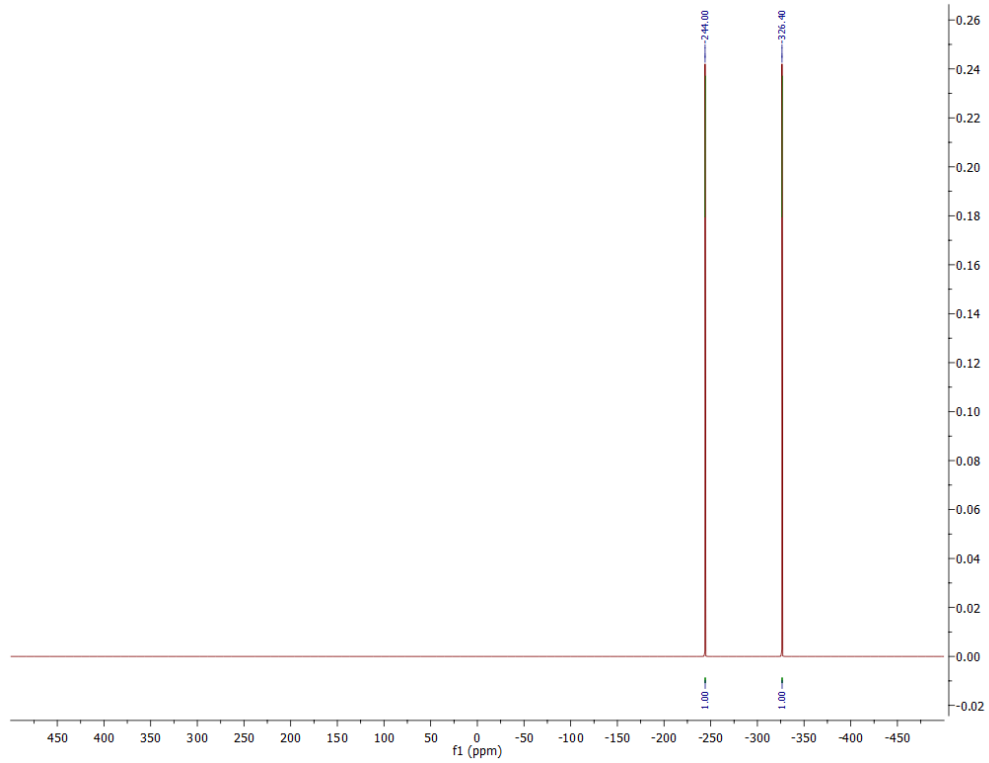
Слика ДМ70. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-3a***.



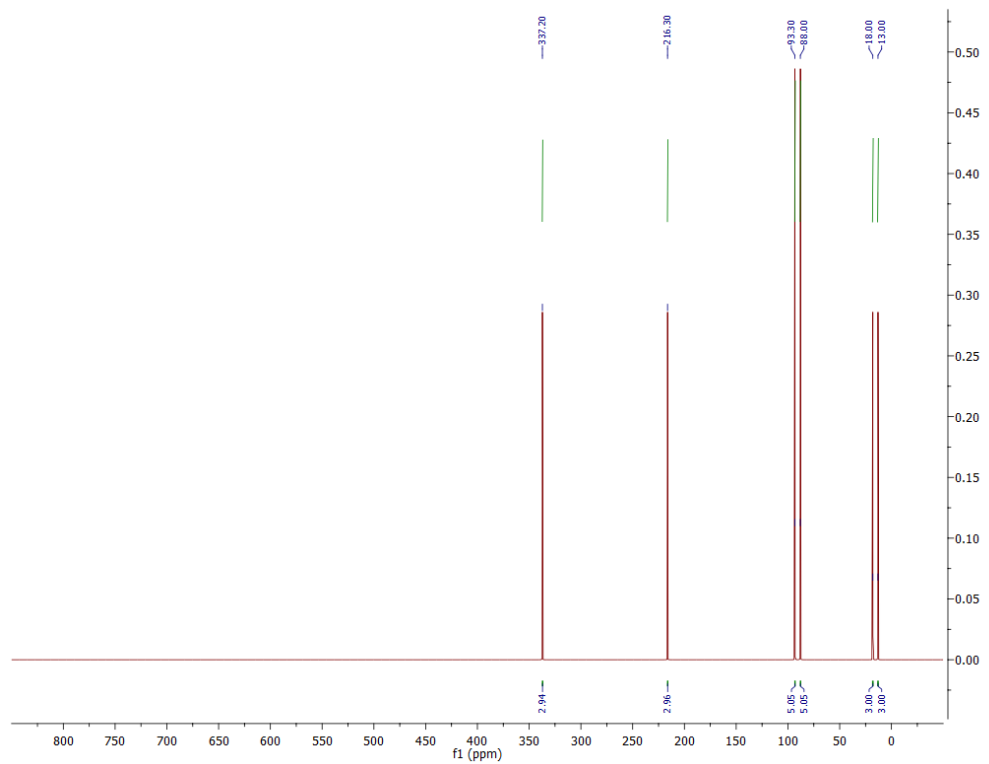
Слика ДМ71. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-3a**.



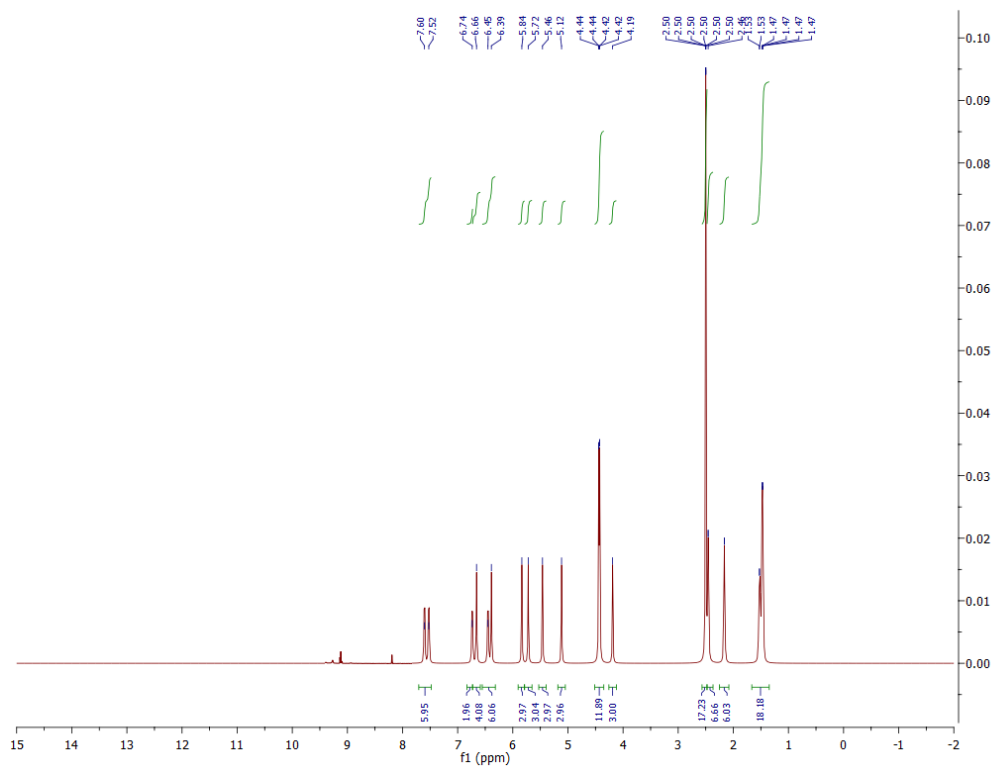
Слика ДМ72. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-3a**.



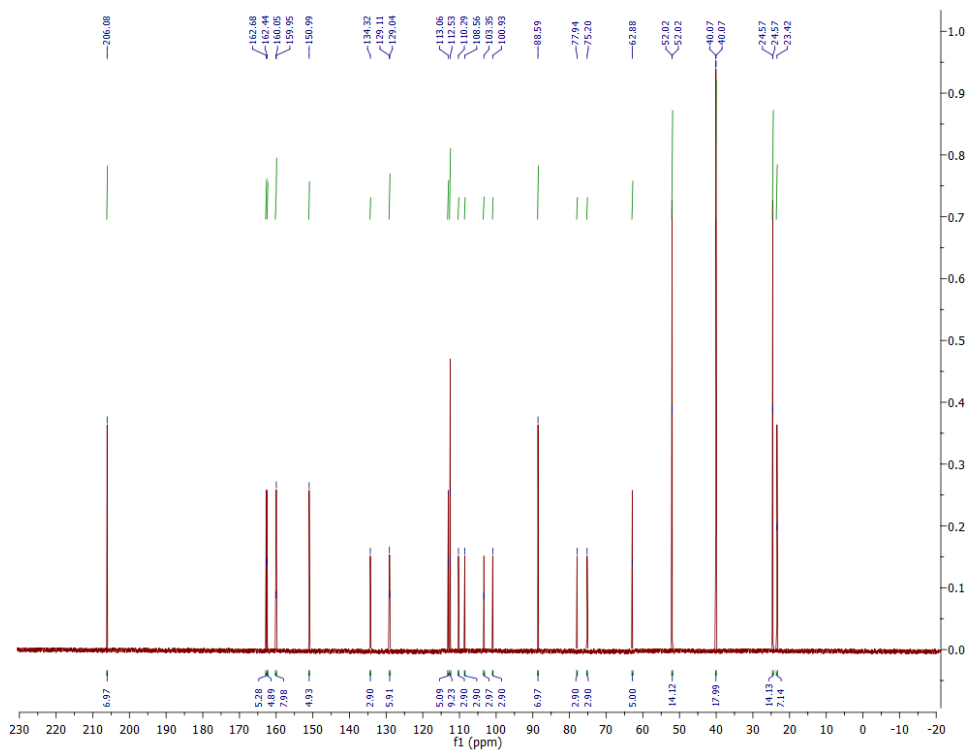
Слика ДМ73. ¹⁵N NMR спектар једињења **3DQ-3a**.



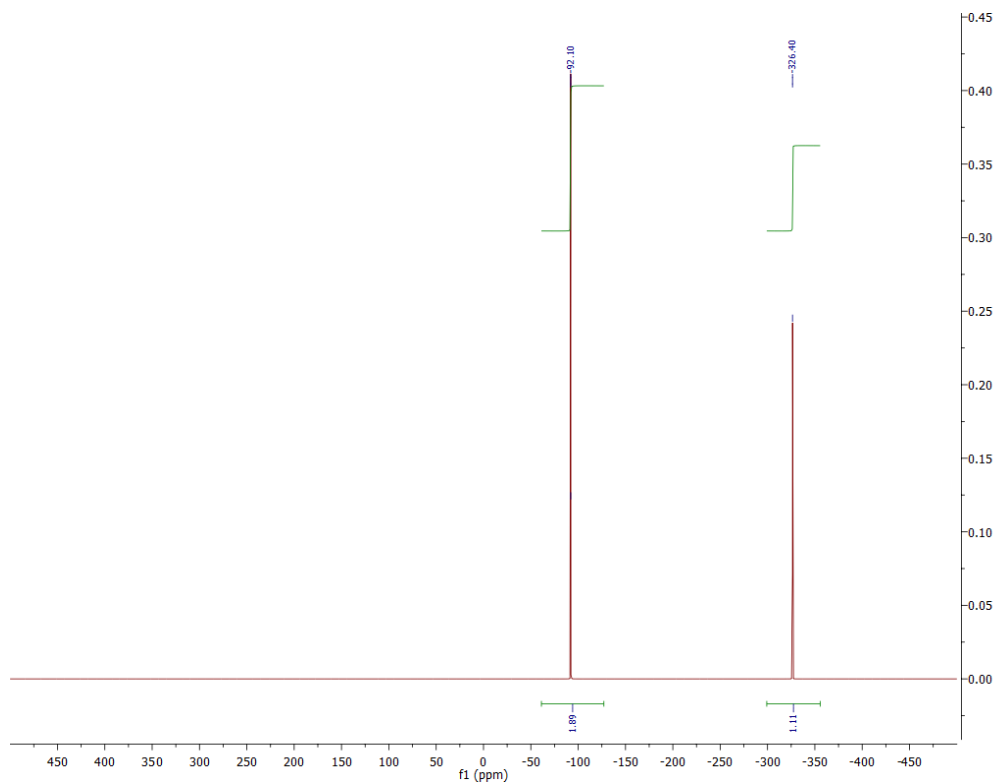
Слика ДМ74. ¹⁷O NMR спектар једињења **3DQ-3a**.



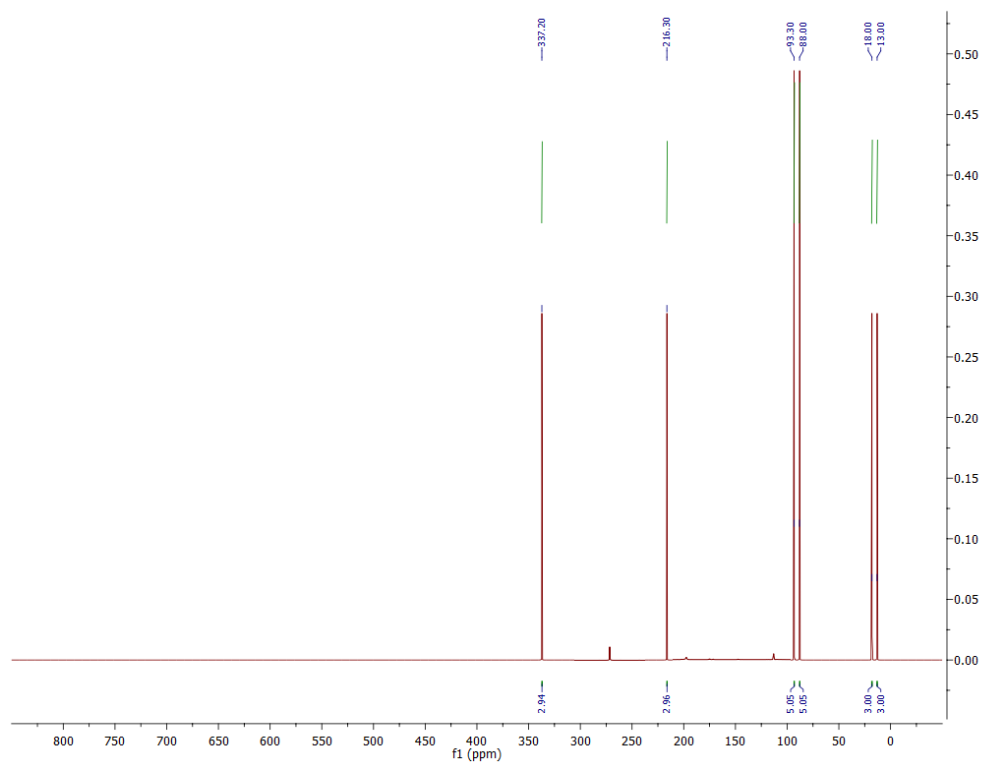
Слика ДМ75. ¹H NMR спектар једињења 3DQ-3а*.



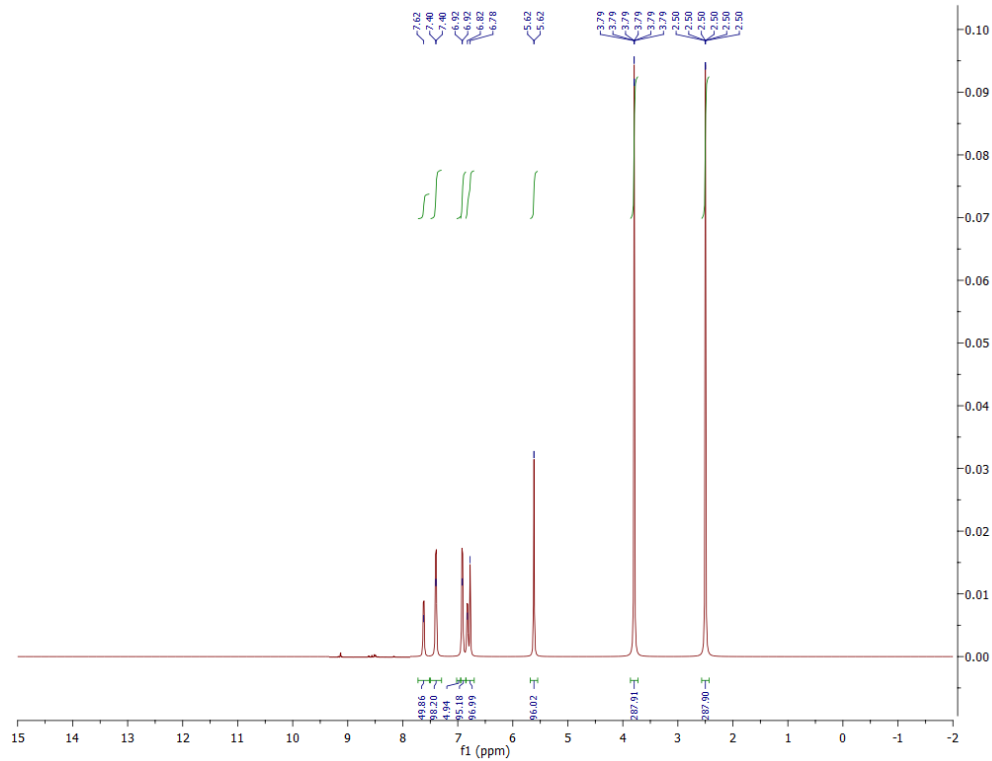
Слика ДМ76. ¹³C NMR спектар једињења 3DQ-3а*.



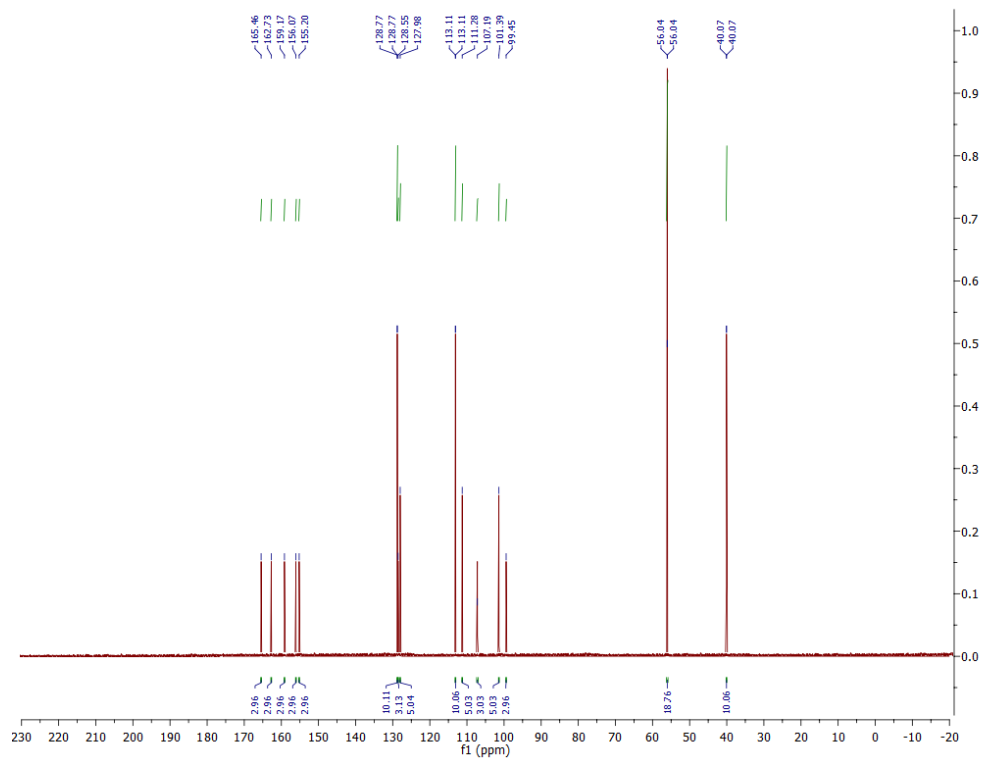
Слика ДМ77. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-3a***.



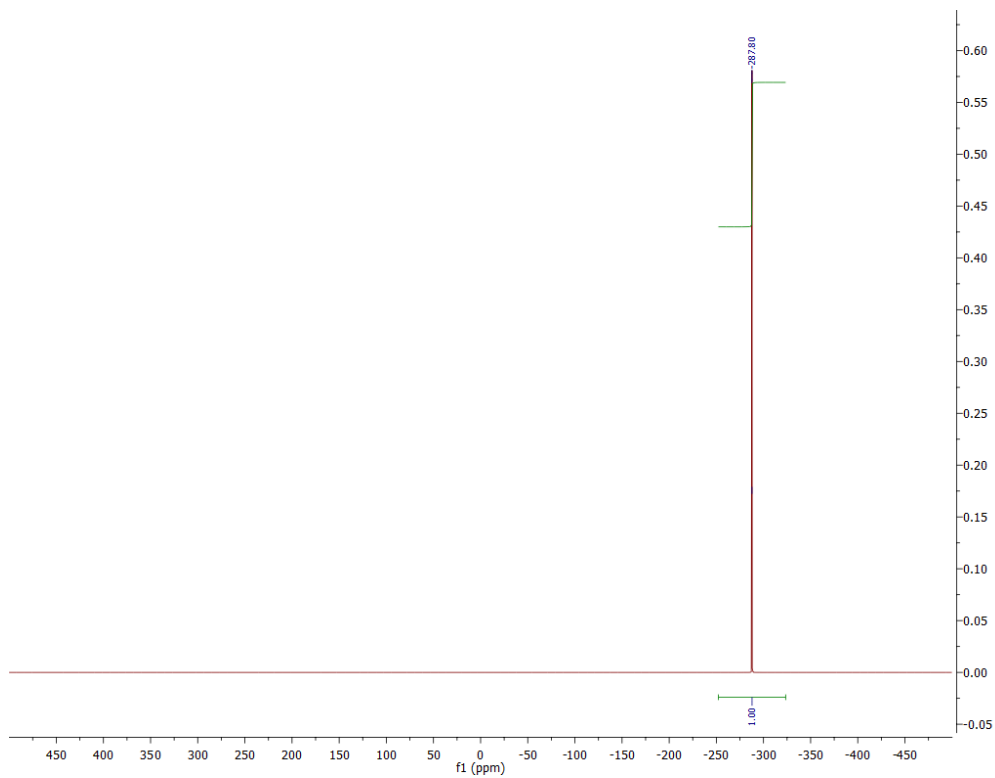
Слика ДМ78. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-3a***.



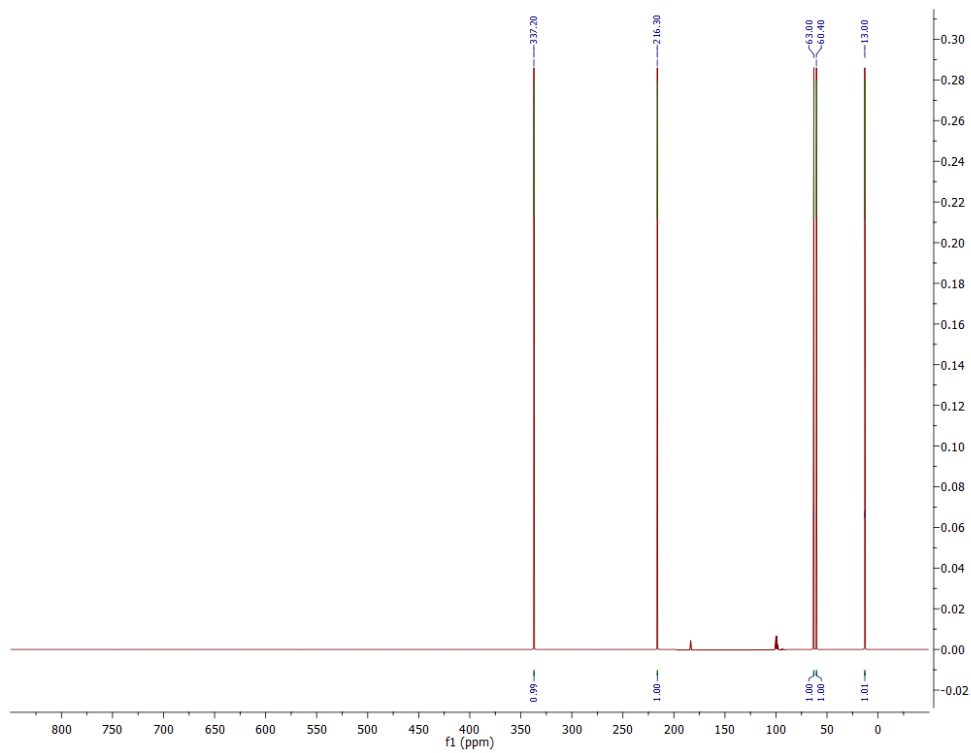
Слика ДМ79. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-A4**.



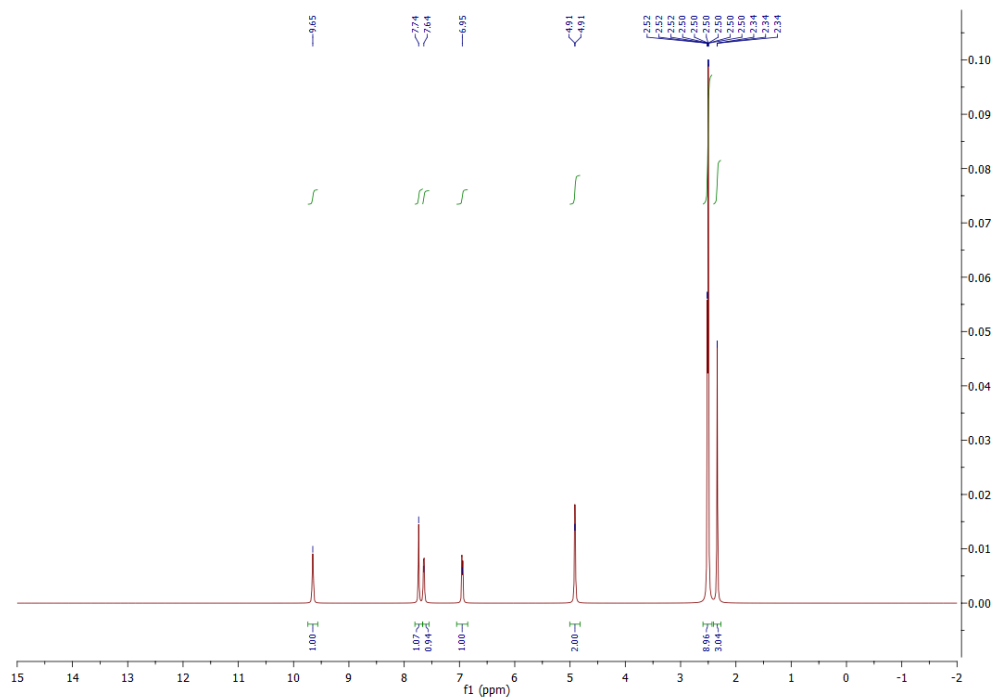
Слика ДМ80. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-A4**.



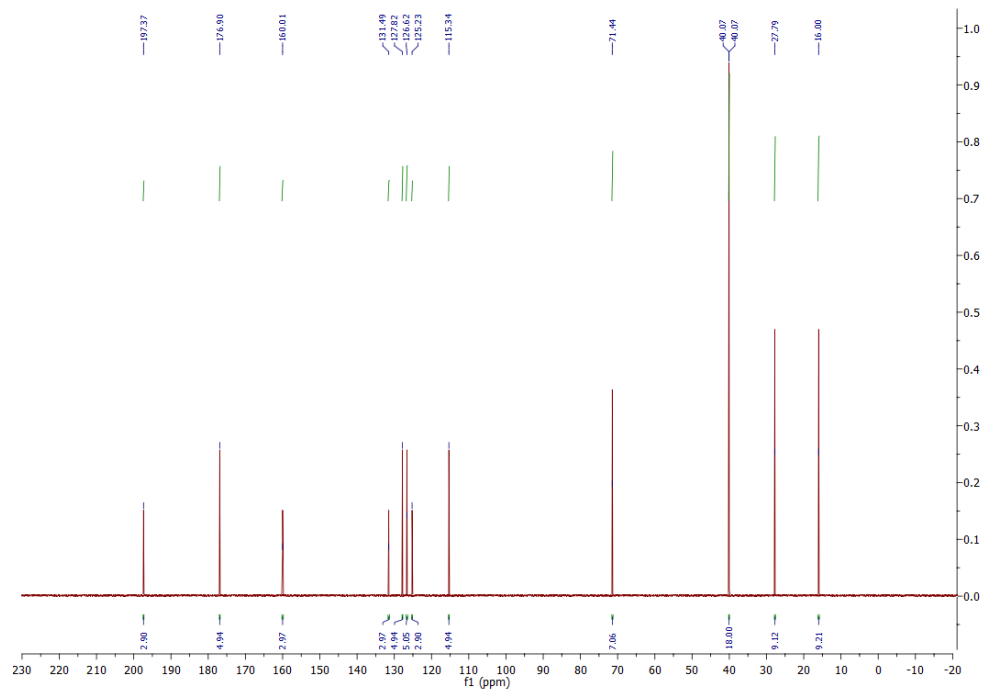
Слика ДМ81. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-A4**.



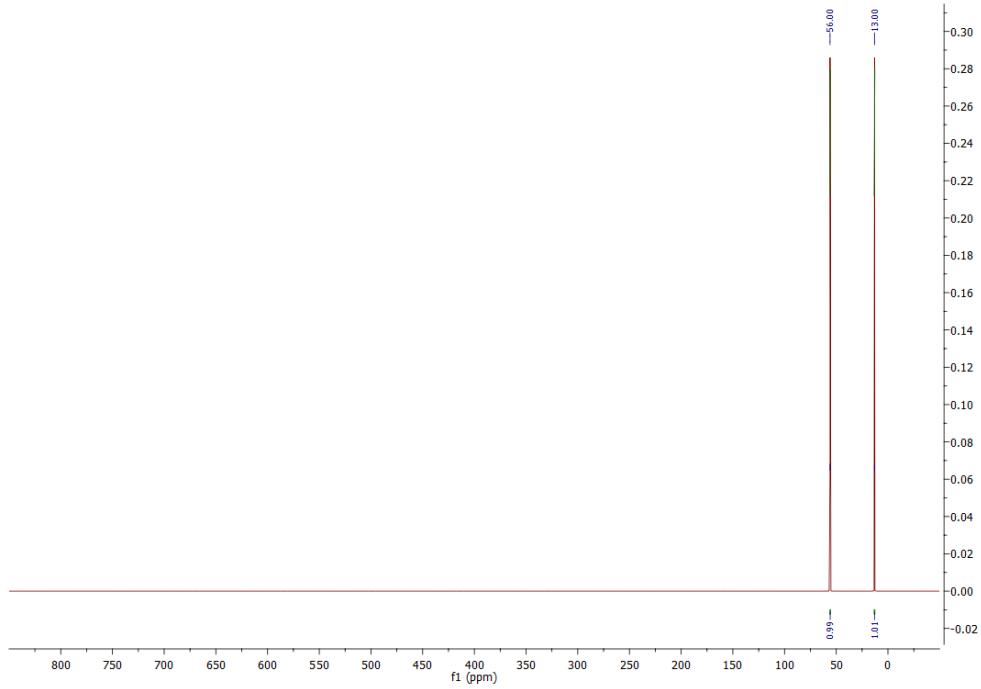
Слика ДМ82. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-A4**.



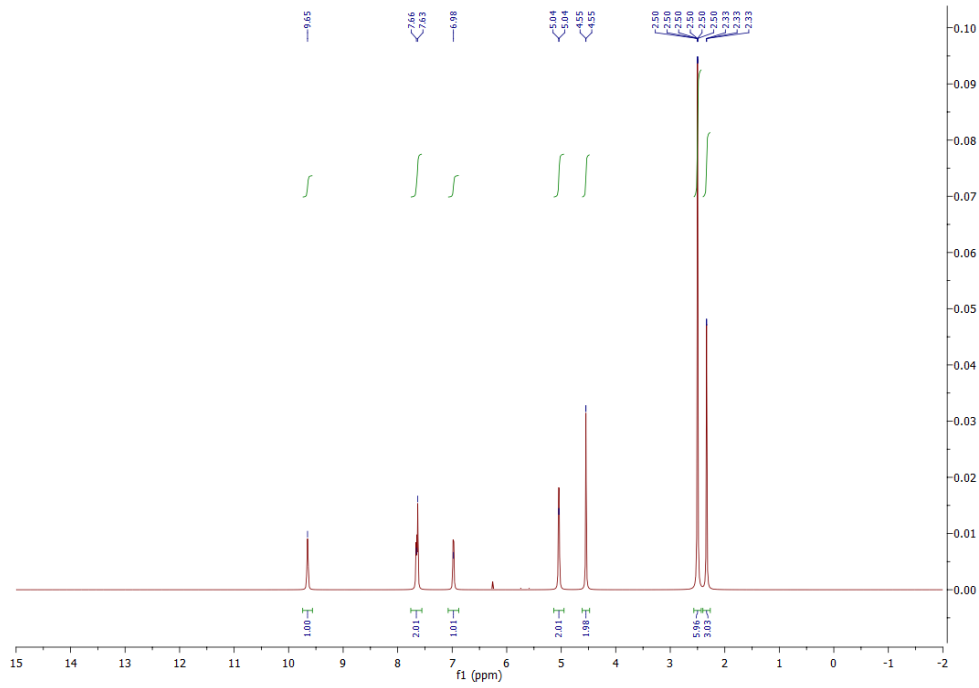
Слика ДМ83. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-R4a)**.



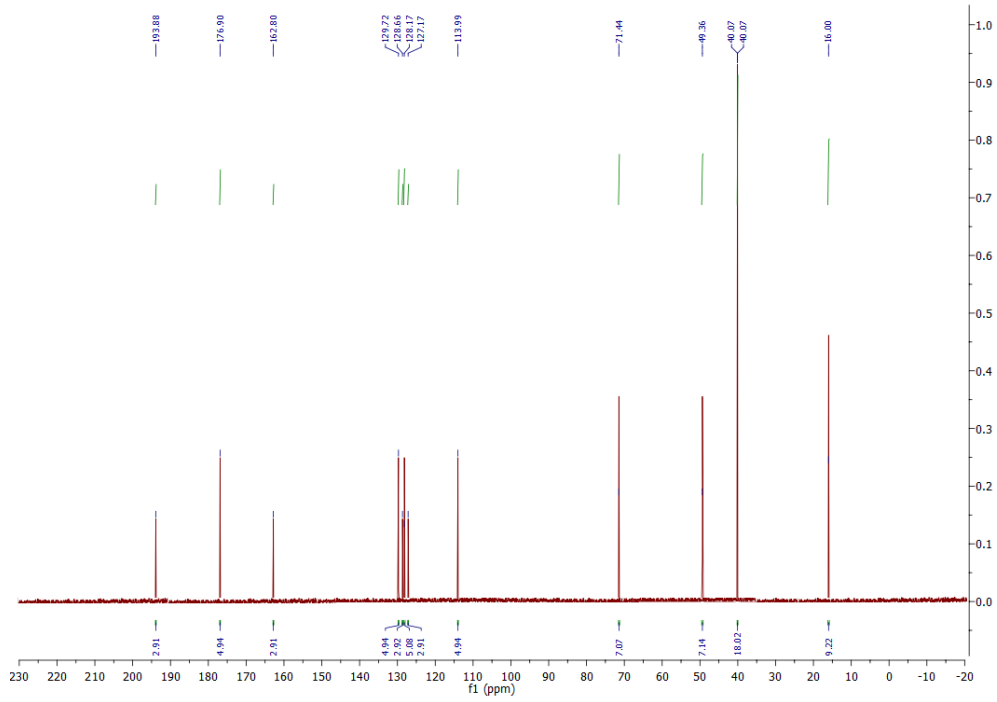
Слика ДМ84. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-R4a)**.



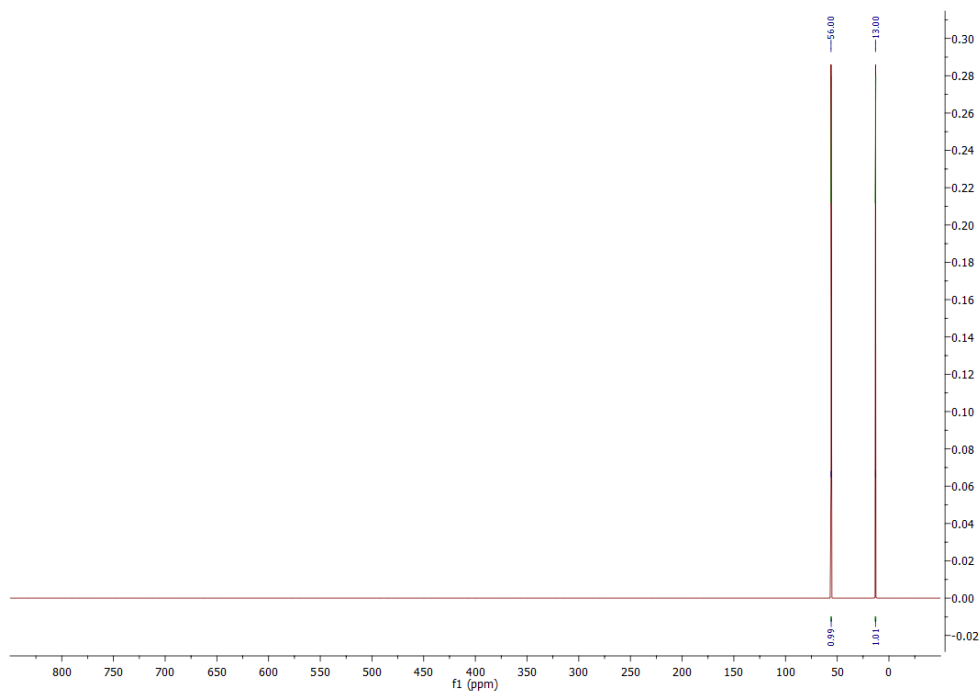
Слика ДМ85. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-R4a)**.



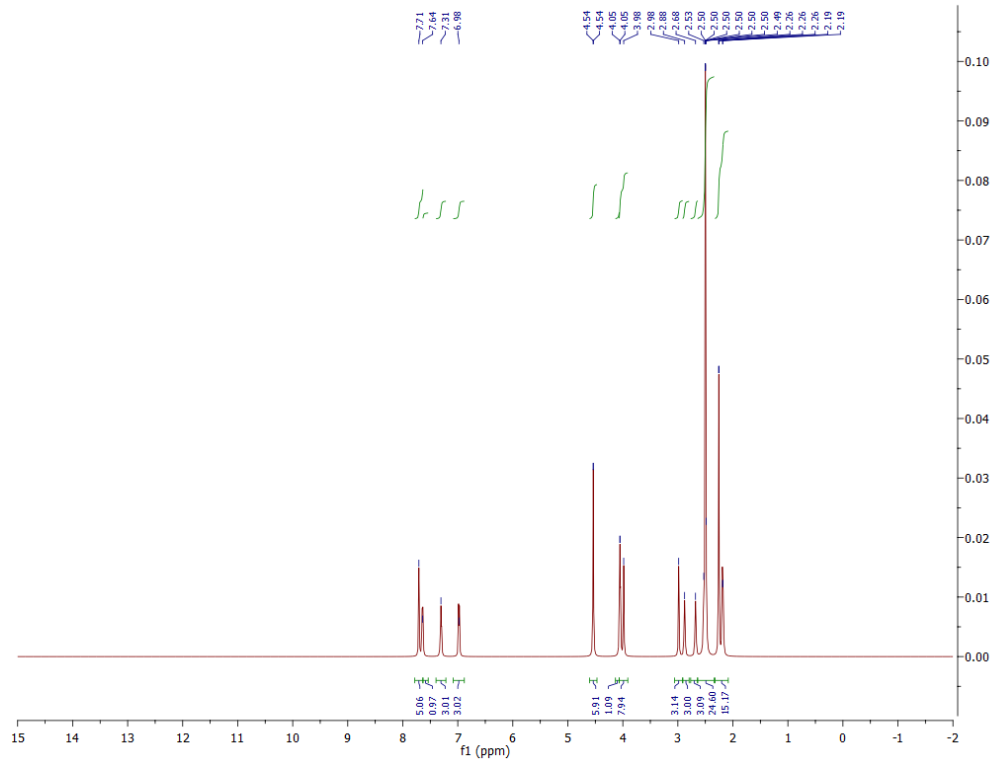
Слика ДМ86. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R4a**.



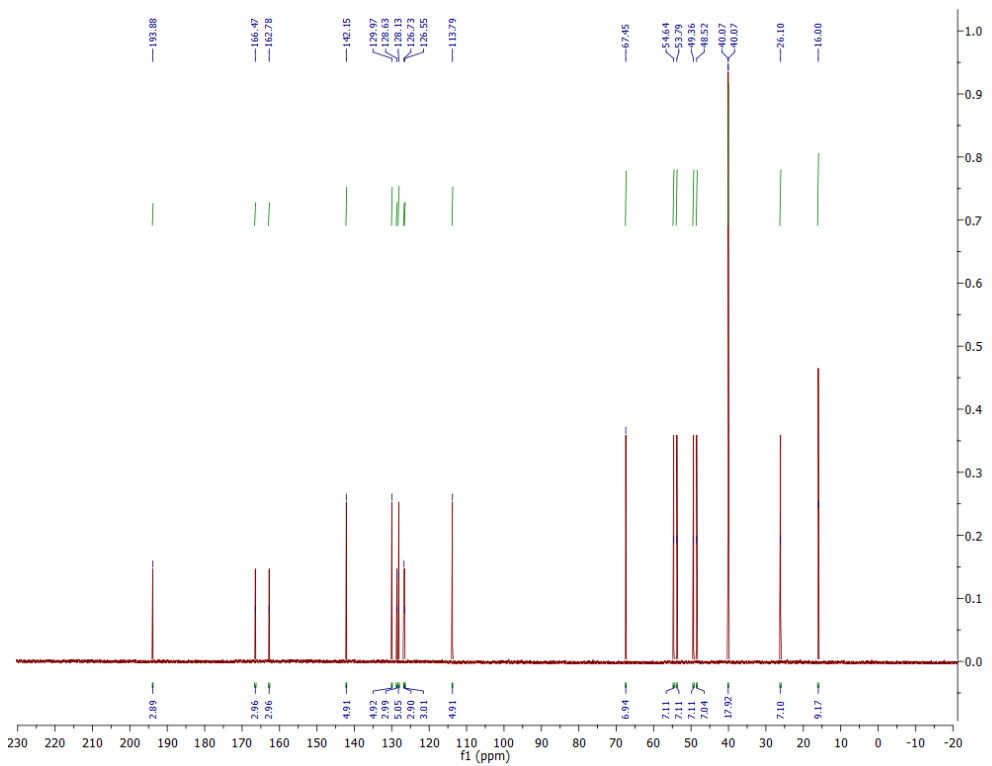
Слика ДМ87. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R4a**.



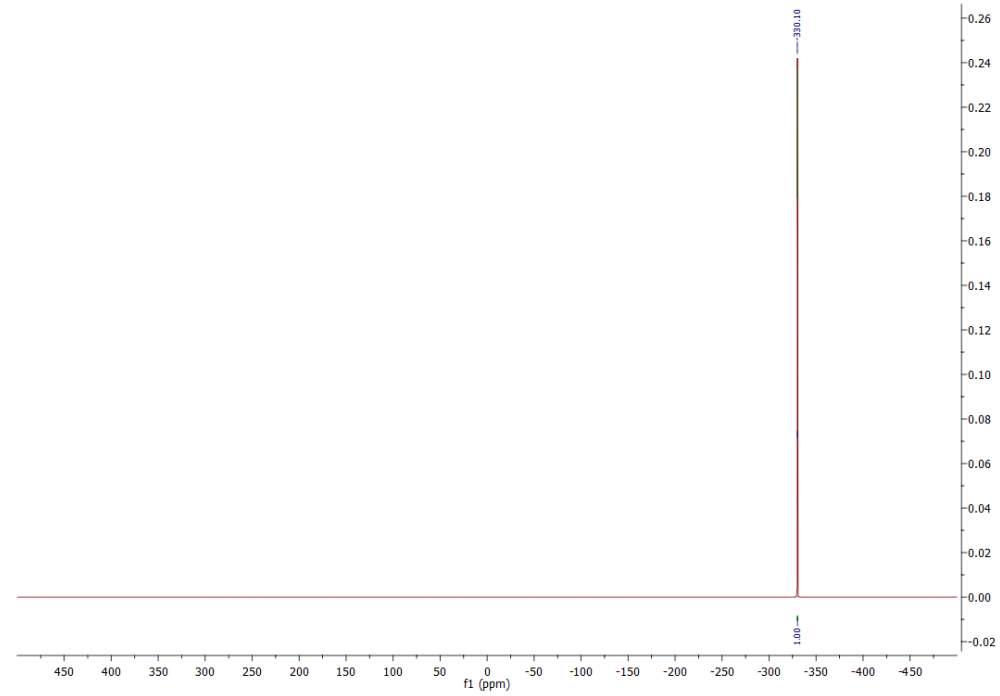
Слика ДМ88. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-R4a**.



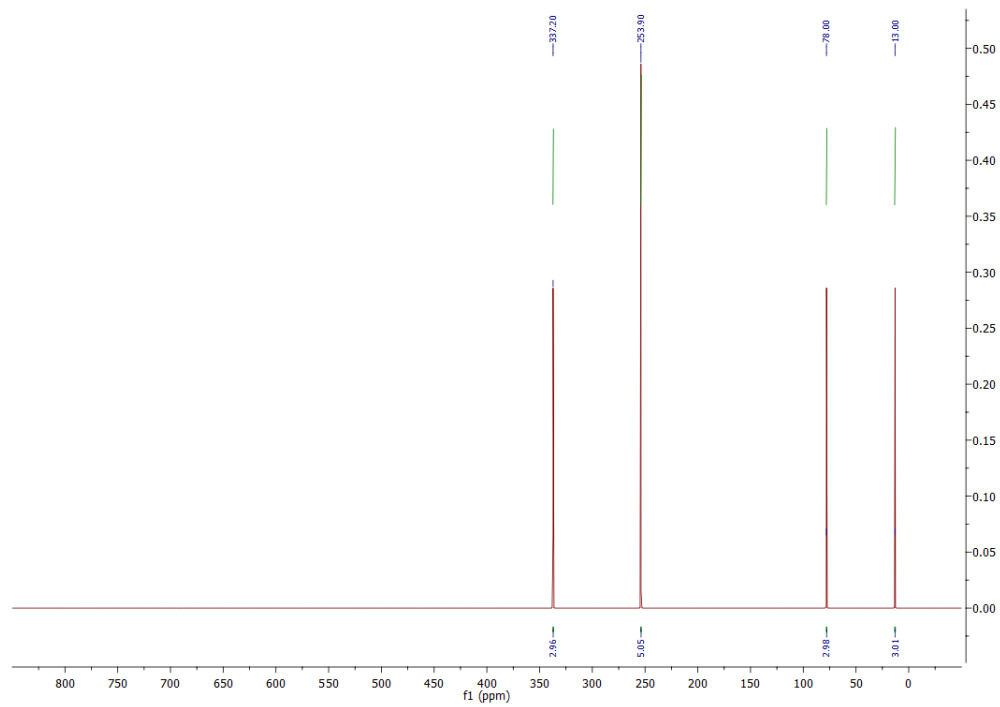
Слика ДМ89. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-R4a**.



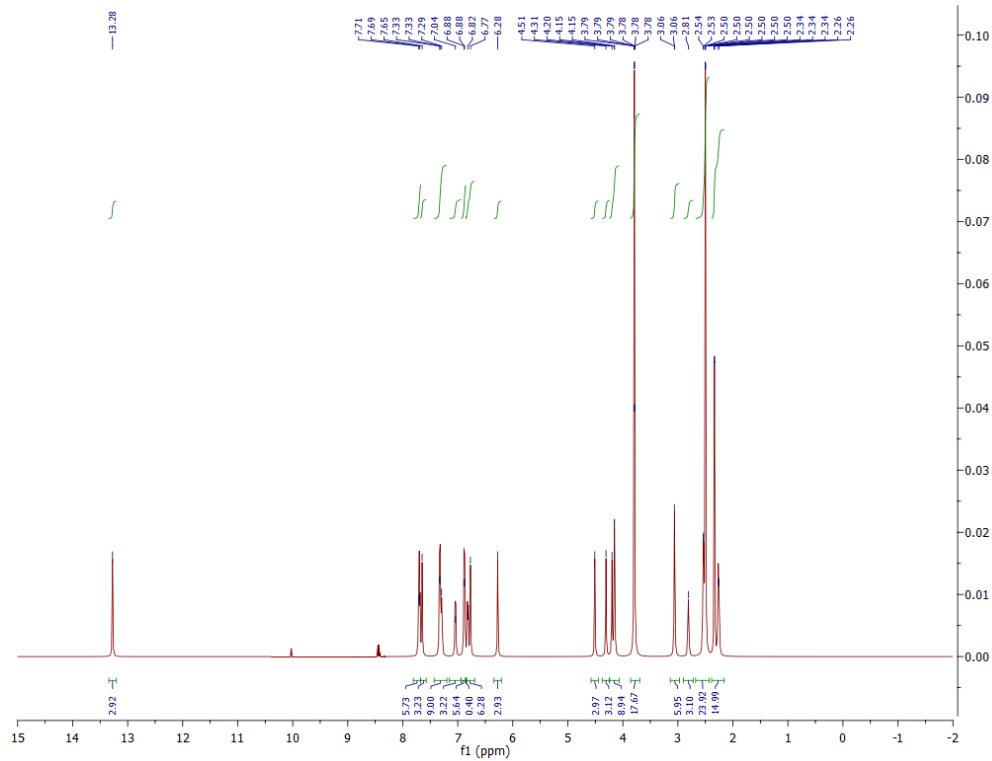
Слика ДМ90. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-R4a**.



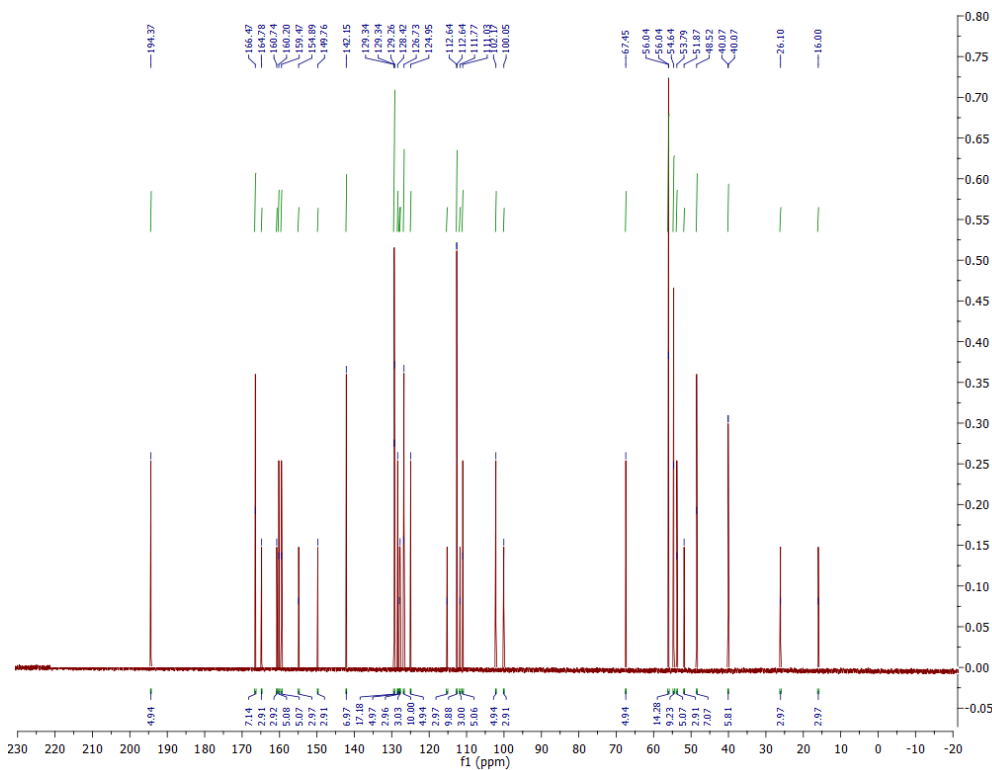
Слика ДМ91. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R4a**.



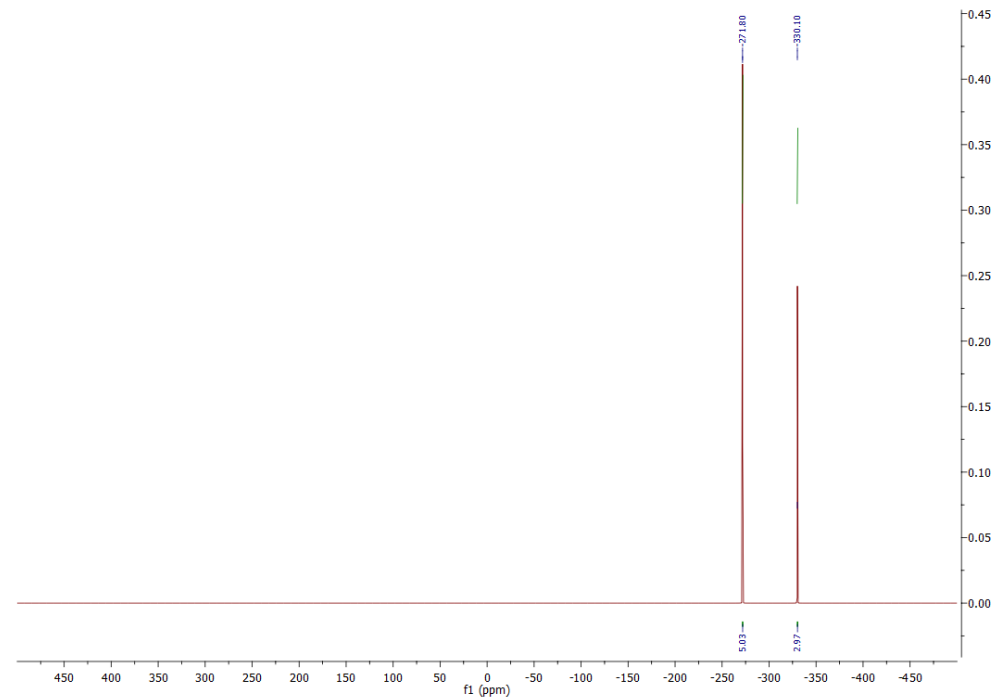
Слика ДМ92. ^{17}O NMR **3DQ-R4a**.



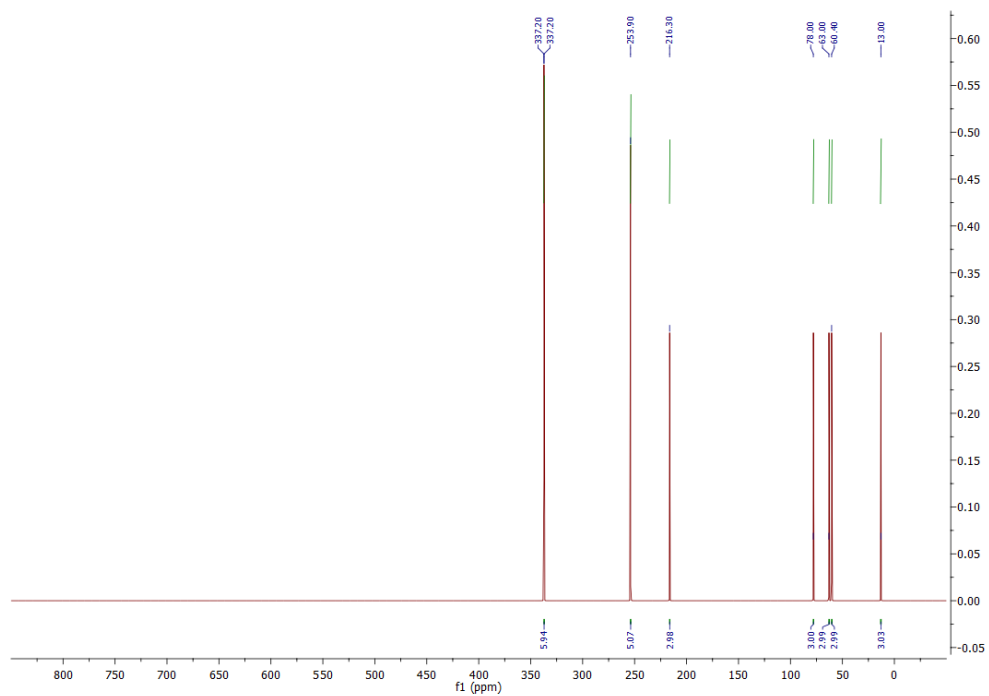
Слика ДМ93. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-4a**.



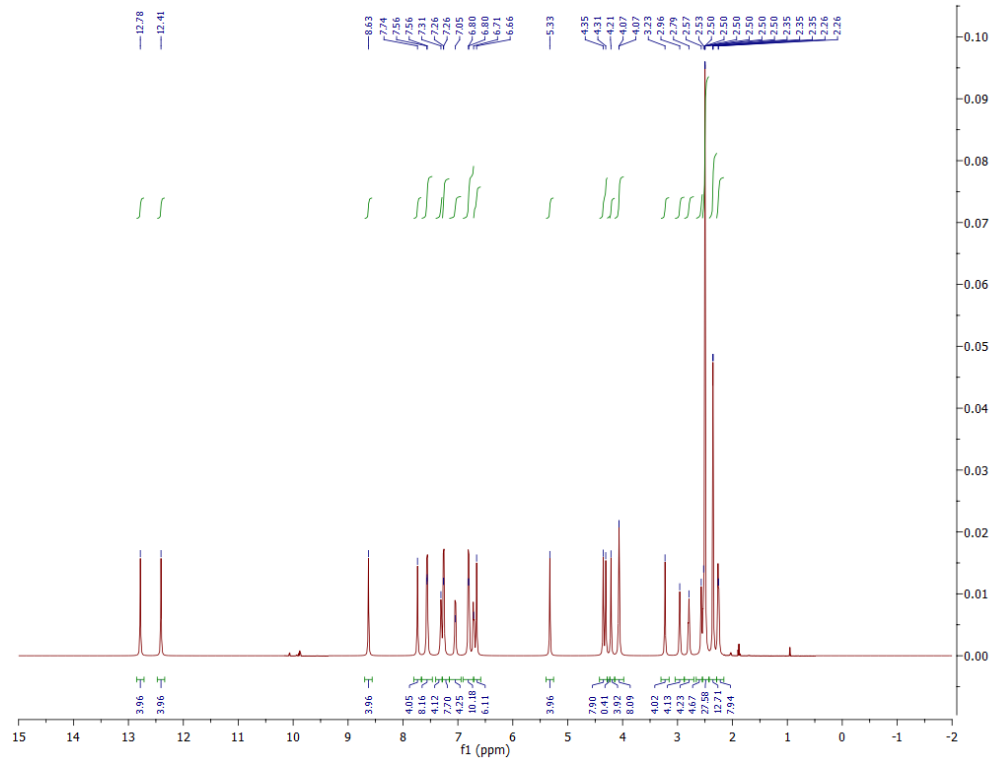
Слика ДМ94. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-4a**.



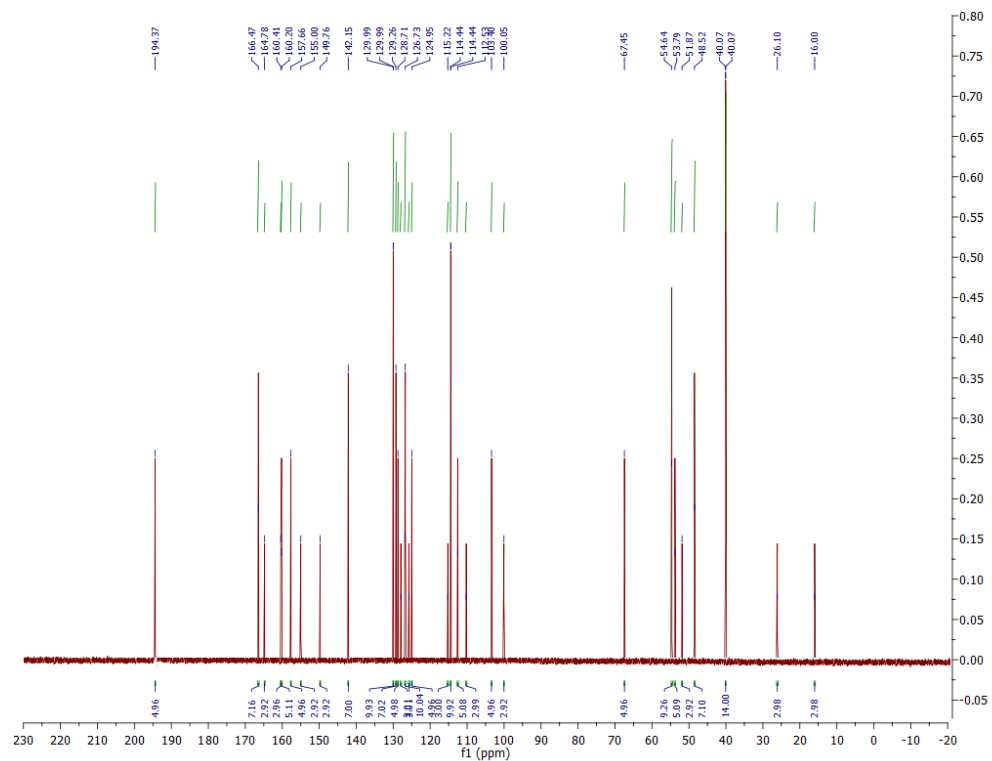
Слика ДМ95. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-4a**.



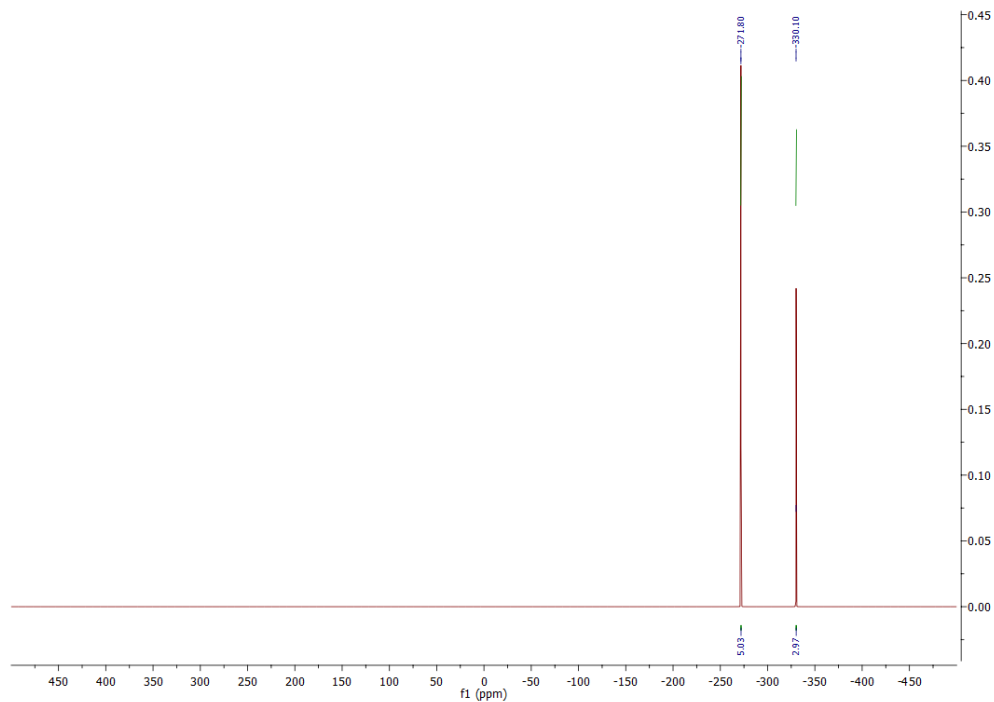
Слика ДМ96. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-4a**.



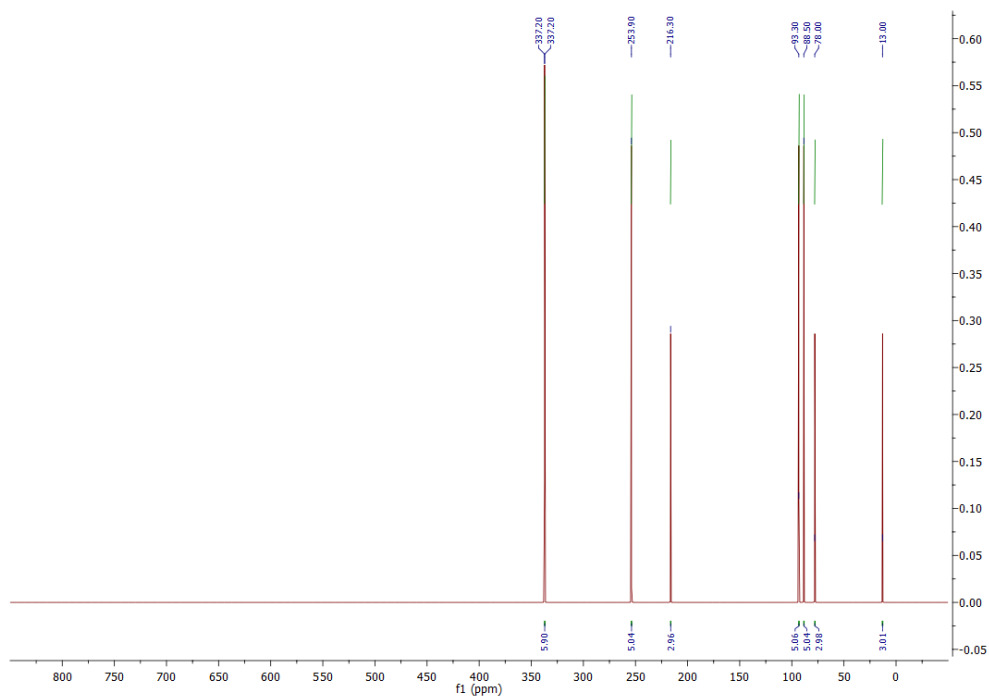
Слика ДМ97. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-4a**.



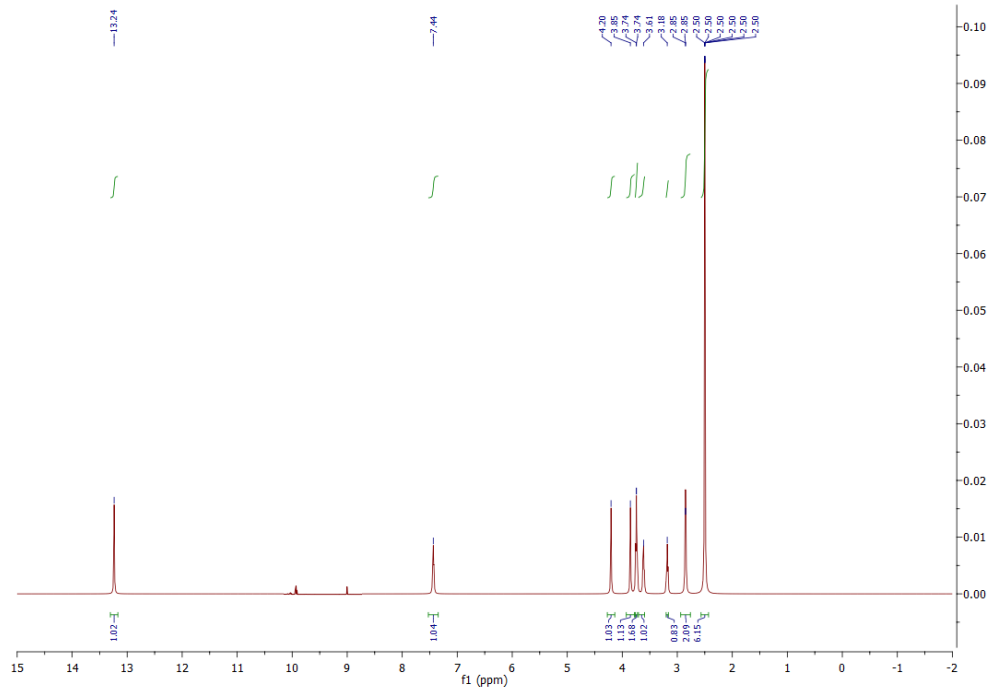
Слика ДМ98. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-4a**.



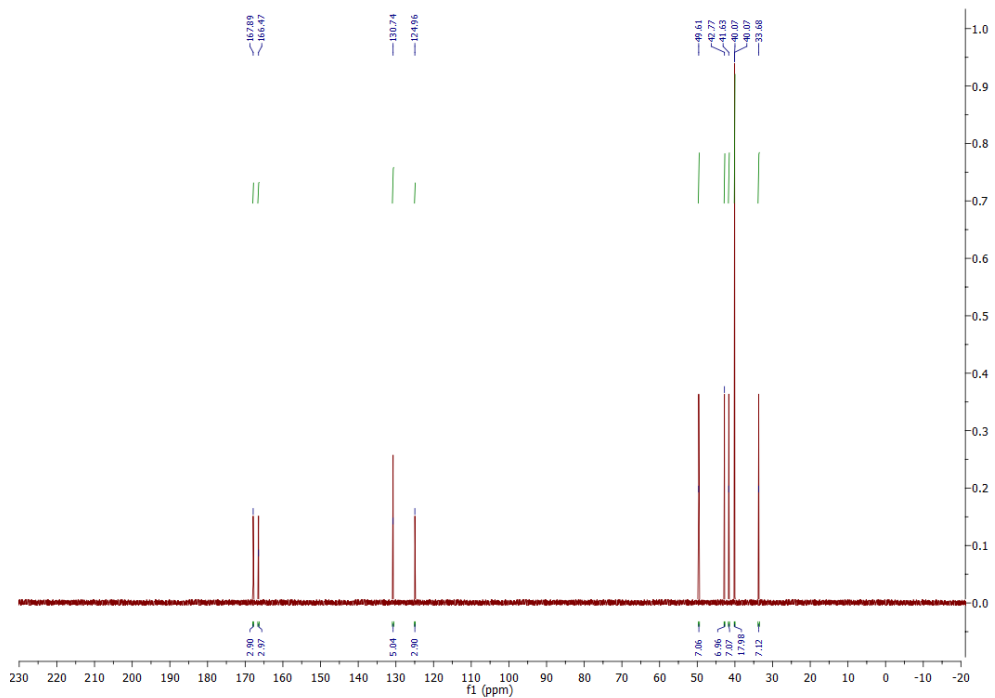
Слика ДМ99. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-4a**.



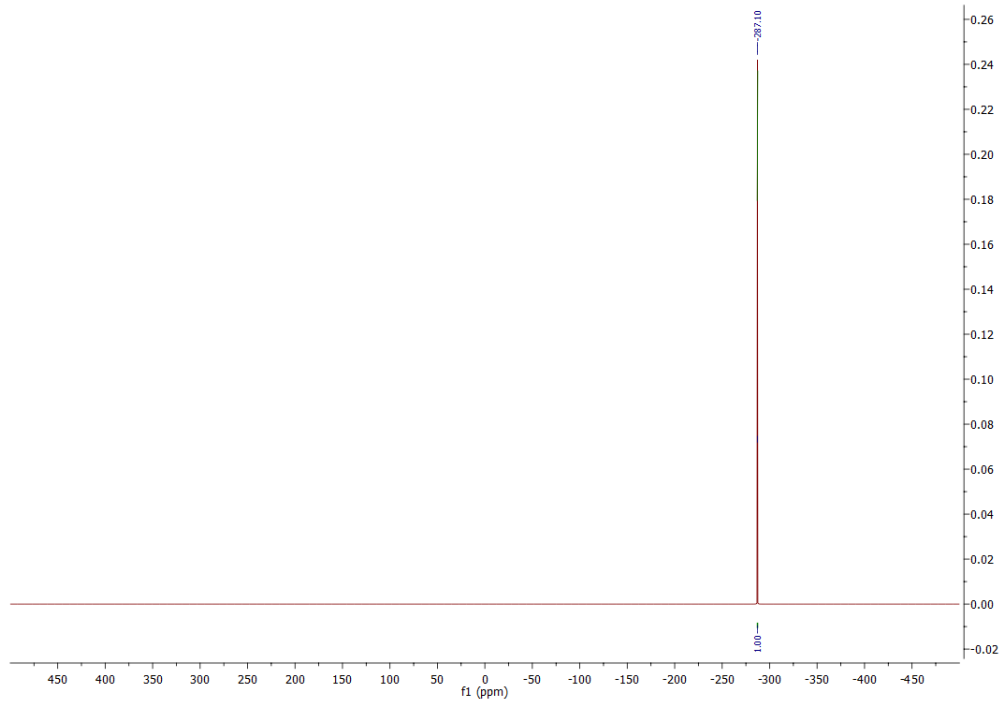
Слика ДМ100. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-4a**.



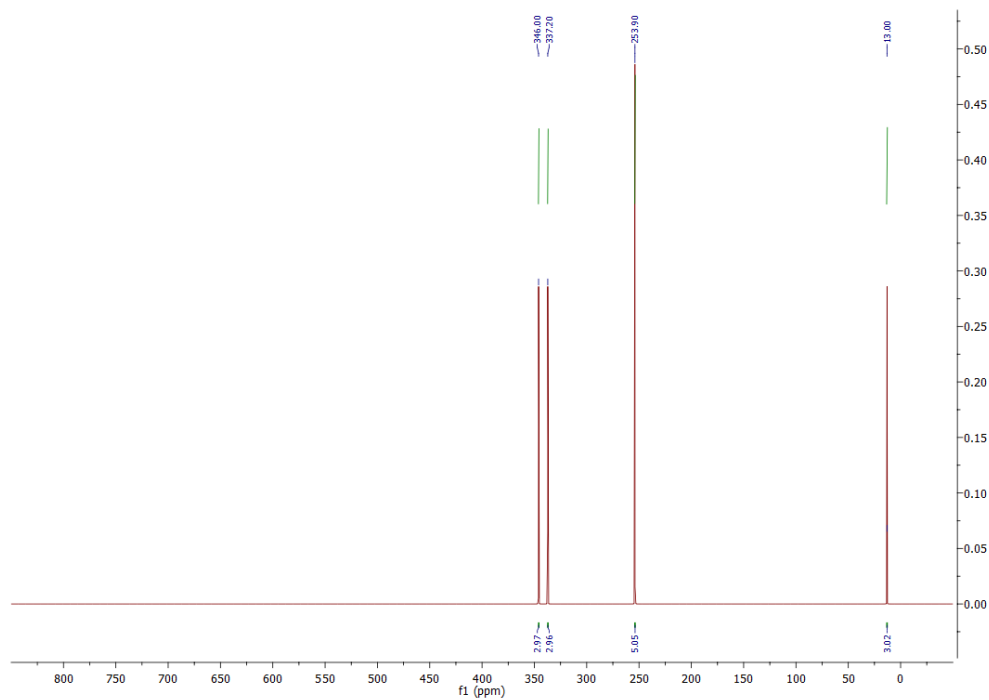
Слика ДМ101. ¹H NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR1)**.



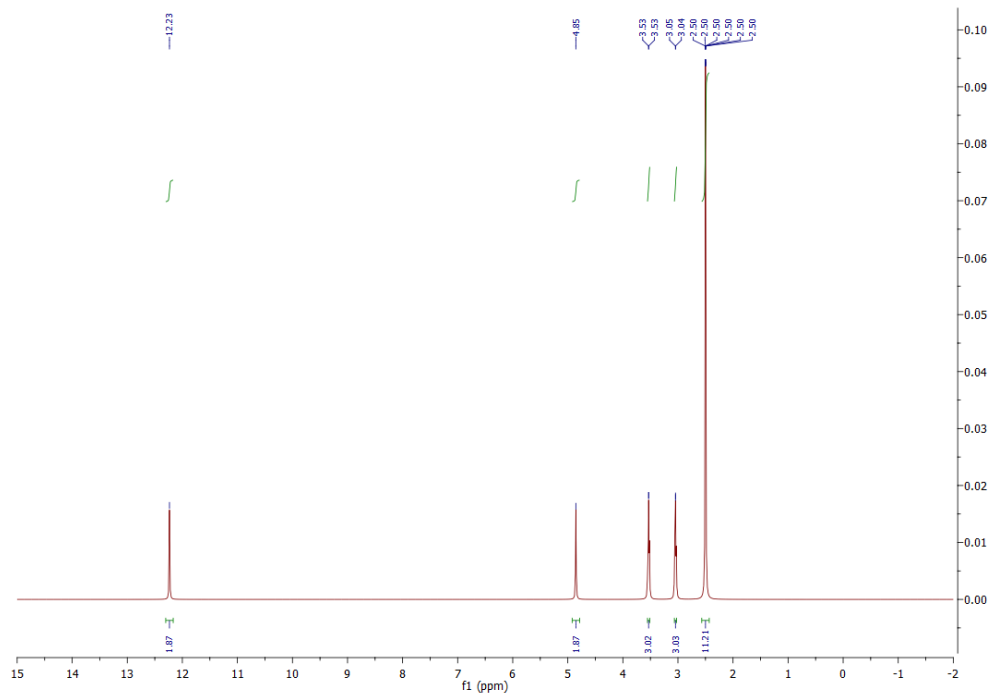
Слика ДМ102. ¹³C NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR1)**.



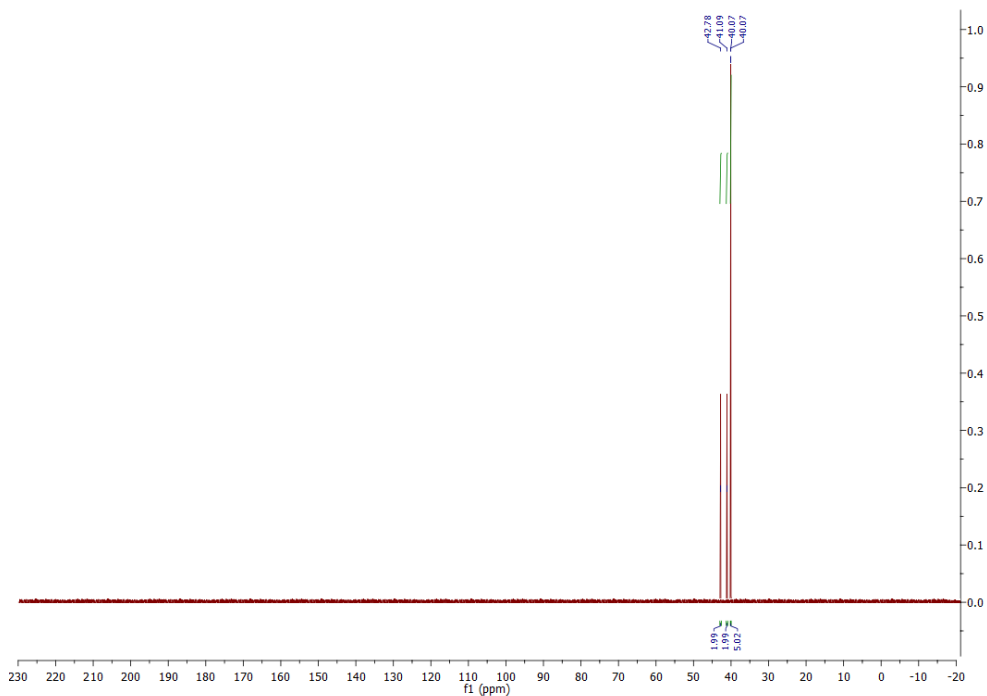
Слика ДМ103. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR1)**.



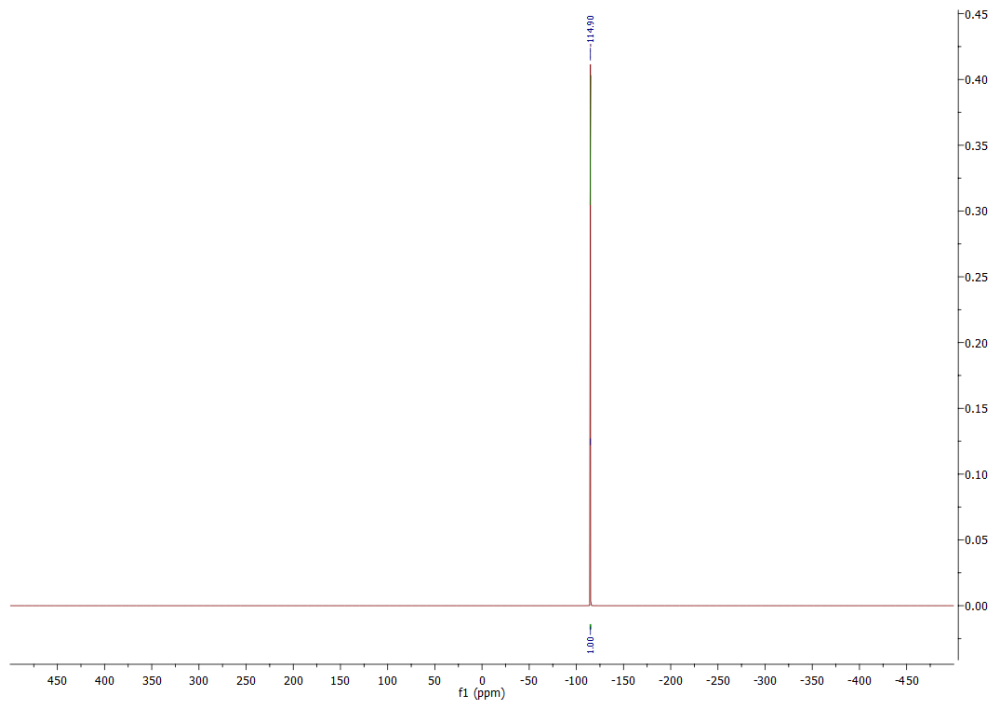
Слика ДМ104. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR1)**.



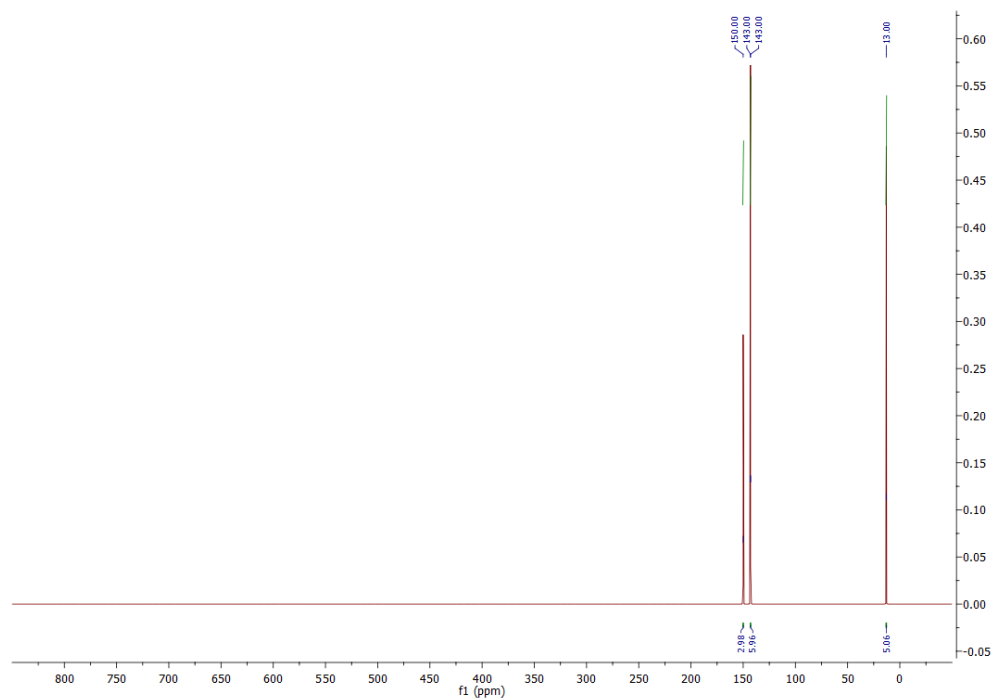
Слика ДМ105. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR2)**.



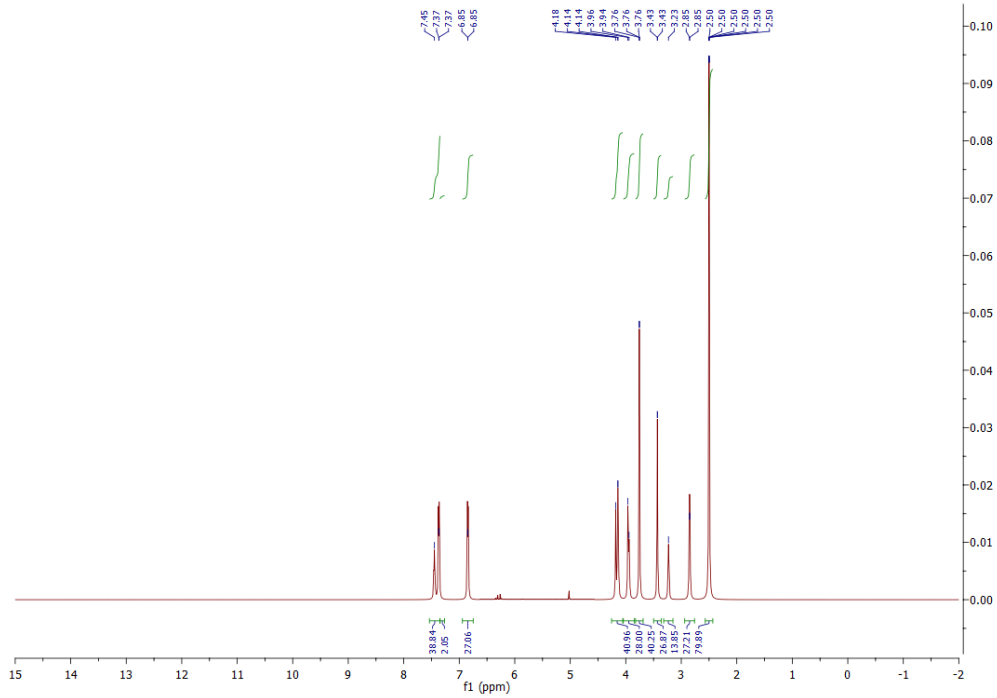
Слика ДМ106. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR2)**.



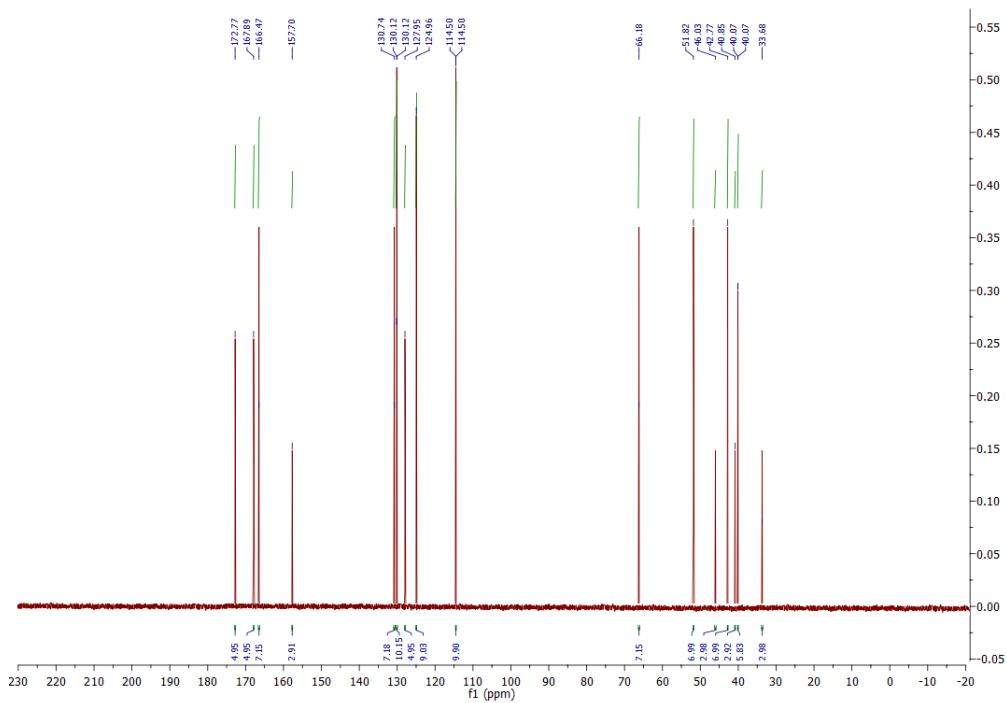
Слика ДМ107. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR2)**.



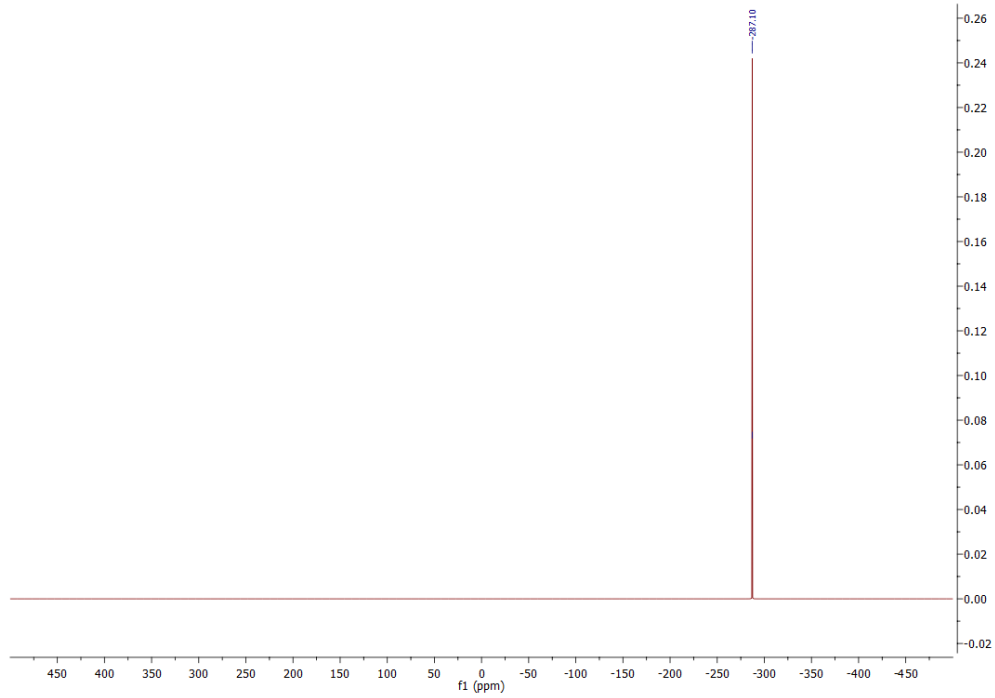
Слика ДМ108. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro(Pro-RR2)**.



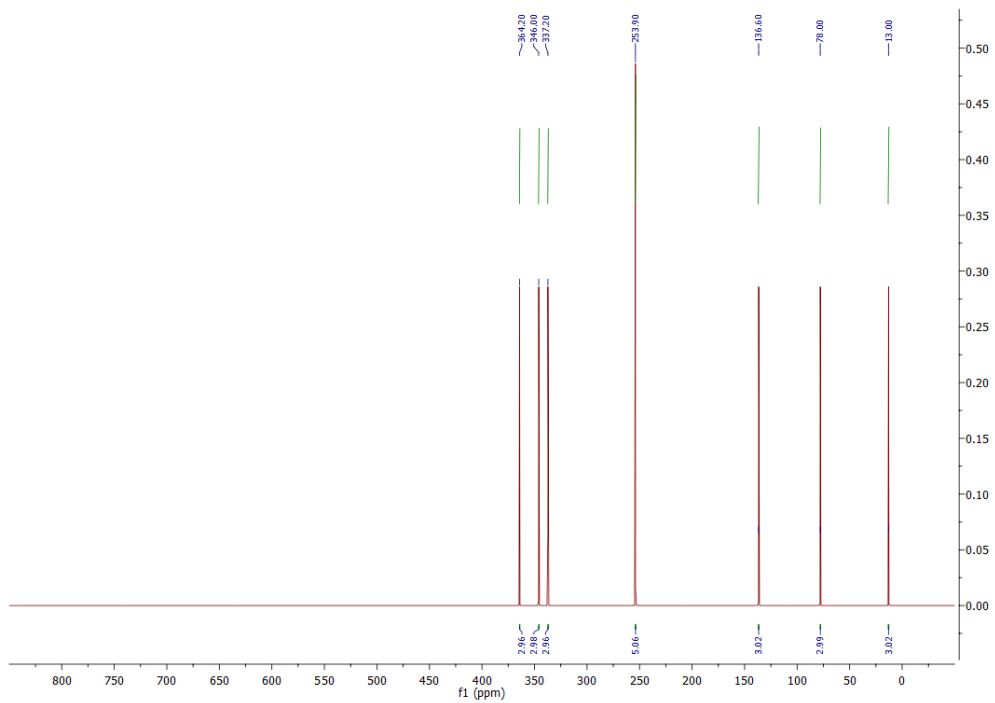
Слика ДМ109. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR1**.



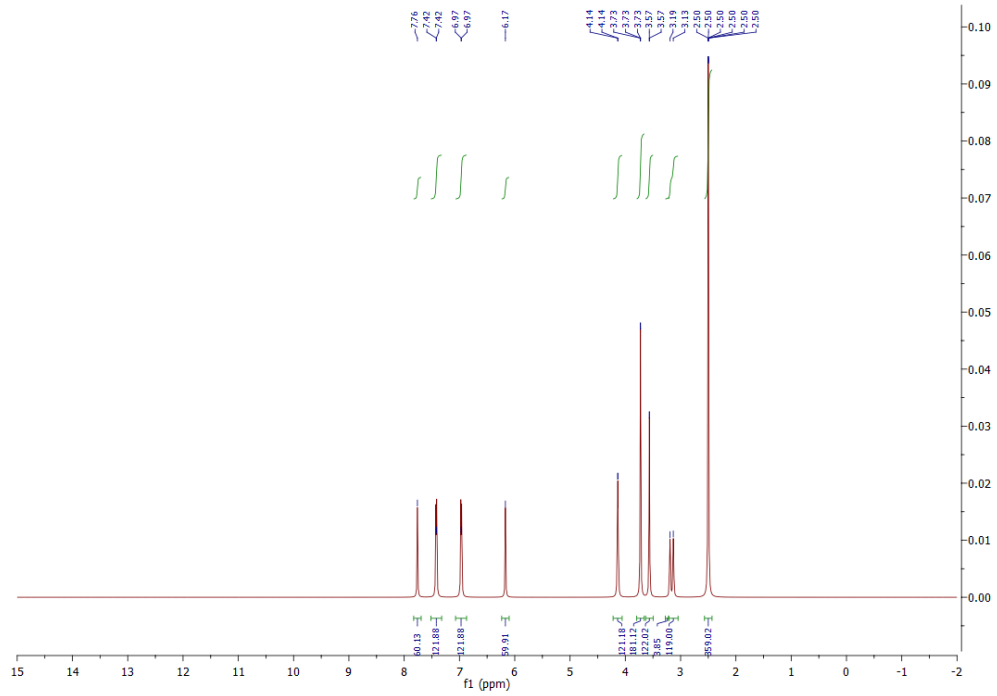
Слика ДМ110. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR1**.



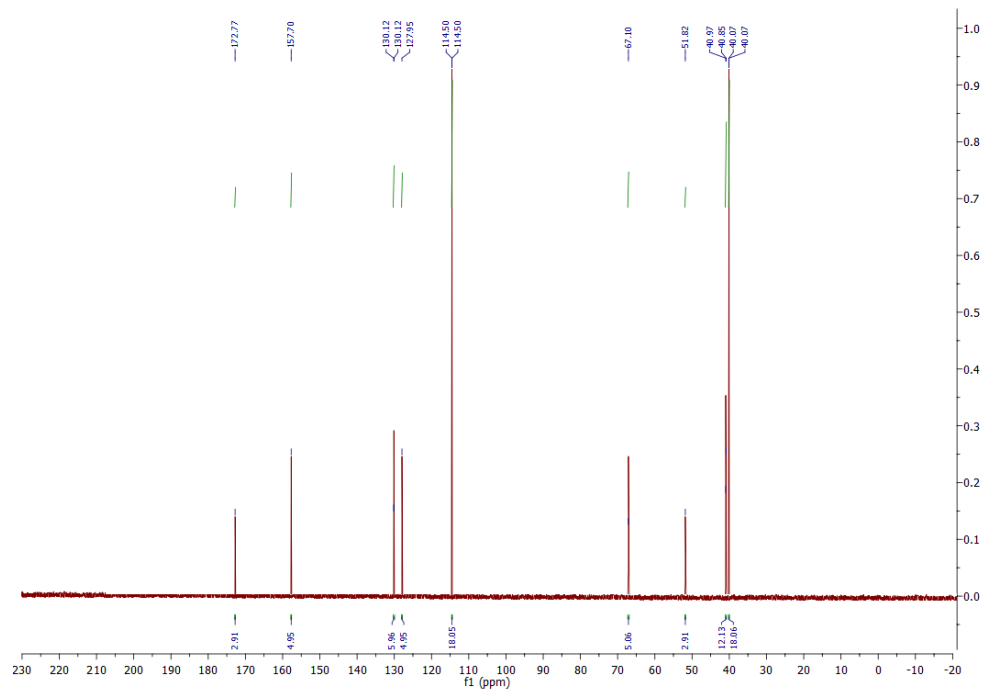
Слика ДМ111. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR1**.



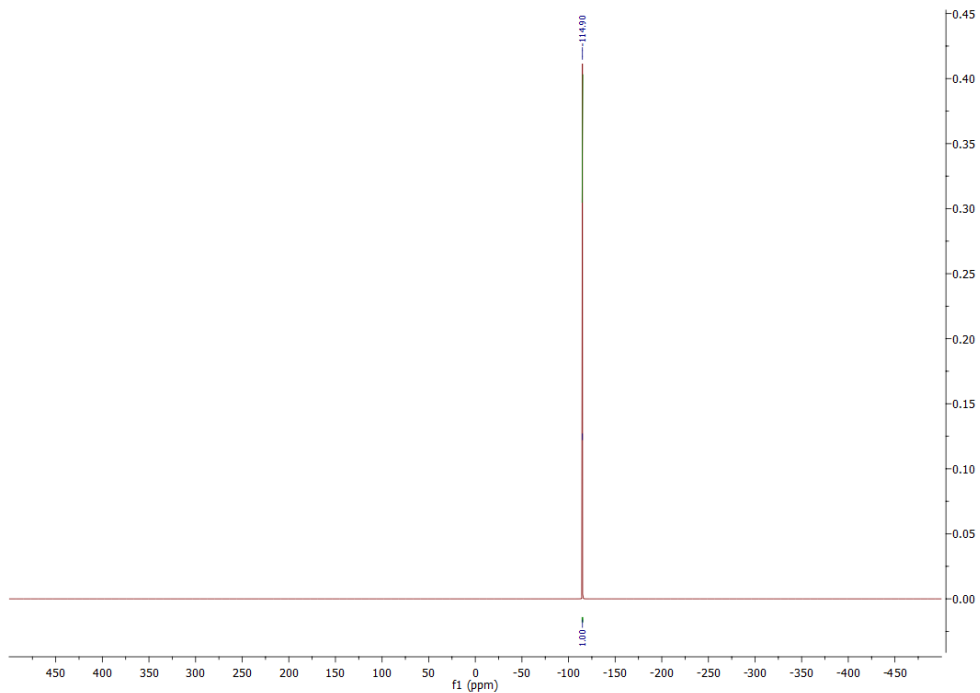
Слика ДМ112. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR1**.



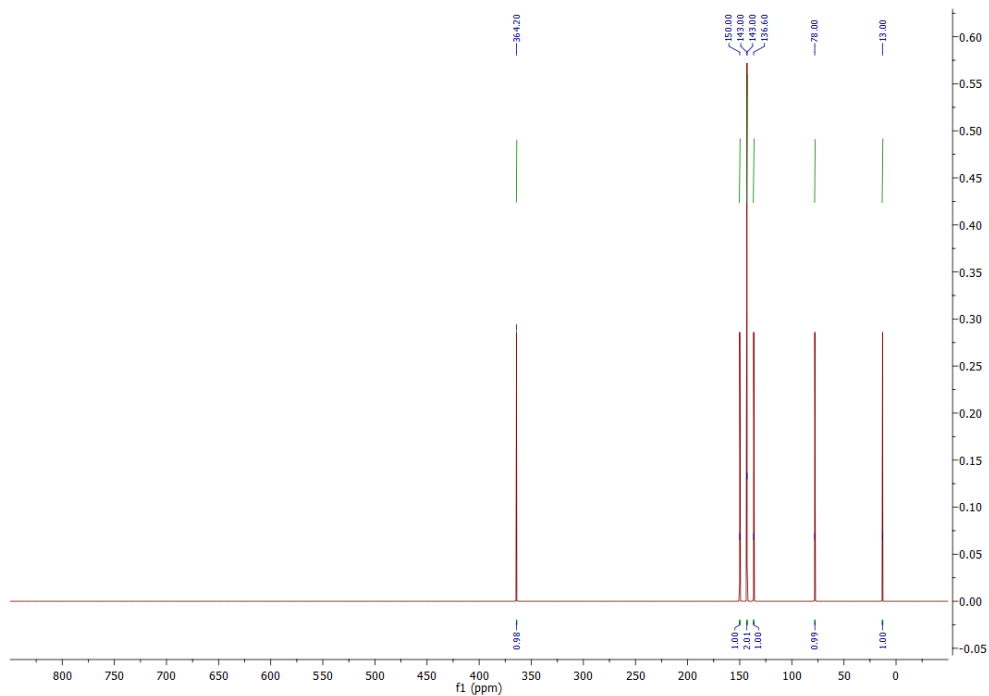
Слика ДМ113. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-Pro-RR2.



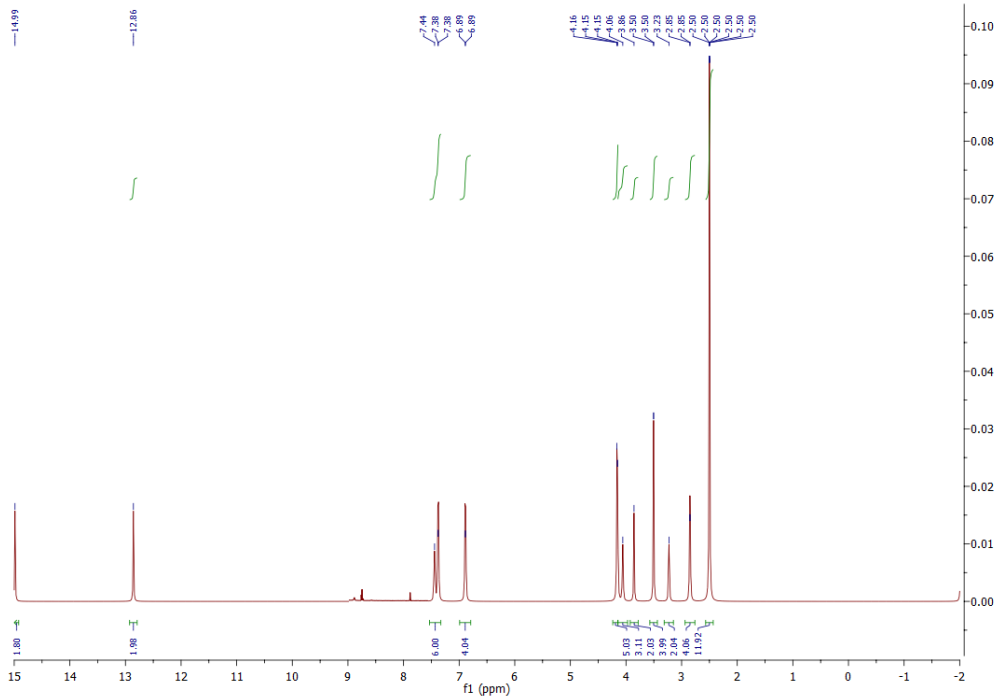
Слика ДМ114. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-Pro-RR2.



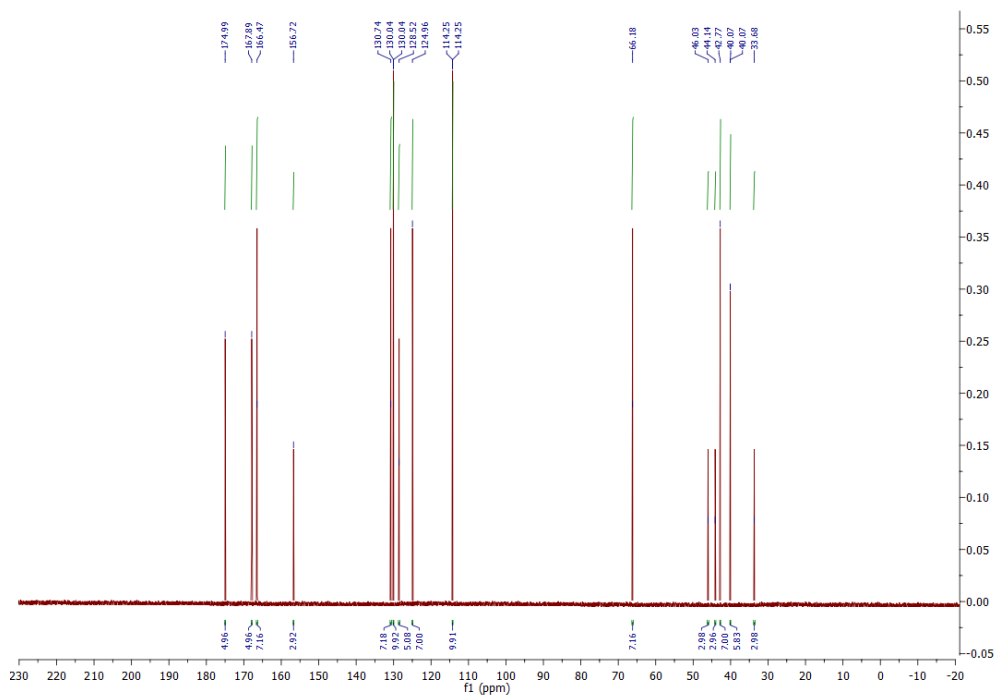
Слика ДМ115. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR2**.



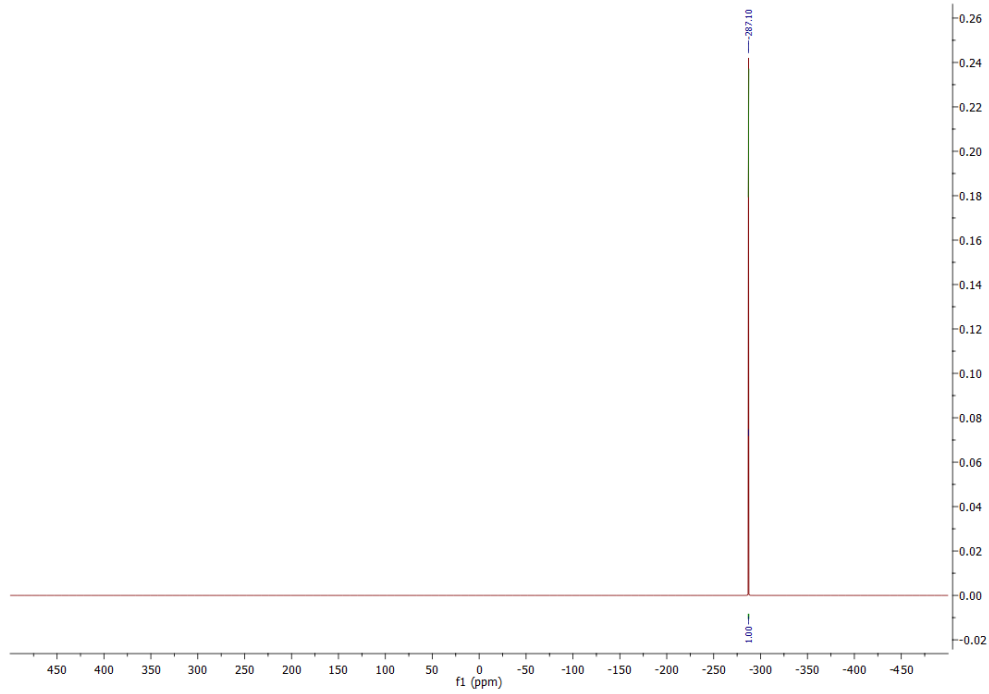
Слика ДМ116. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-RR2**.



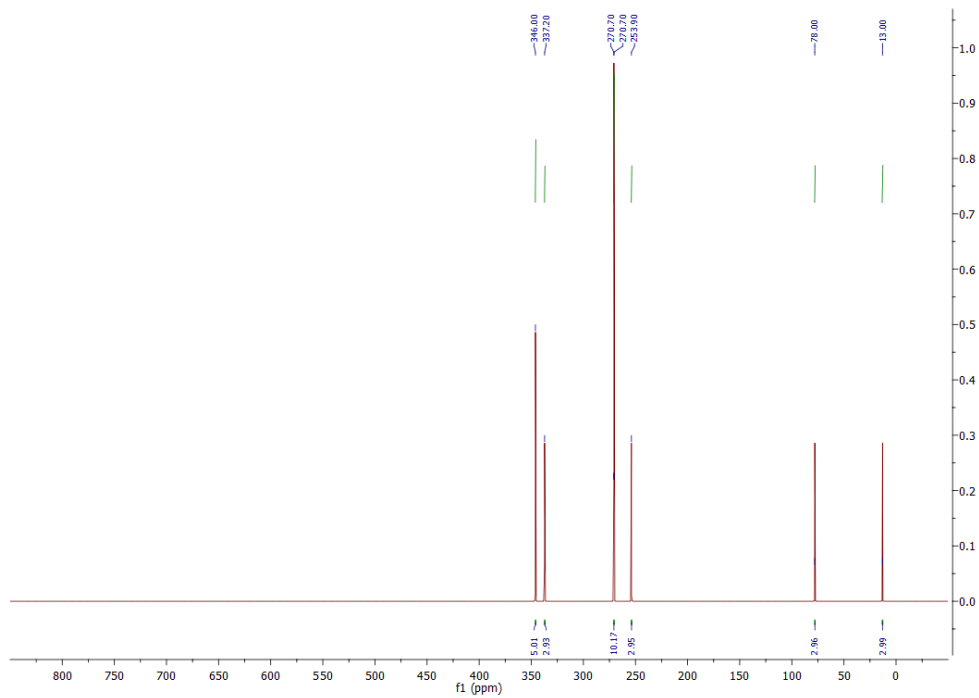
Слика ДМ117. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-RR1.



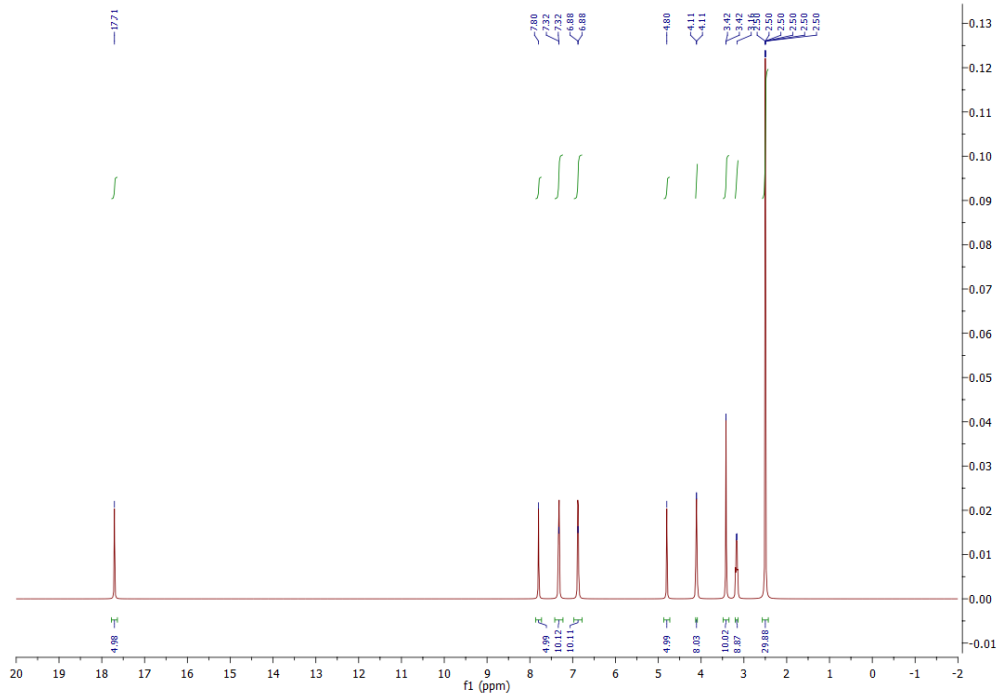
Слика ДМ118. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-RR1.



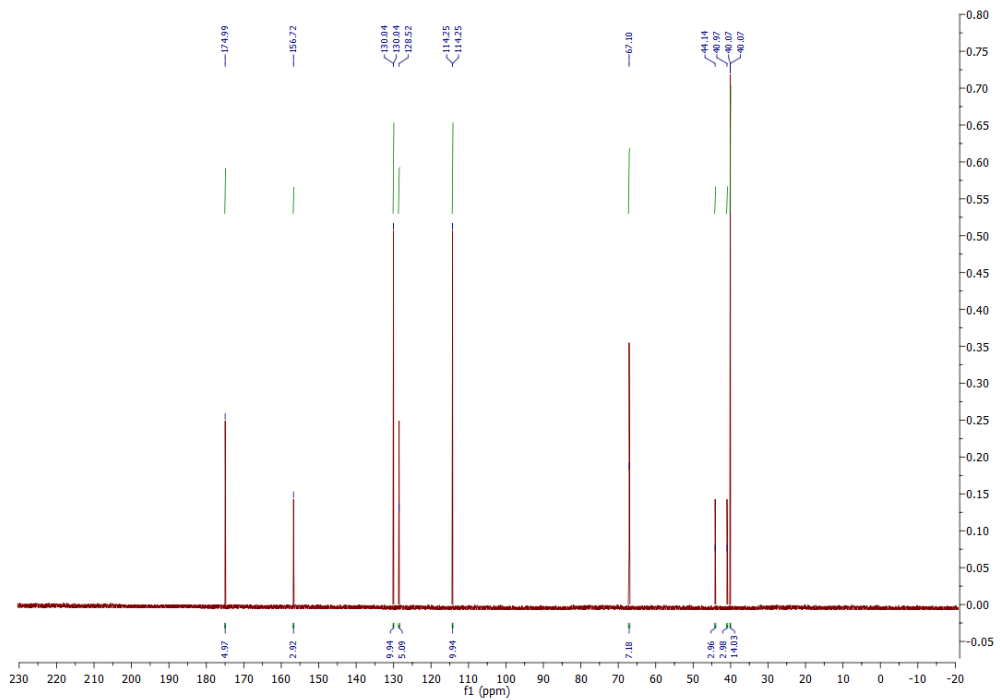
Слика ДМ119. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RR1**.



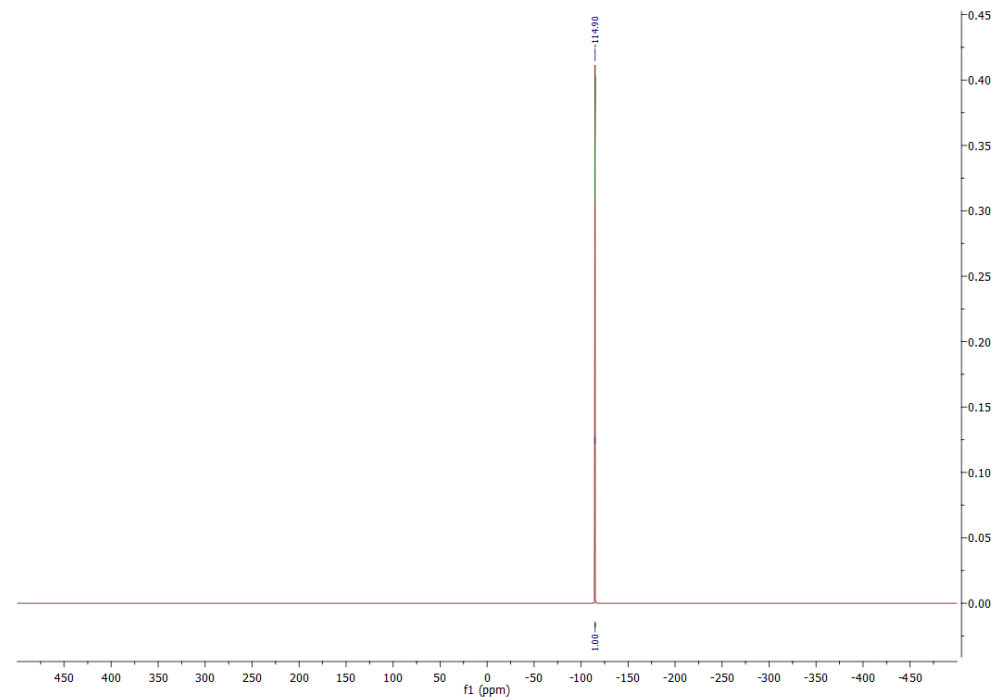
Слика ДМ120. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RR1**.



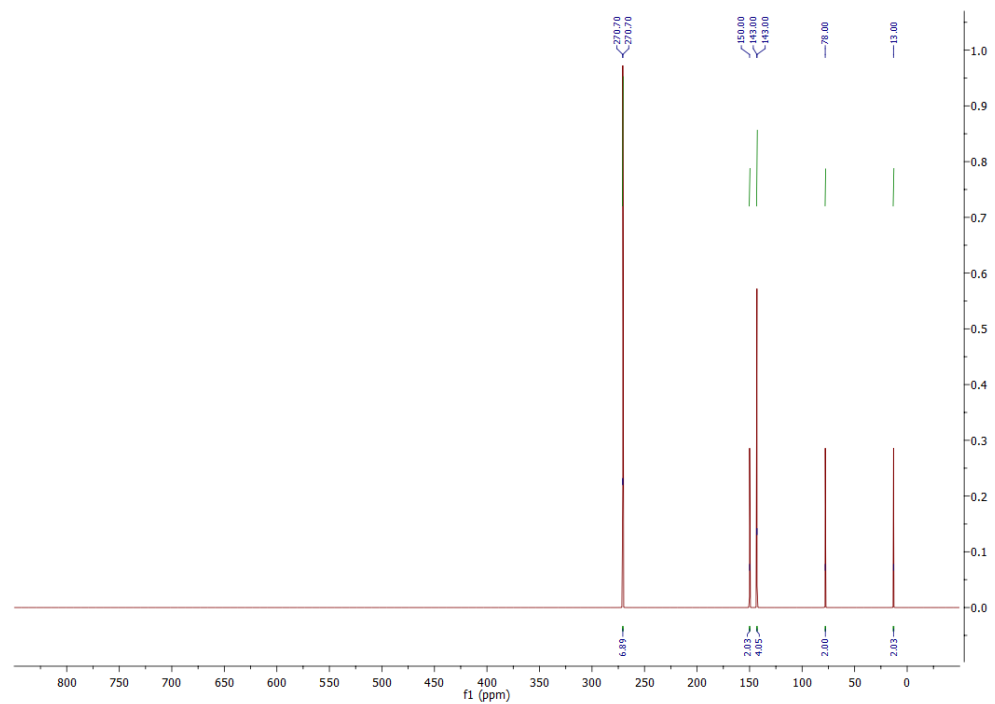
Слика ДМ121. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RR2**.



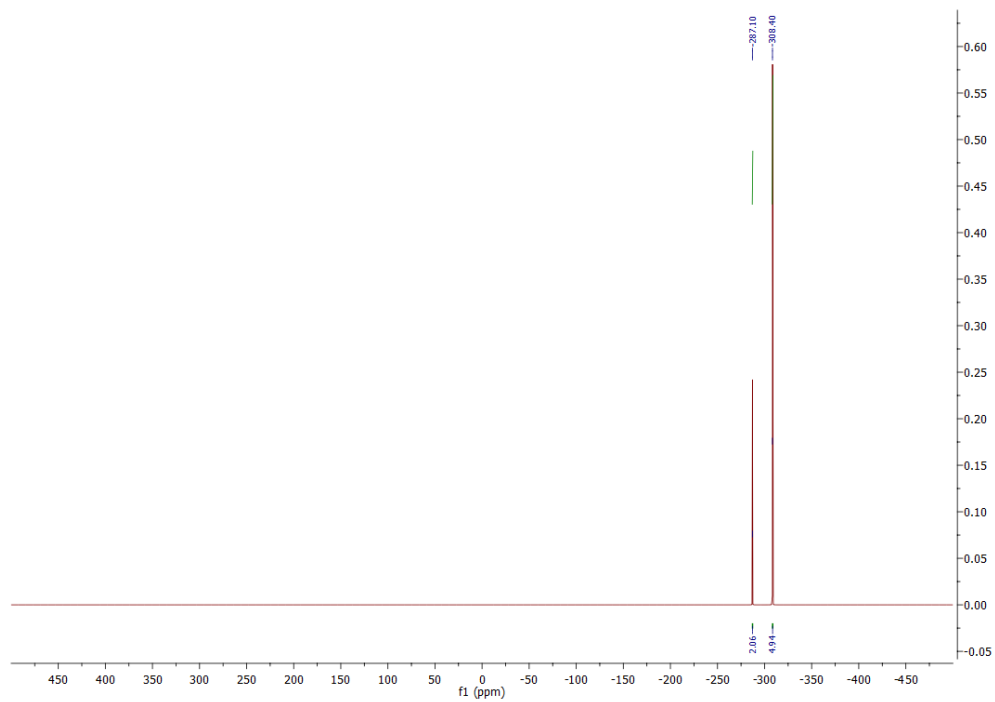
Слика ДМ122. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RR2**.



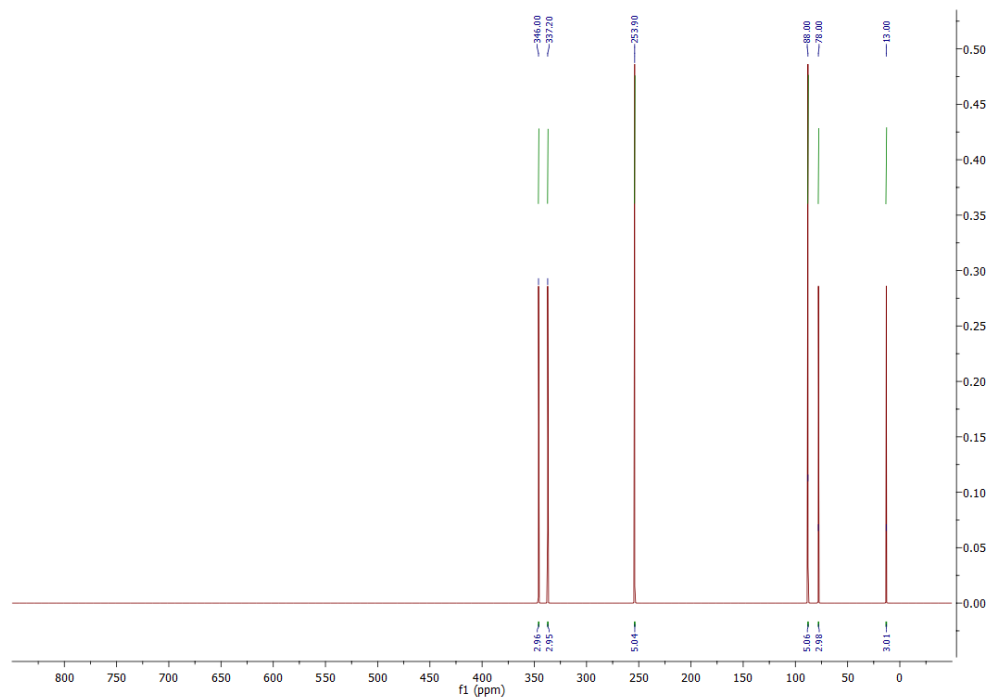
Слика ДМ123. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RR2**.



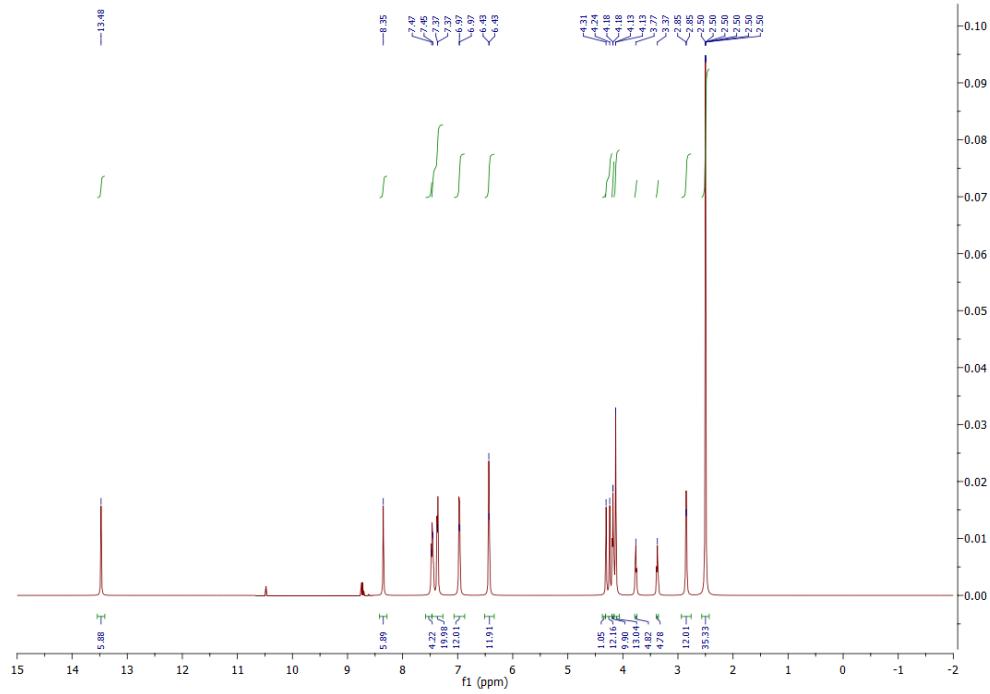
Слика ДМ124. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RR2**.



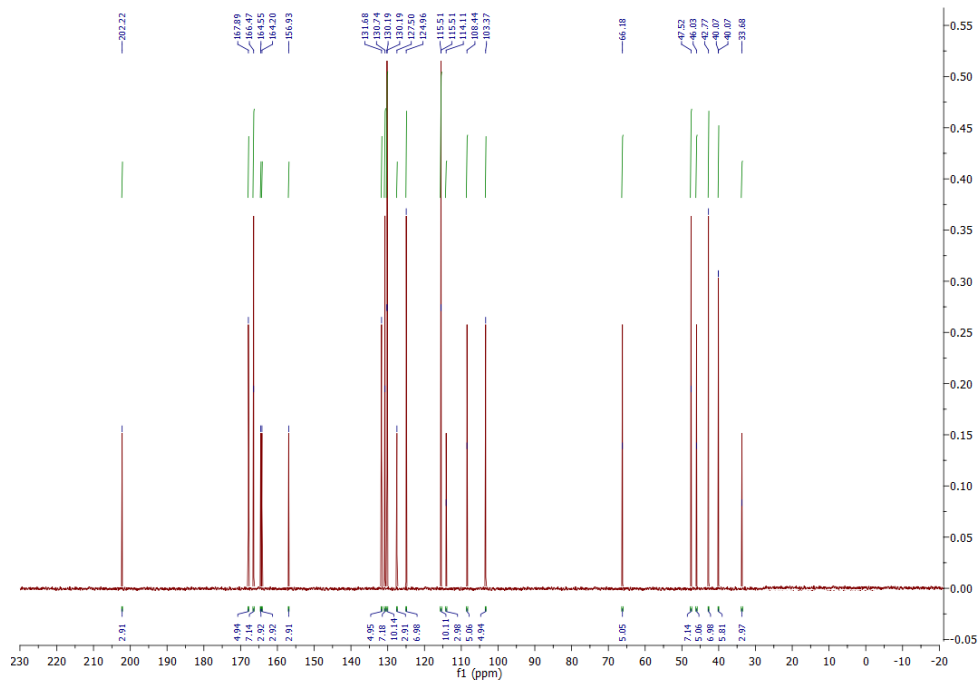
Слика ДМ127. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RB1**.



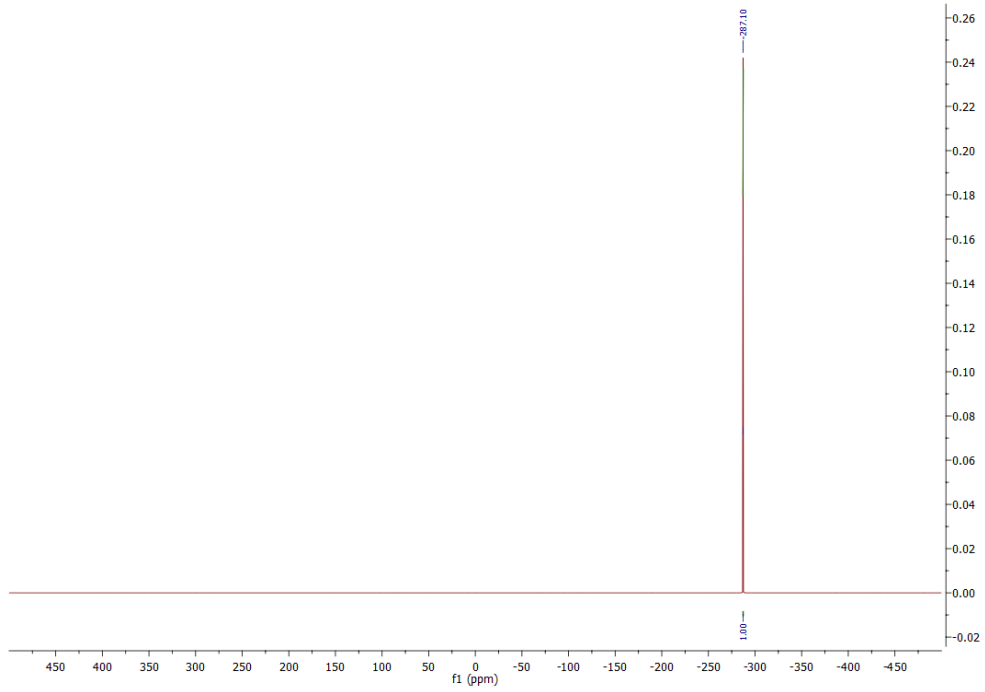
Слика ДМ128. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RB1**.



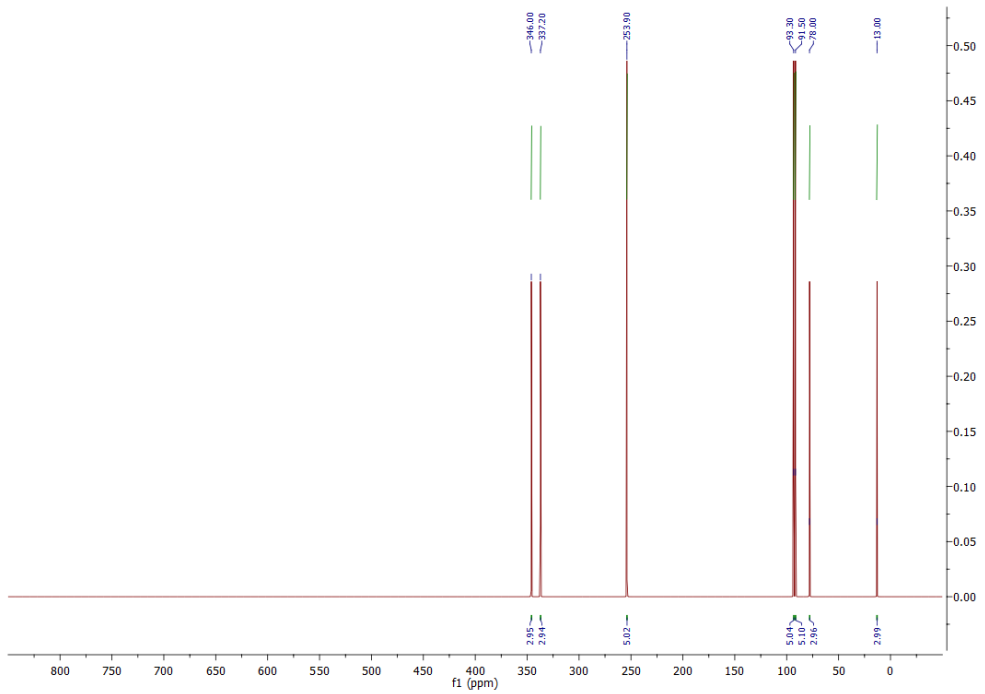
Слика ДМ129. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RB2**.



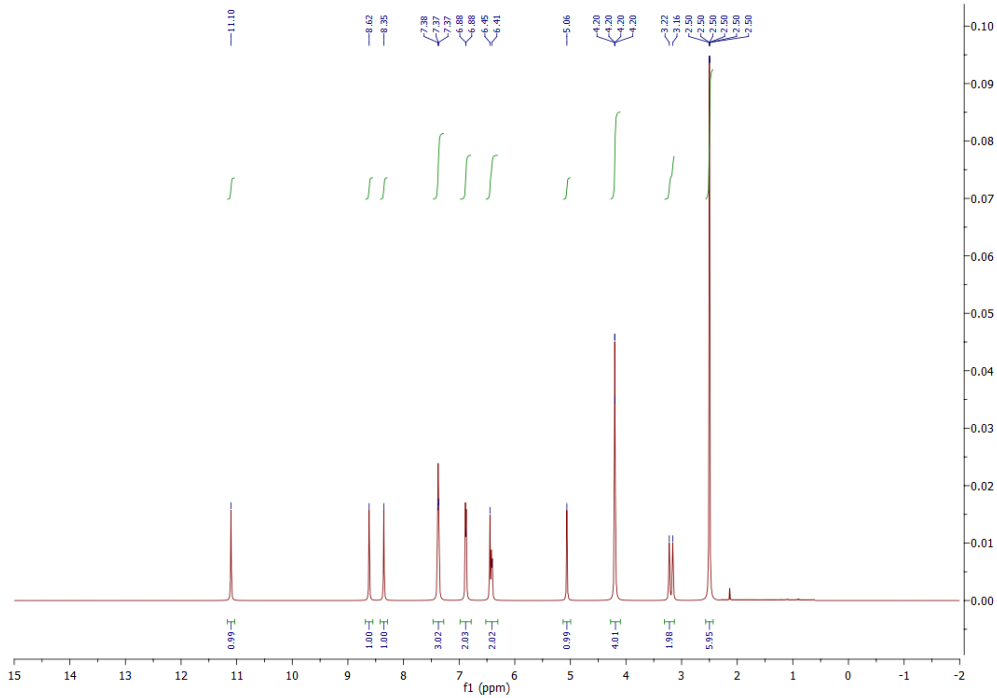
Слика ДМ130. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RB2**.



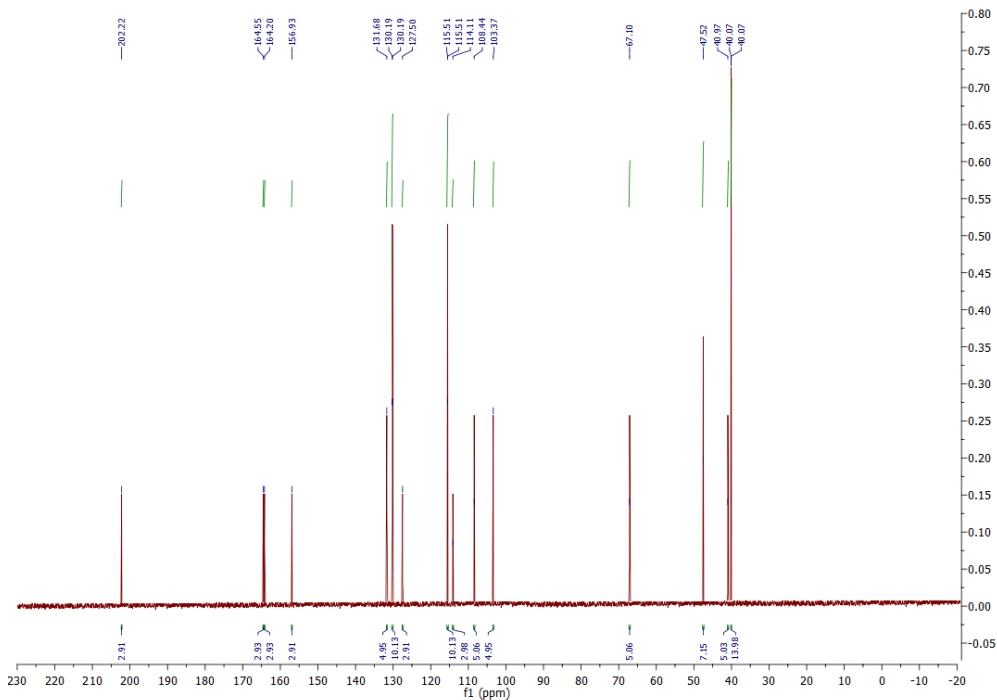
Слика ДМ131. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RB2**.



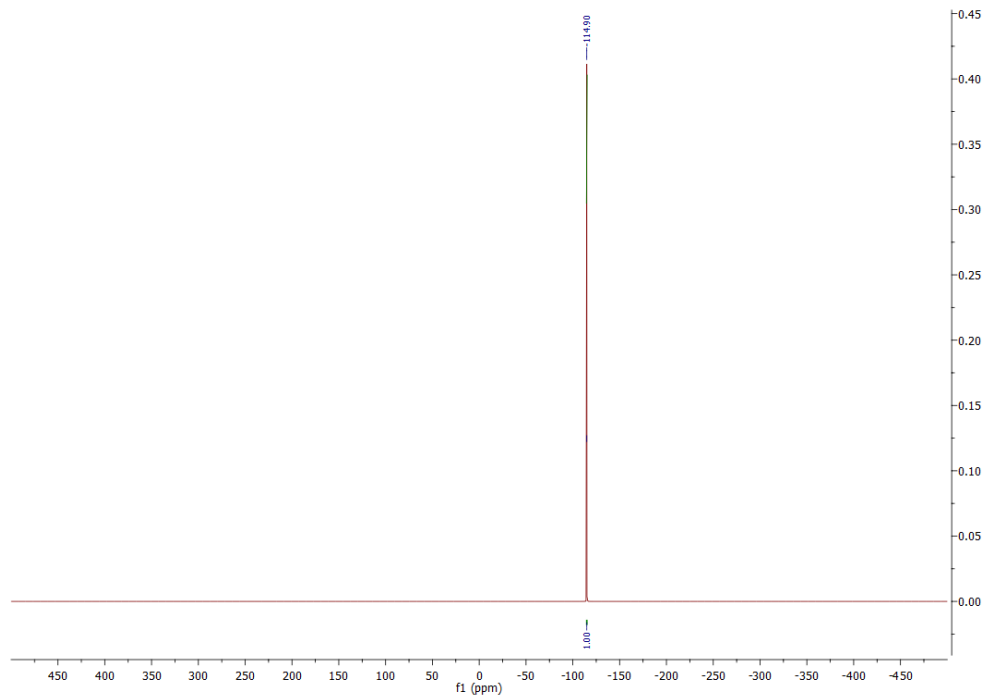
Слика ДМ132. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RB2**.



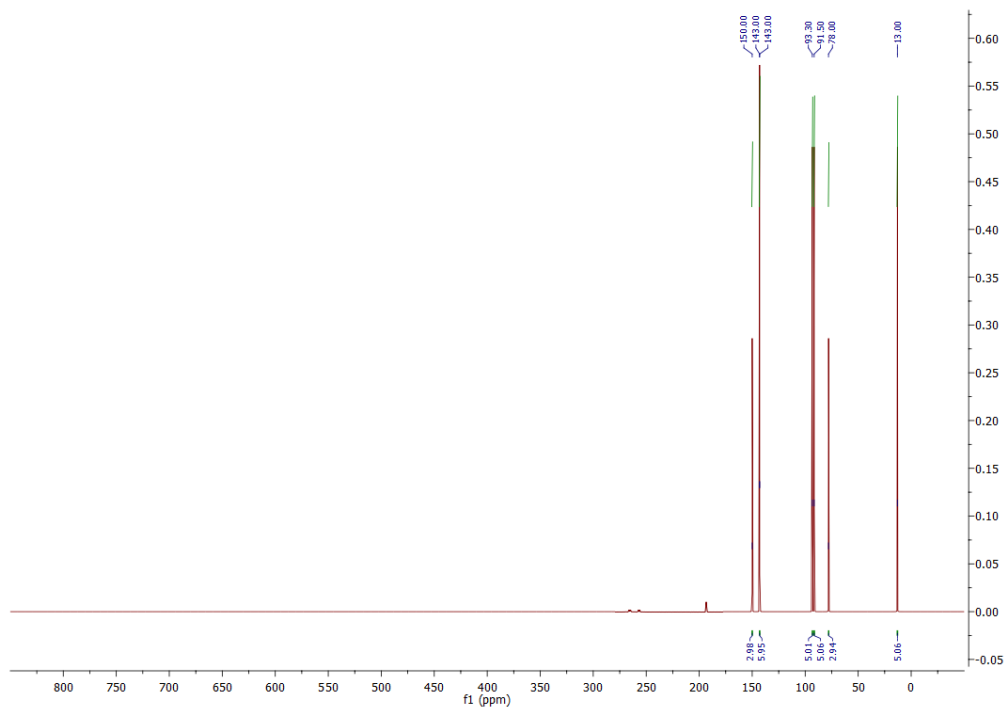
Слика ДМ133. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-RB3.



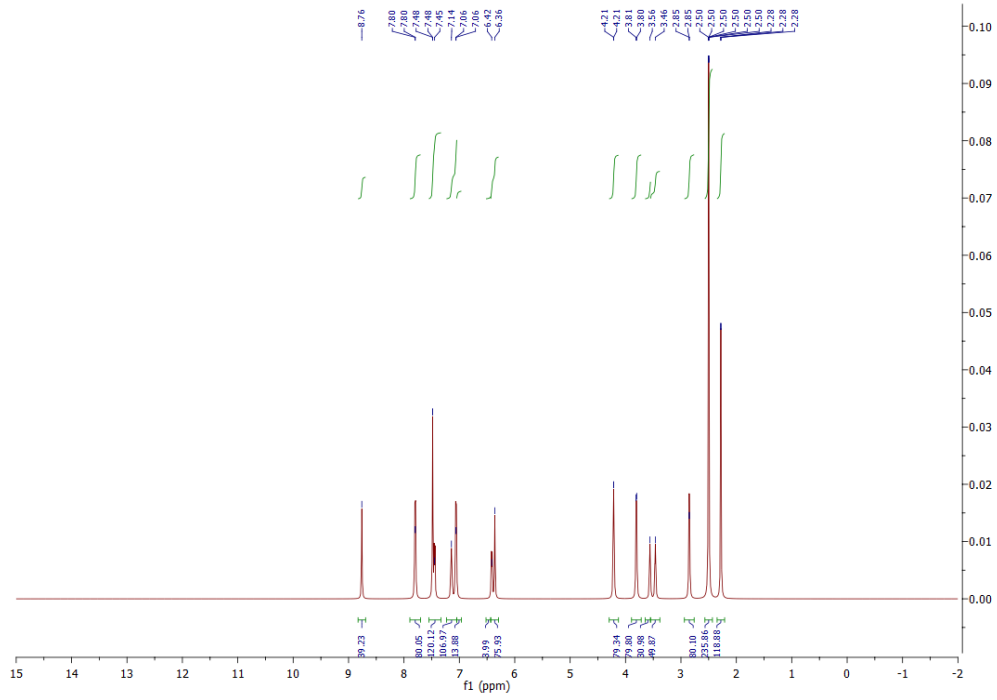
Слика ДМ134. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-RB3.



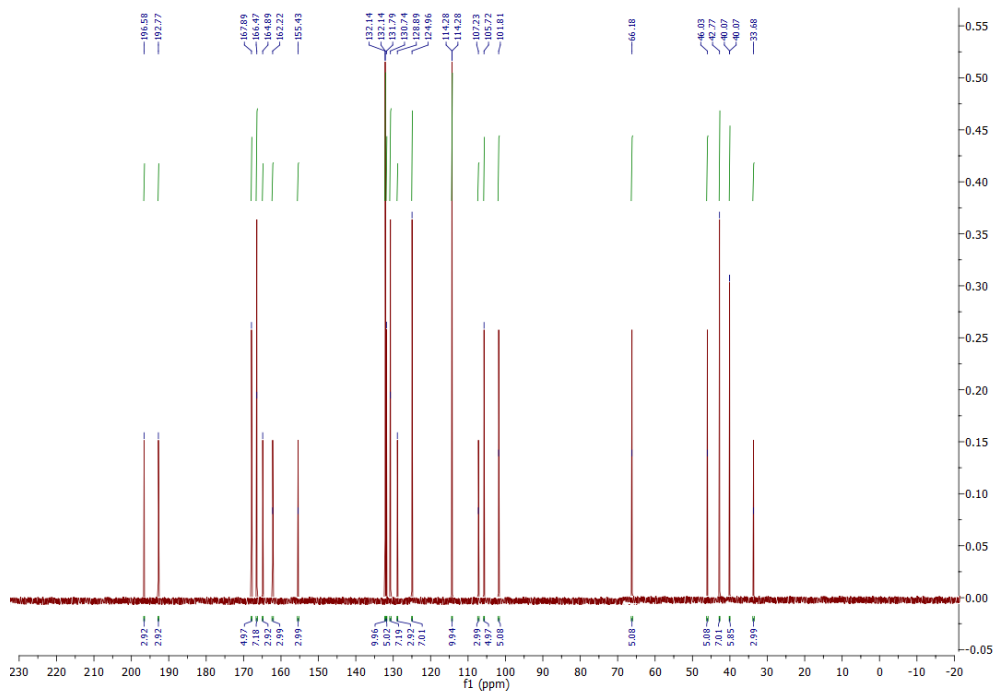
Слика ДМ135. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RB3**.



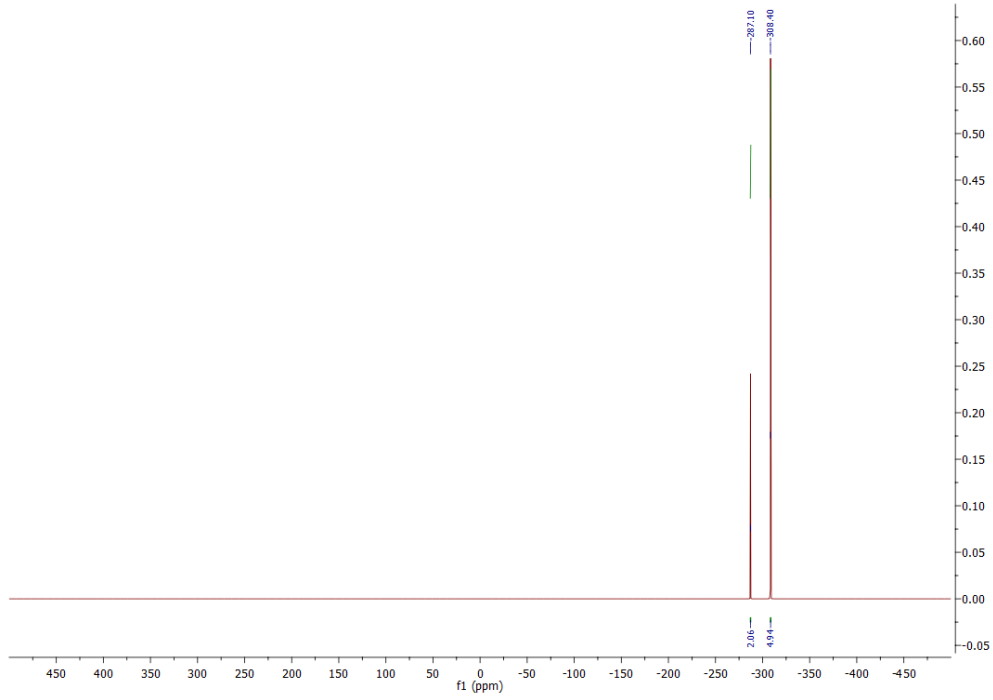
Слика ДМ136. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RB3**.



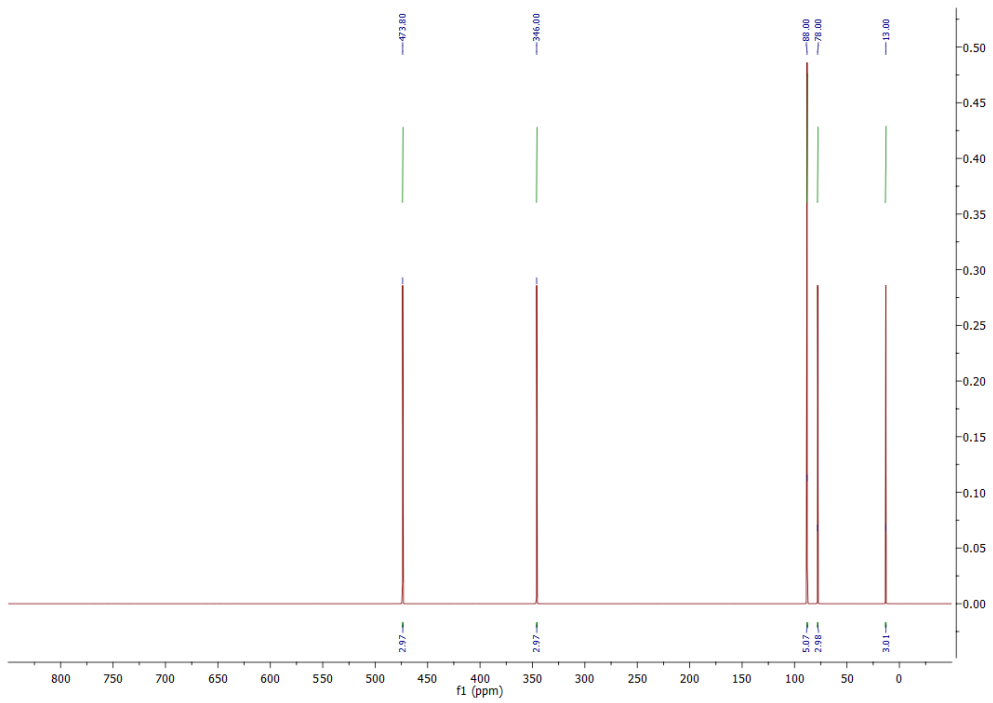
Слика ДМ137. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-R1b**.



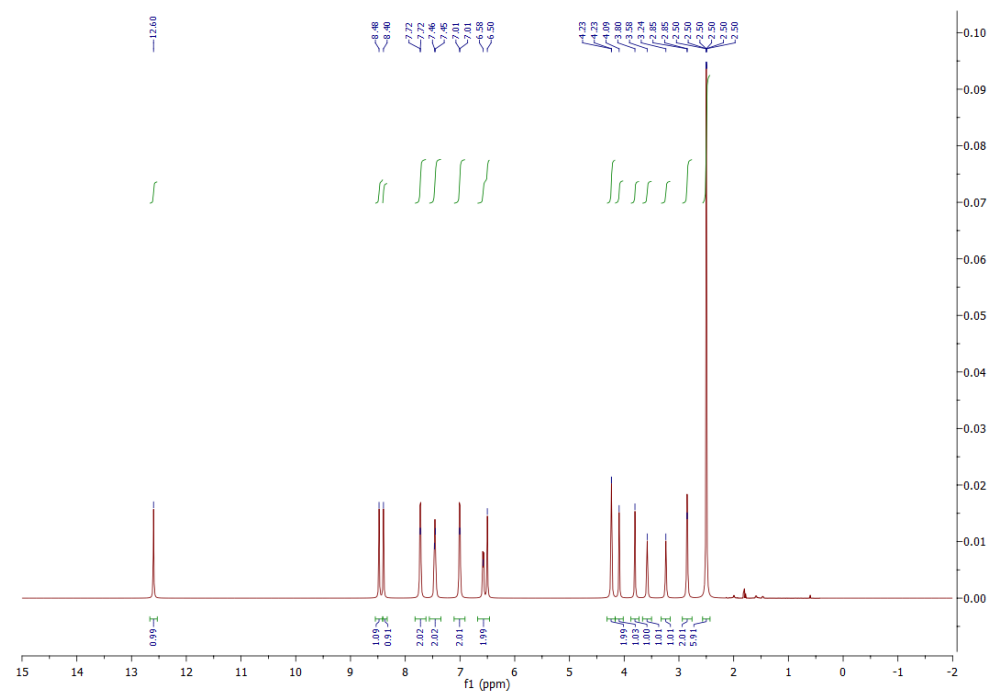
Слика ДМ138. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-R1b**.



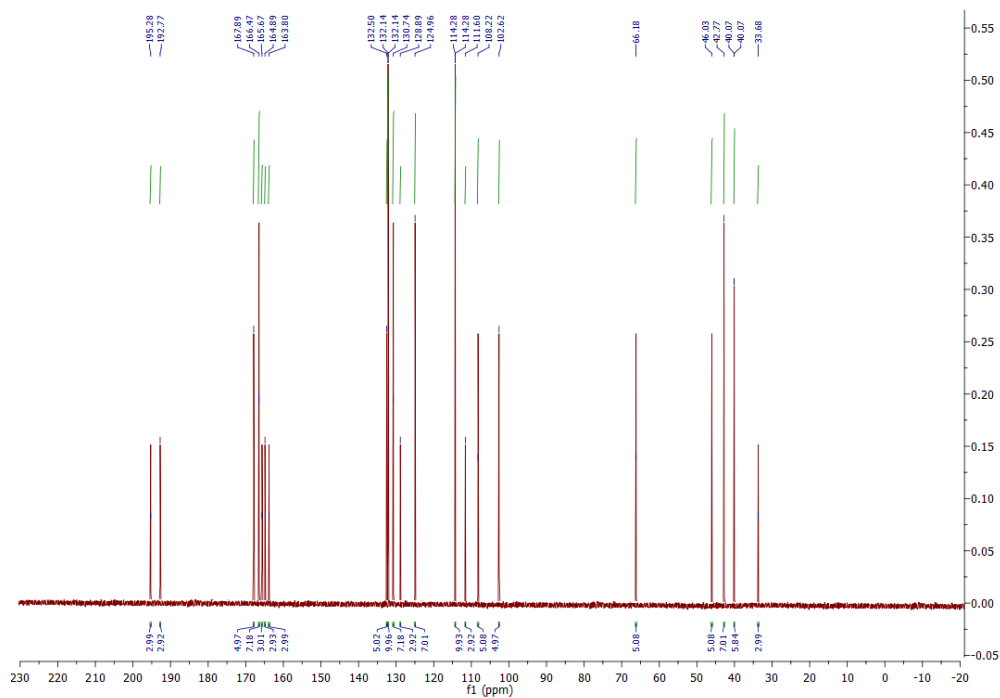
Слика ДМ139. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R1b**.



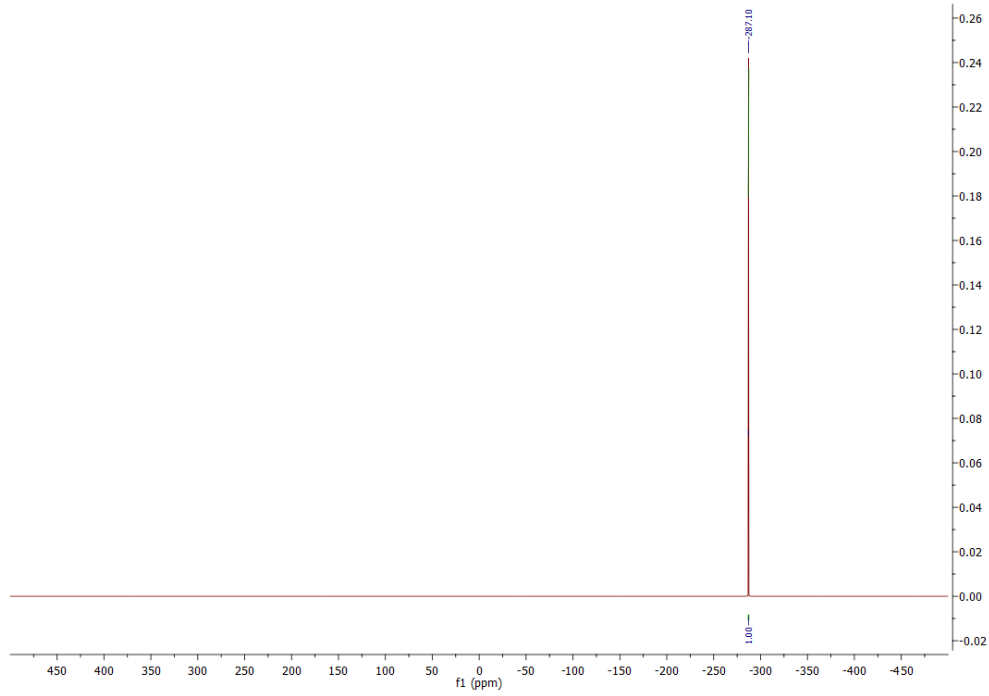
Слика ДМ140. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-R1b**.



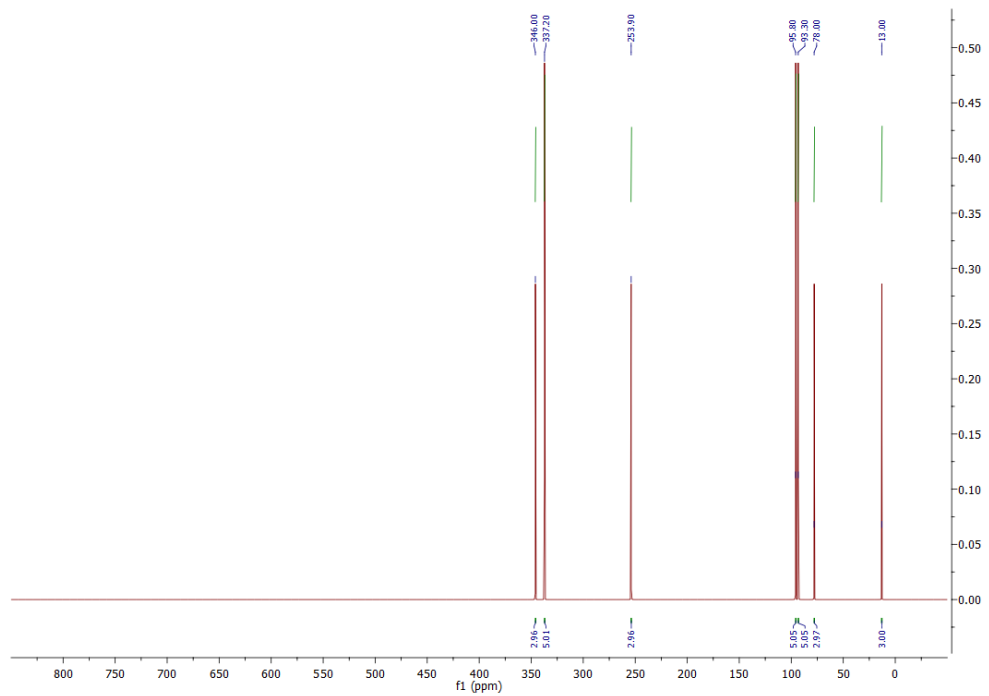
Слика ДМ141. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-R2b.



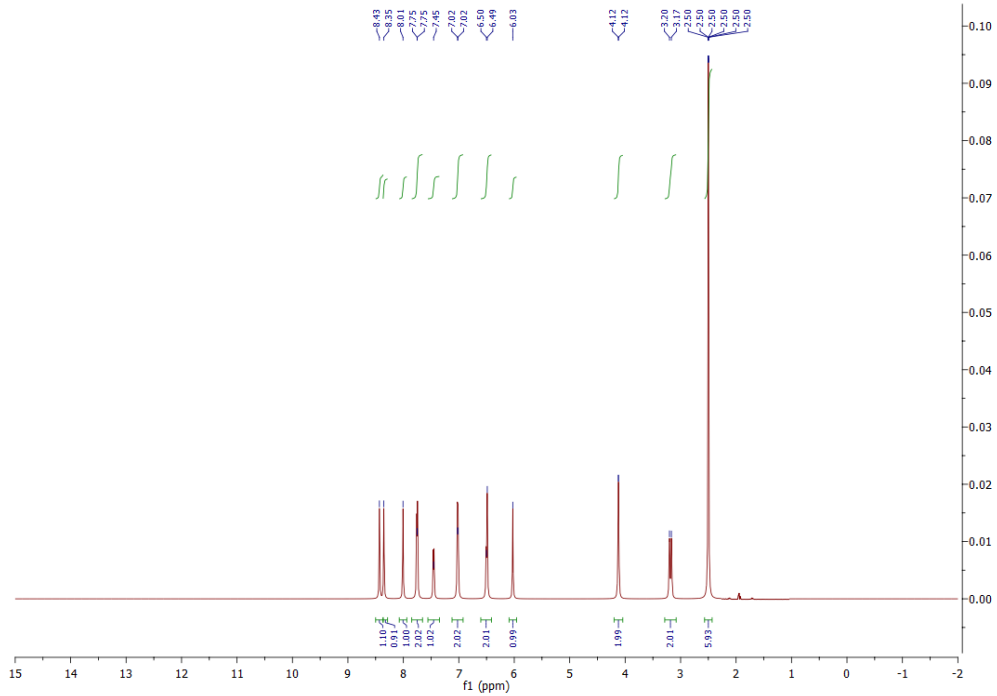
Слика ДМ142. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-R2b.



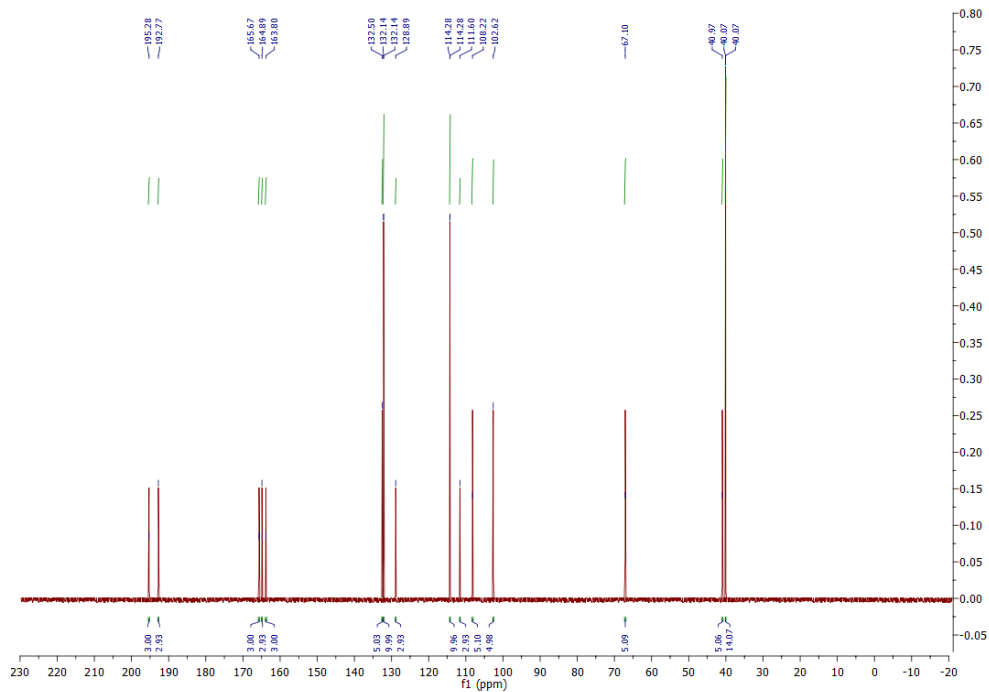
Слика ДМ143. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R2b**.



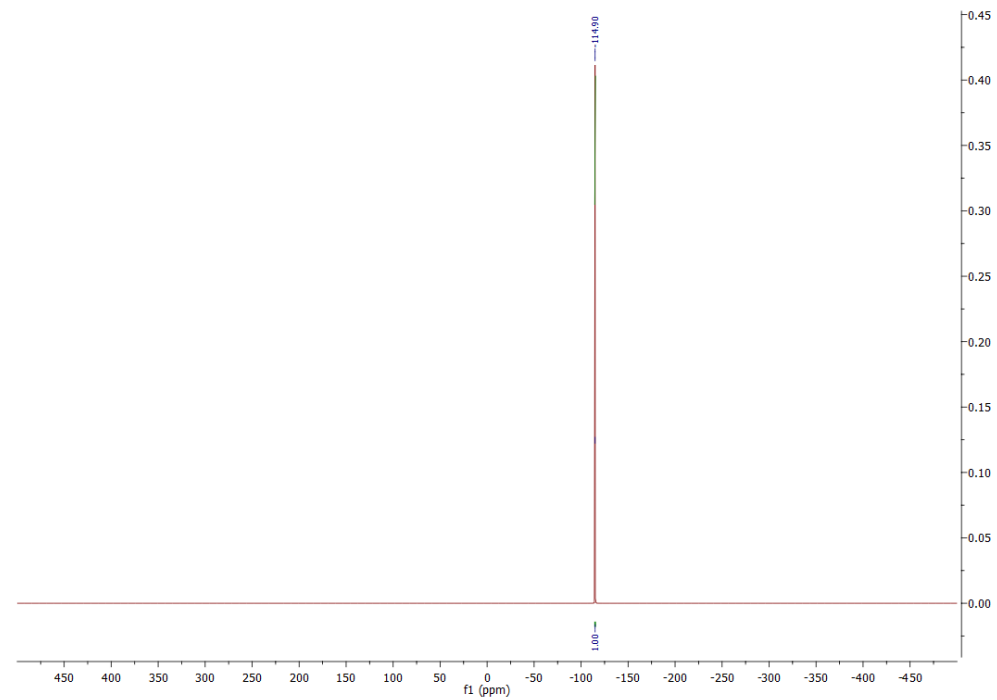
Слика ДМ144. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R2b**.



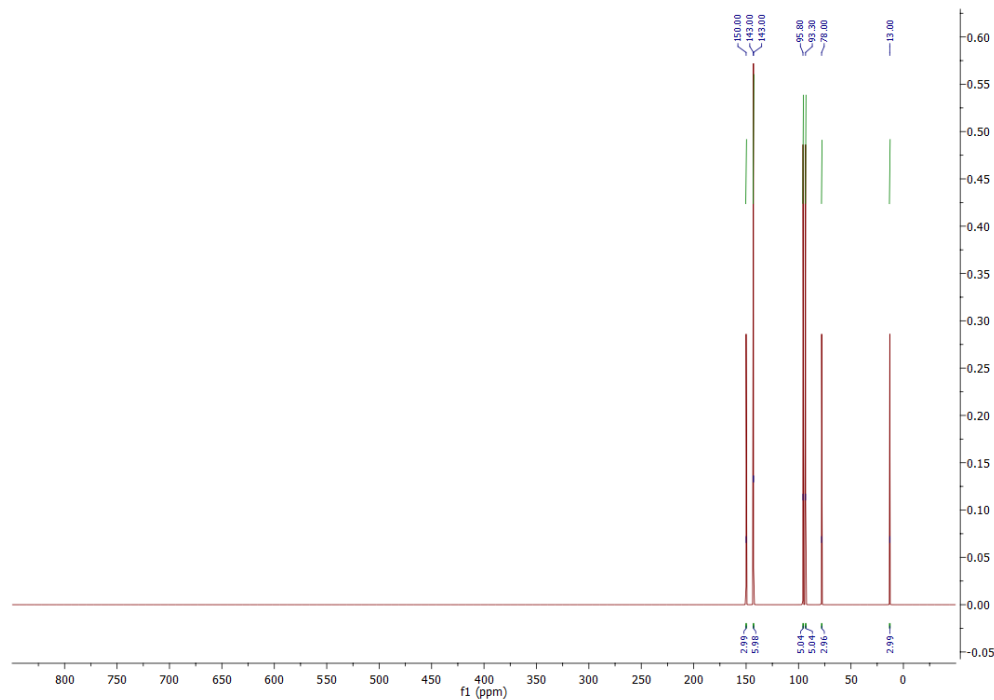
Слика ДМ145. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-R3b.



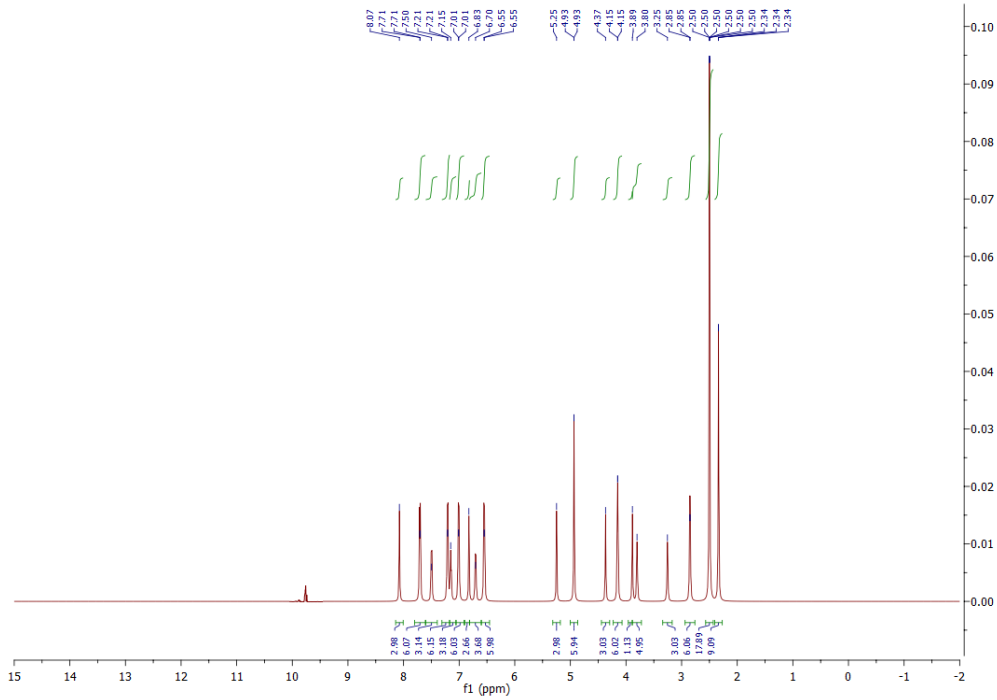
Слика ДМ146. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-R3b.



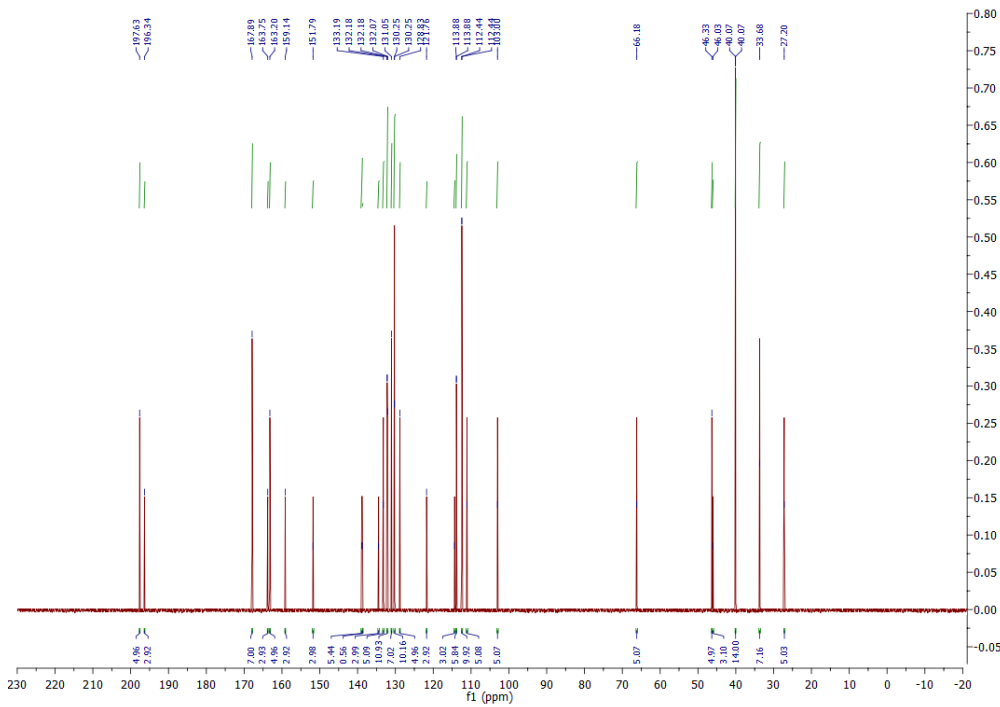
Слика ДМ147. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R3b**.



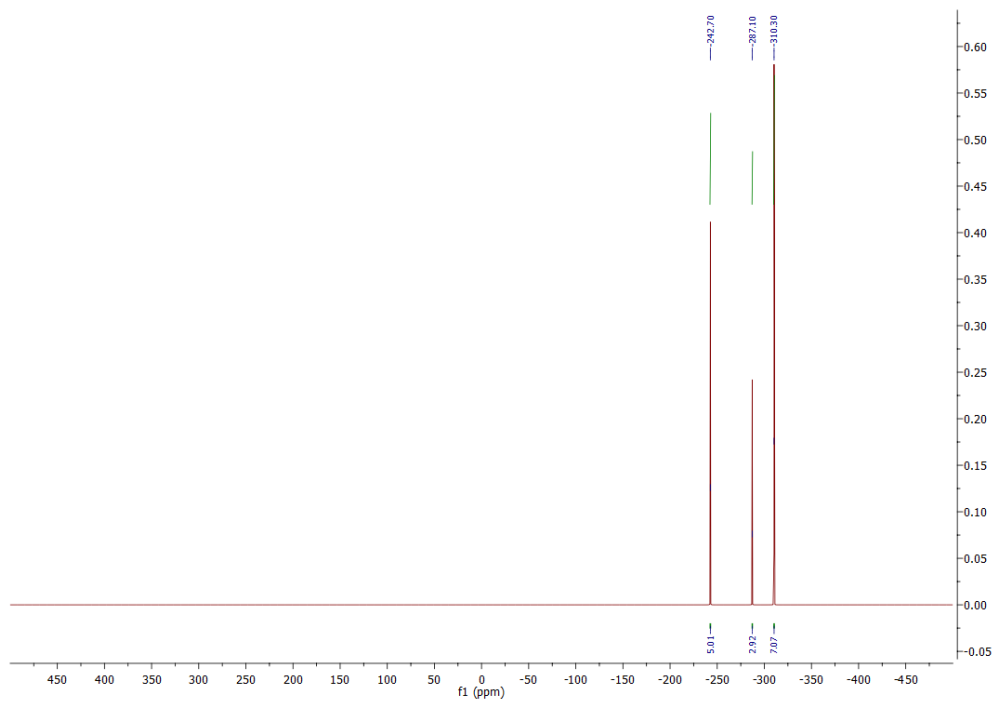
Слика ДМ148. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-R3b**



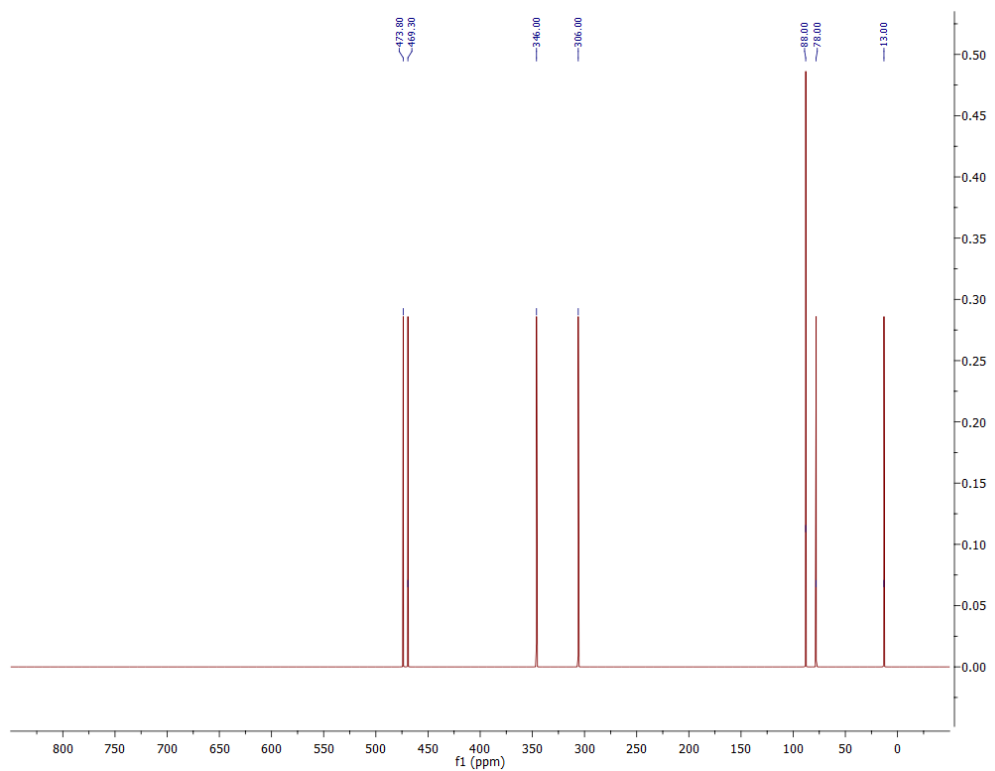
Слика ДМ149. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-1b**



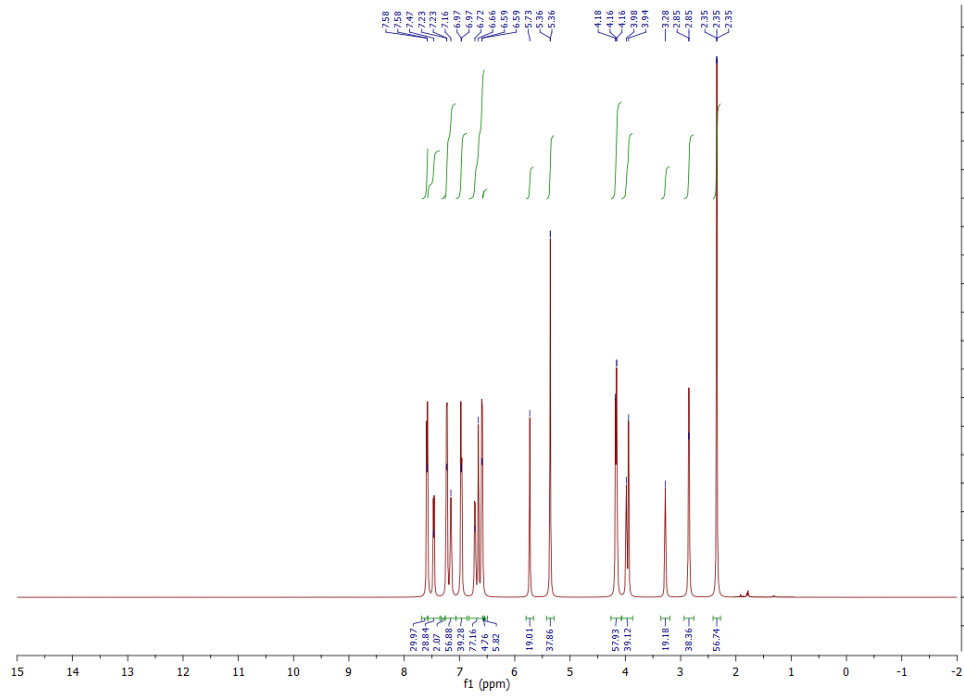
Слика ДМ150. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-1b**



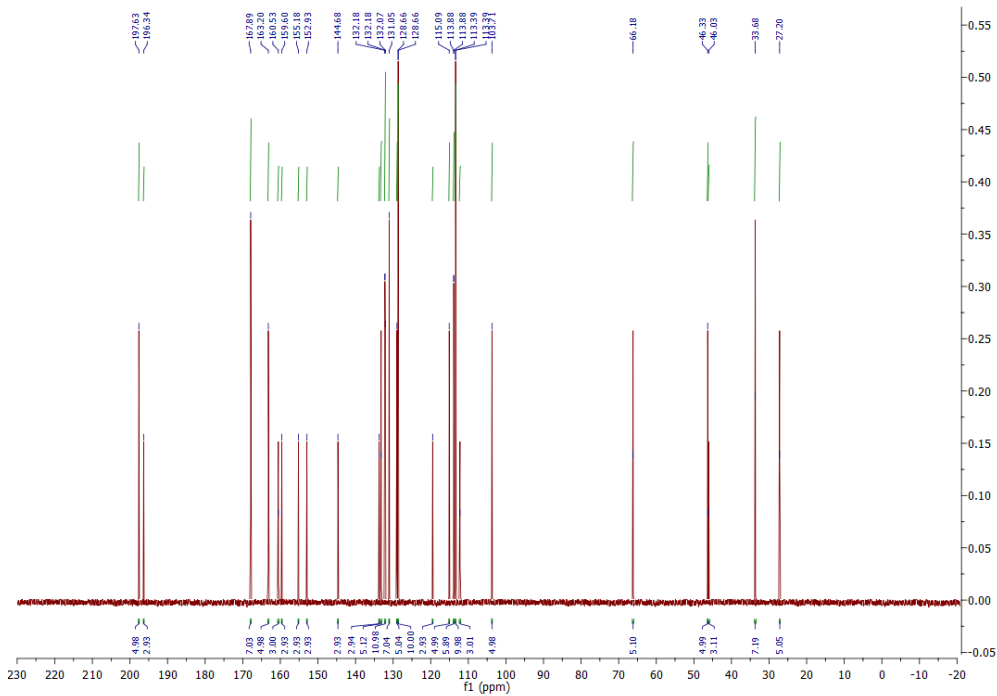
Слика ДМ151. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1b**



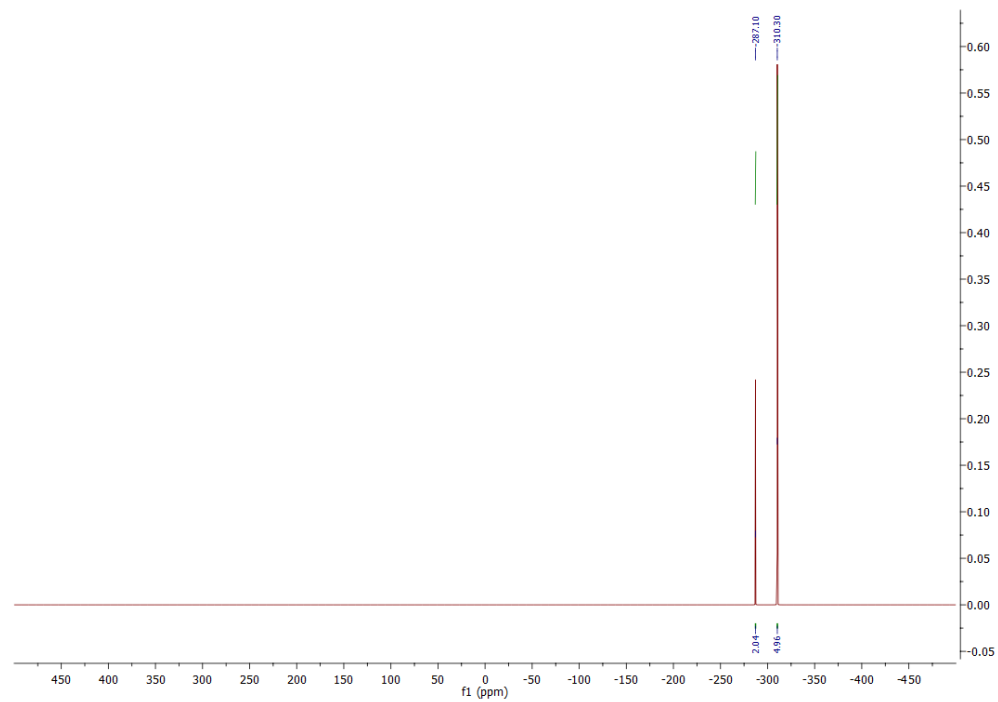
Слика ДМ152. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1b**



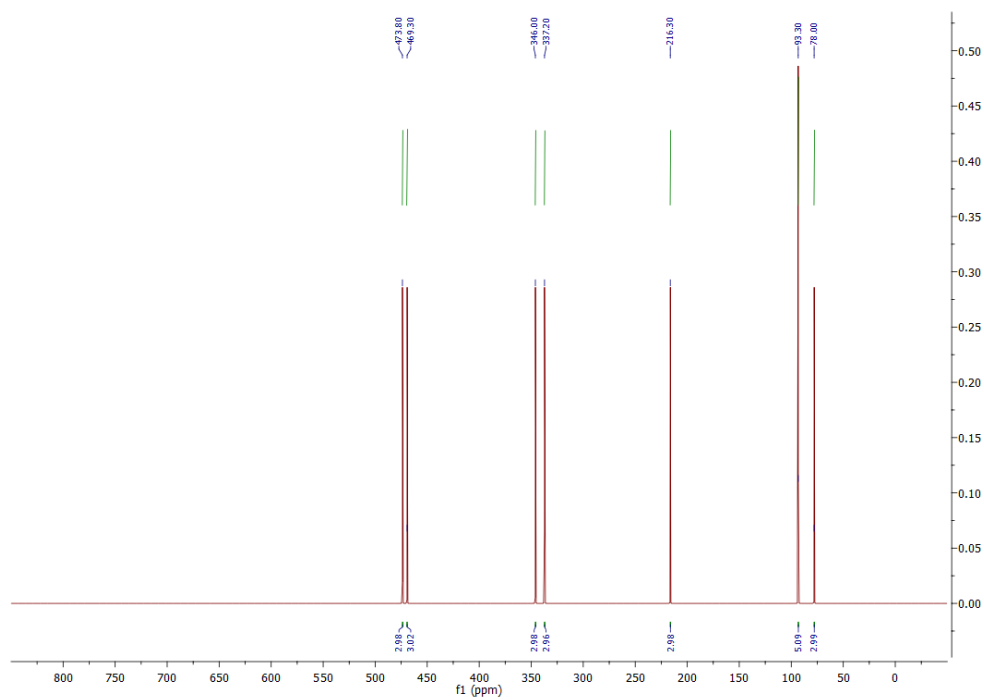
Слика ДМ153. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-2b**



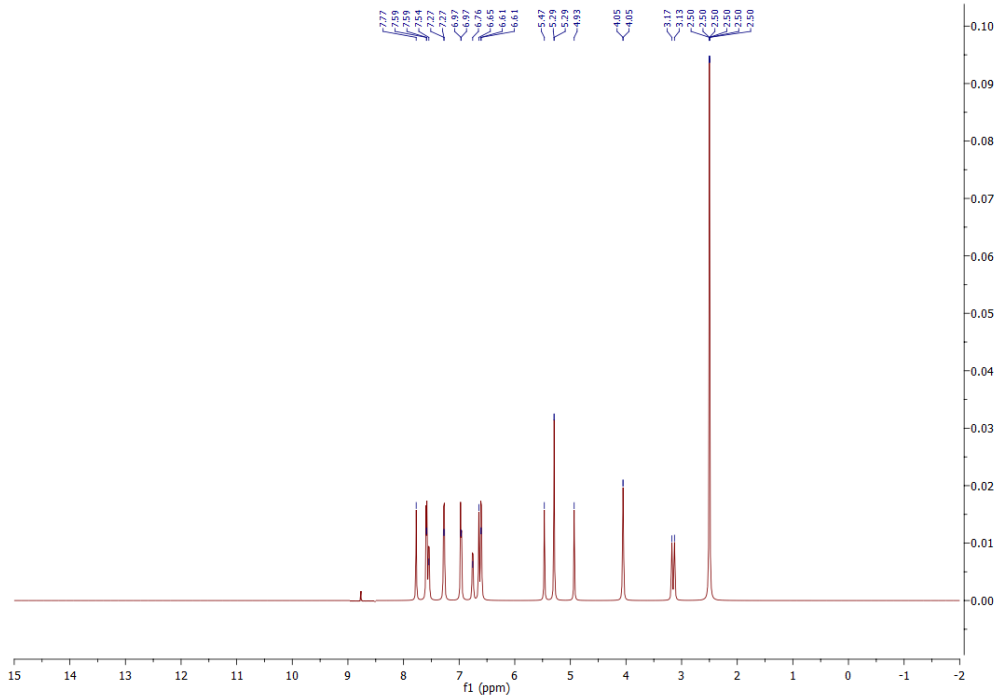
Слика ДМ154. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-2b**



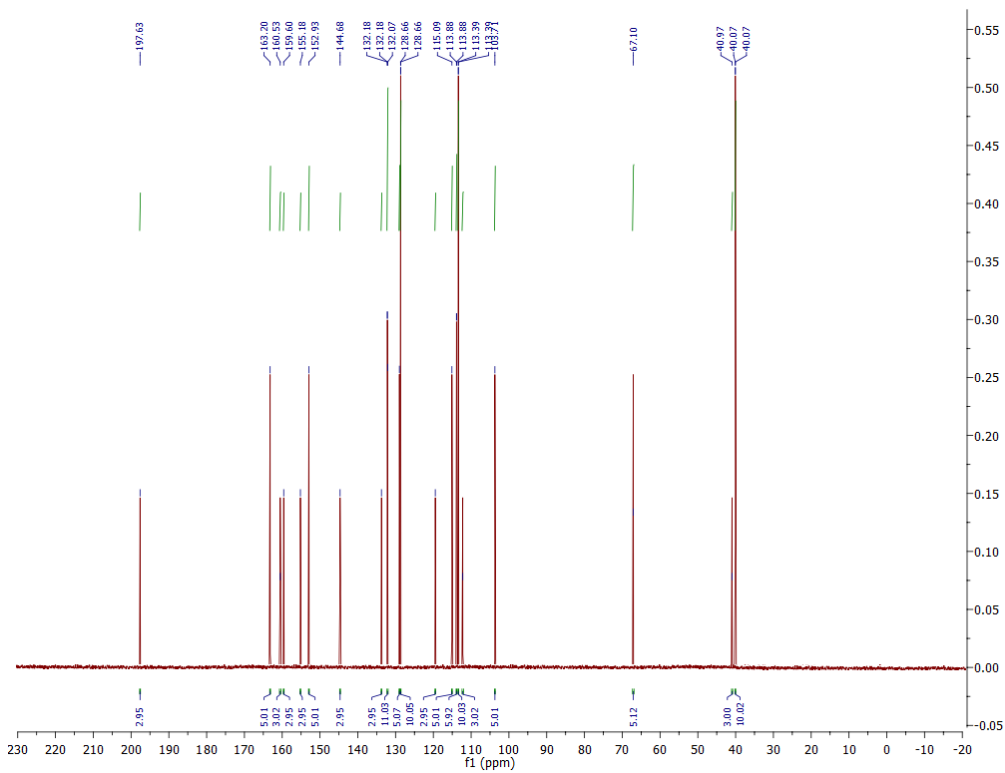
Слика ДМ155. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-2b**



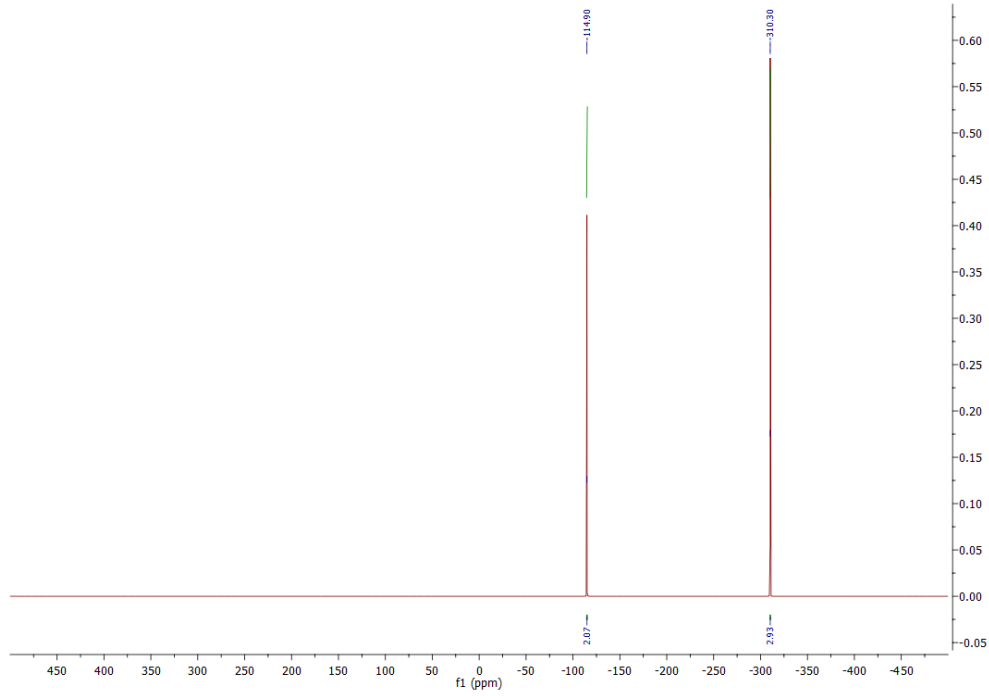
Слика ДМ156. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-2b**



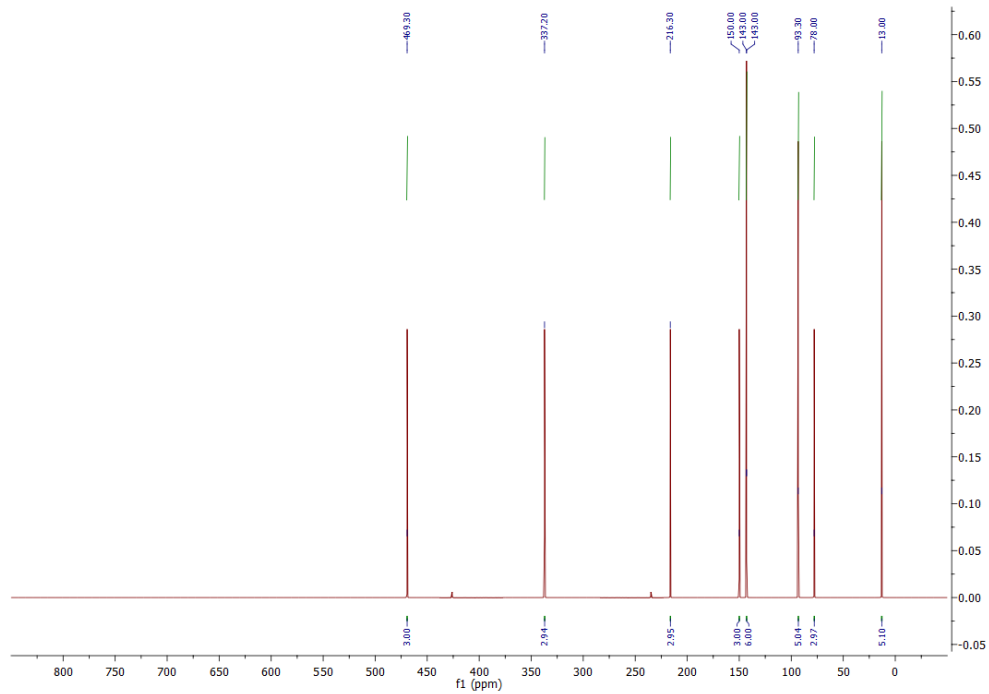
Слика ДМ157. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-3b



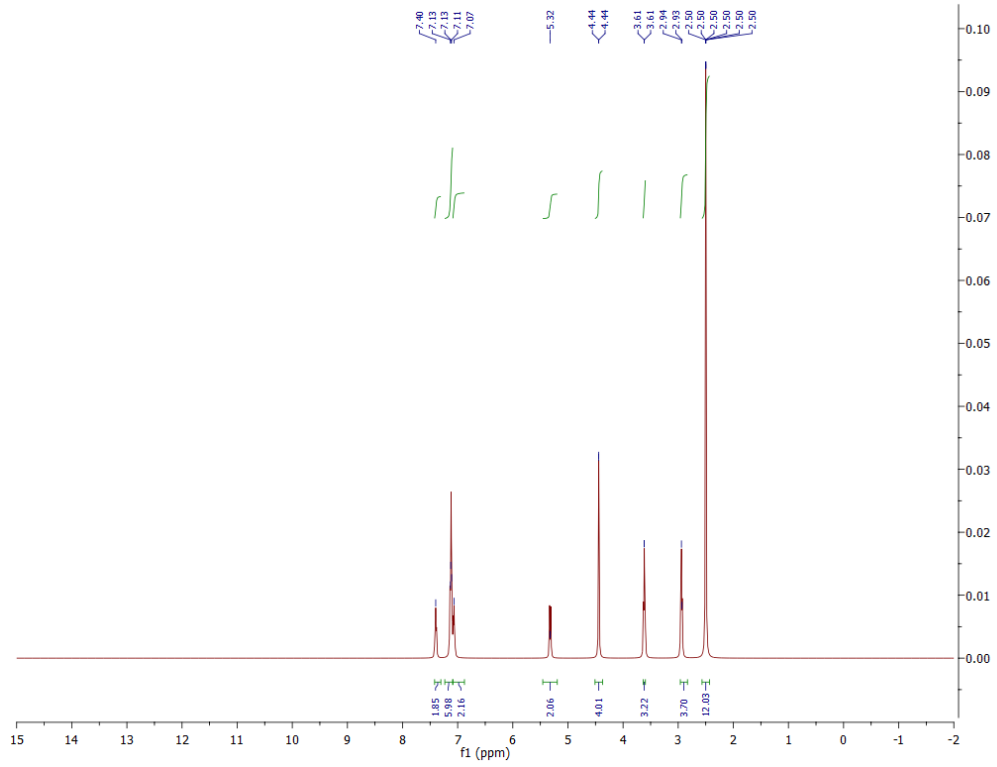
Слика ДМ158. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-3b



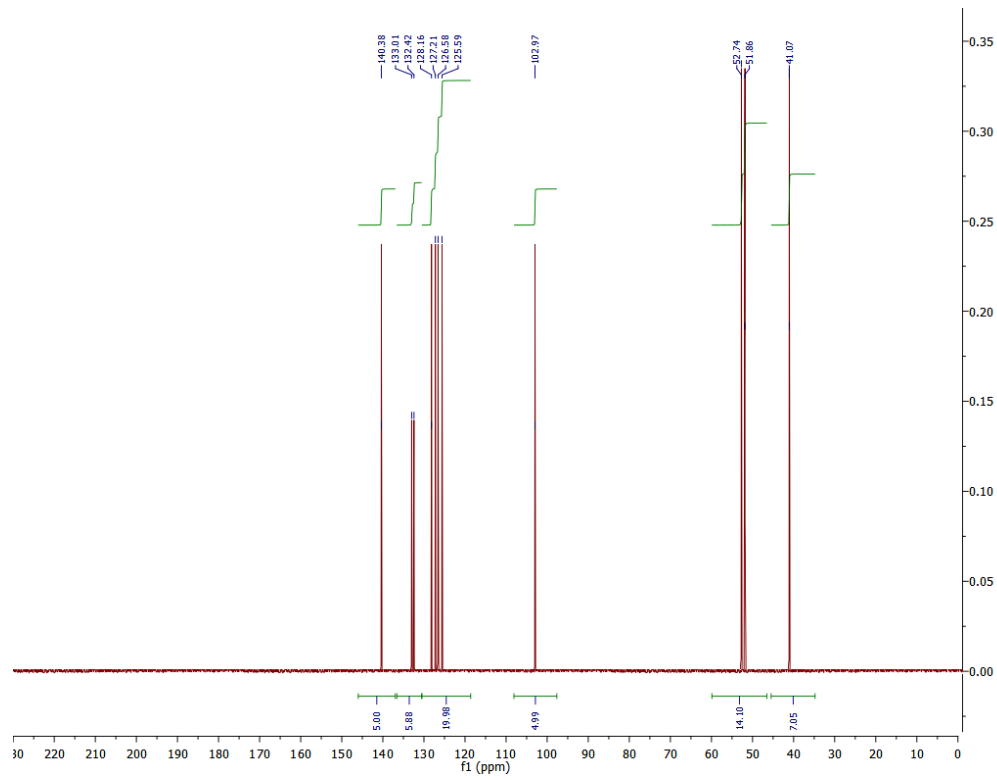
Слика ДМ159. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-3b**



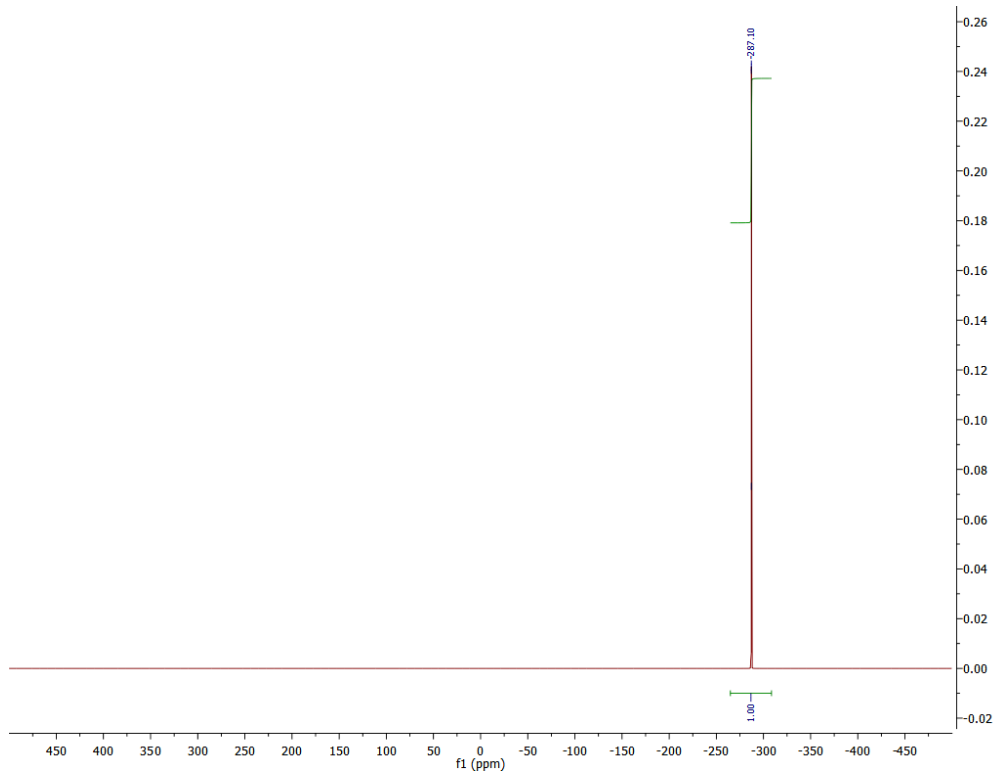
Слика ДМ160. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-3b**



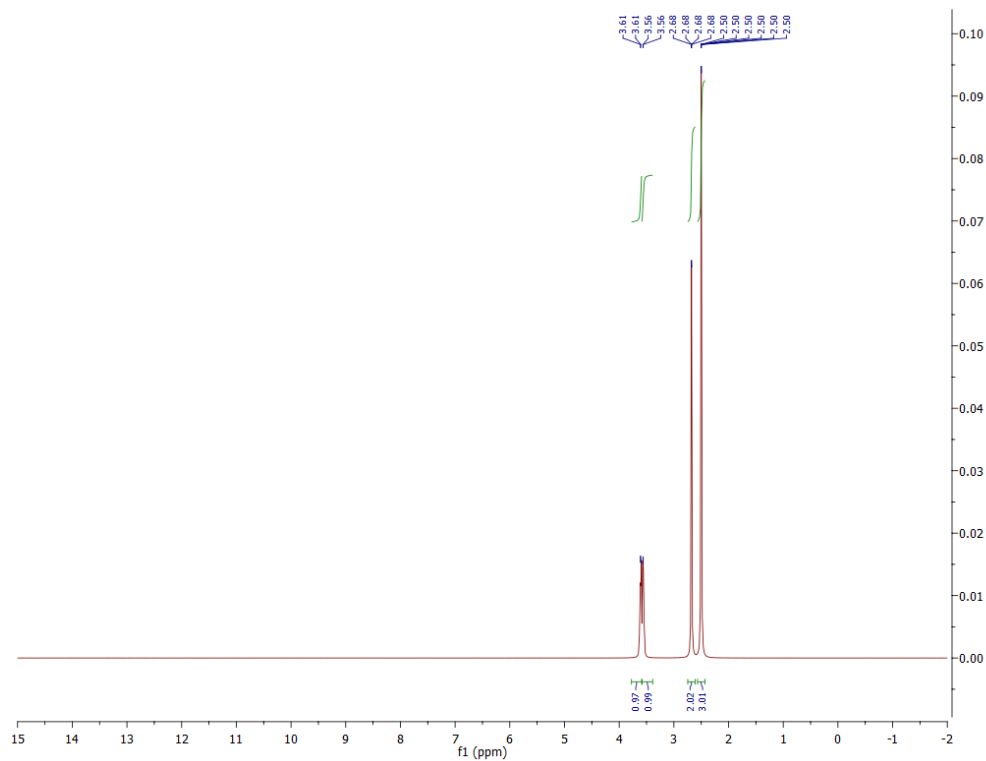
Слика ДМ161. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-C1**.



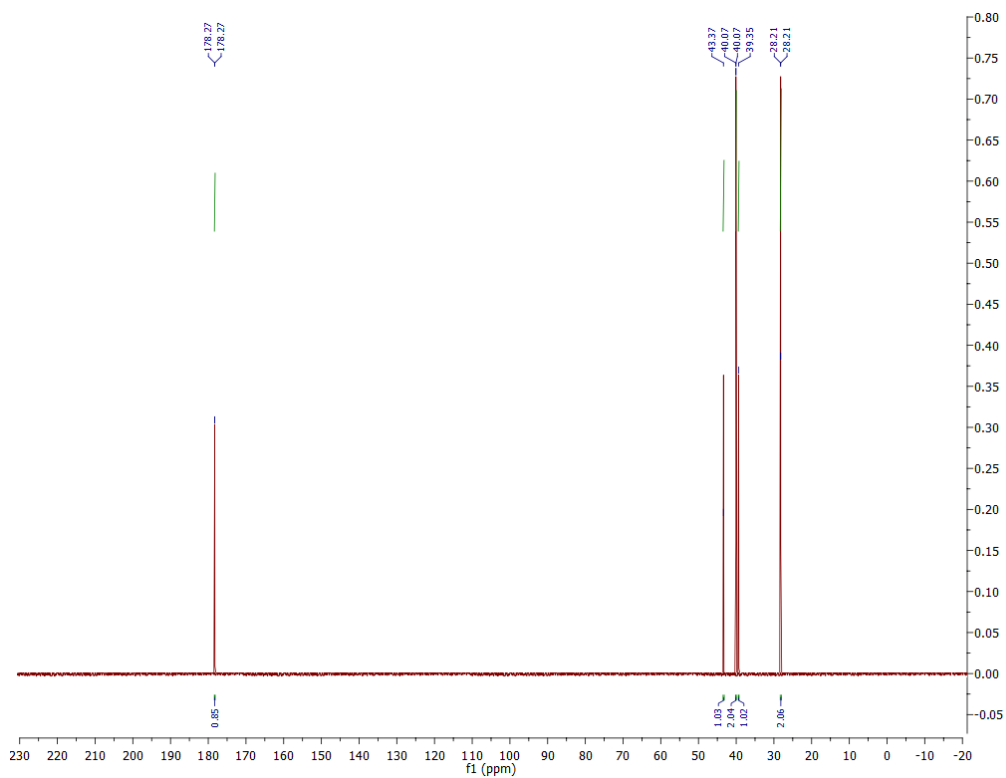
Слика ДМ162. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-C1**.



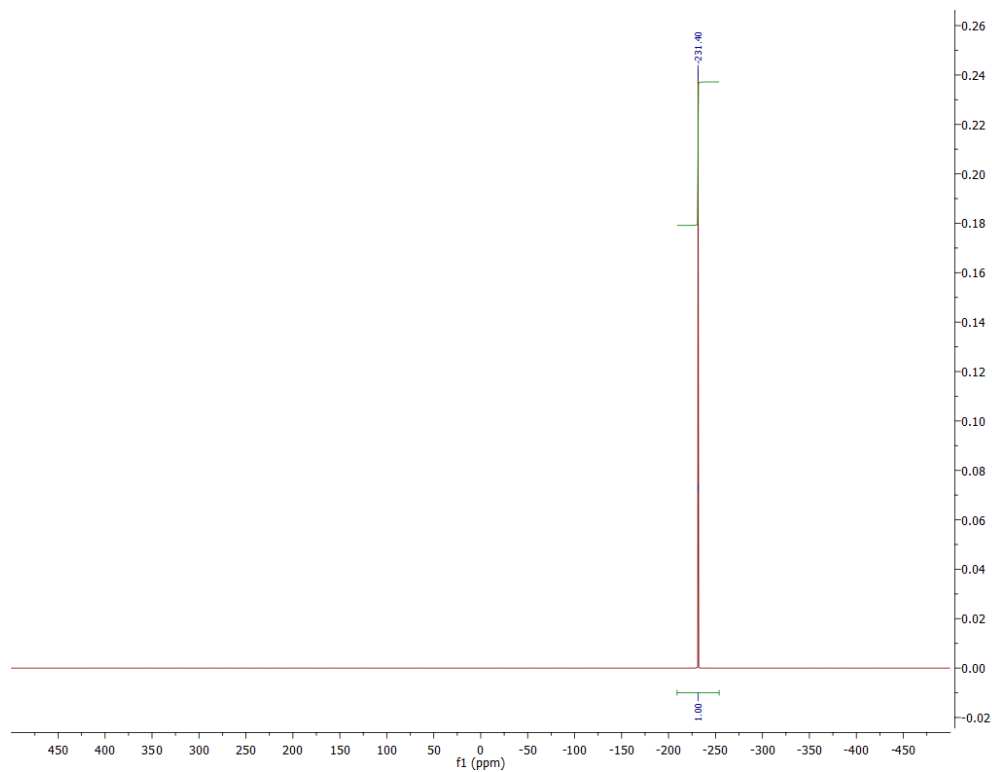
Слика ДМ163. ¹⁵N NMR спектар једињења 3DQ-C1.



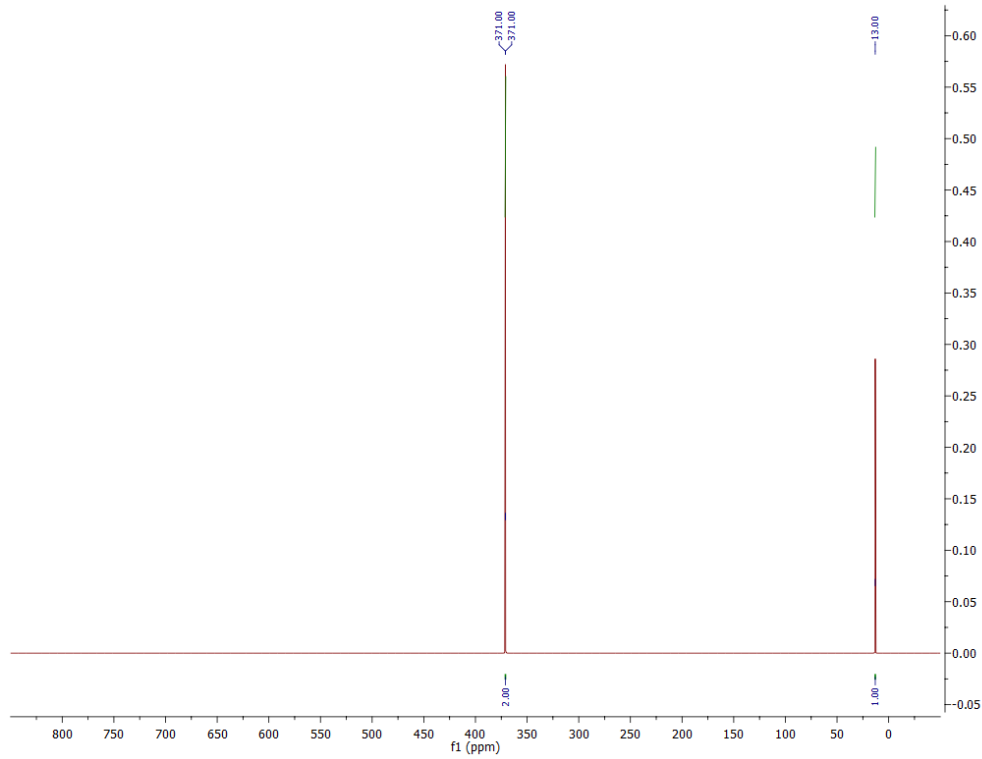
Слика ДМ164. ¹H NMR спектар једињења 3DQ-C2.



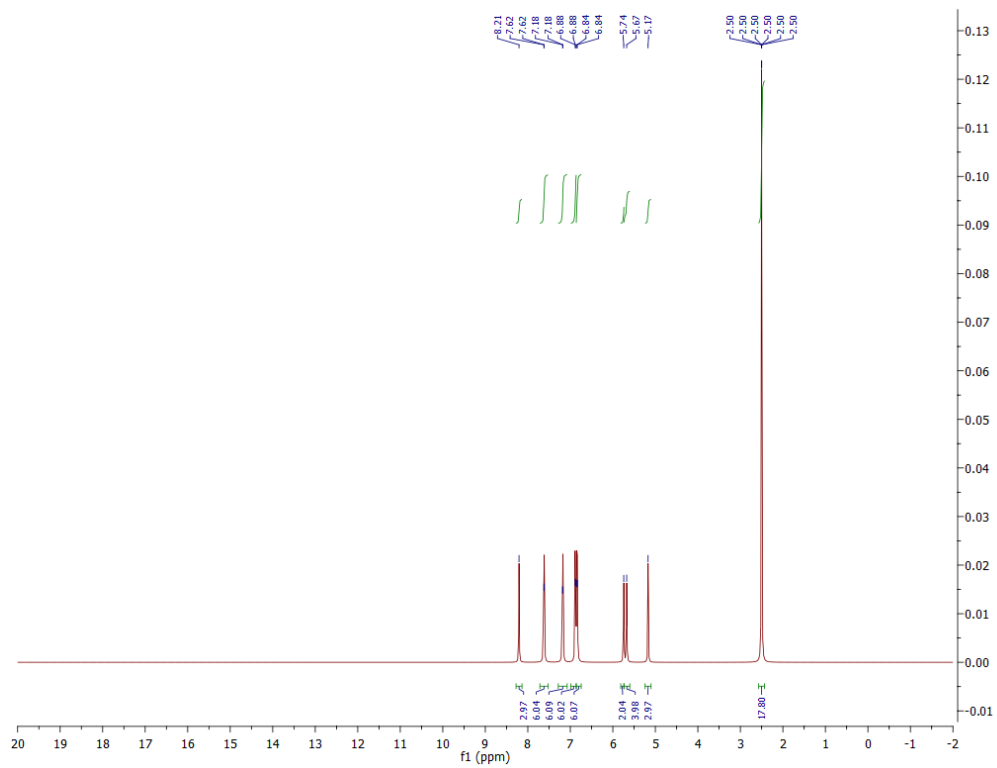
Слика ДМ165. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-C2**.



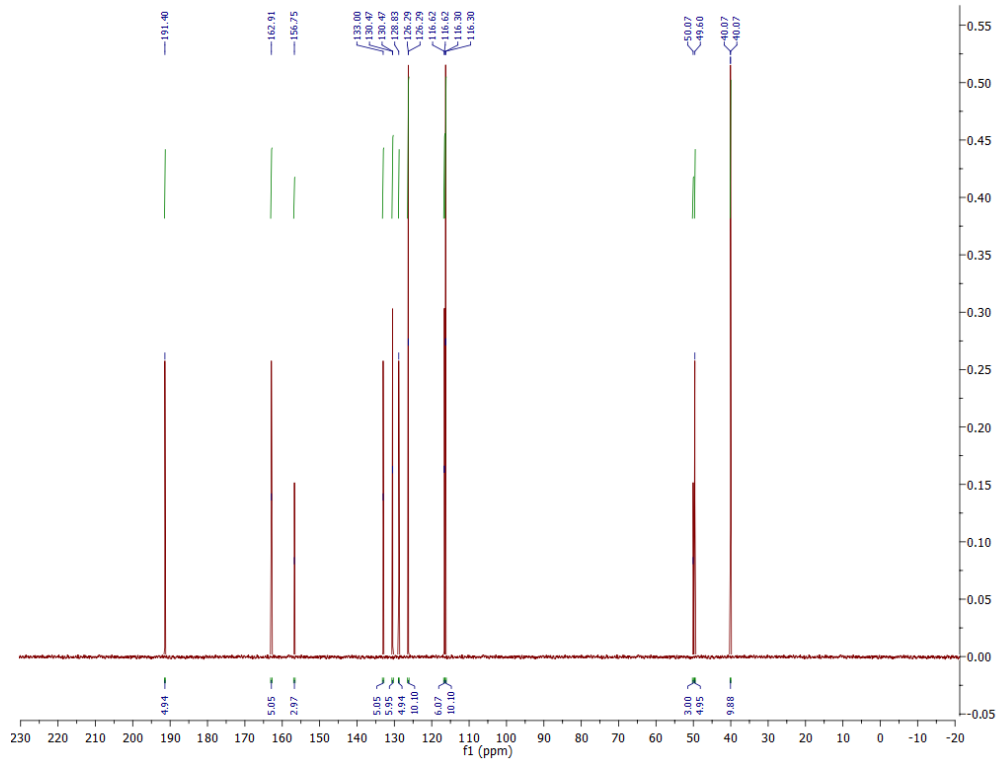
Слика ДМ166. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-C2**.



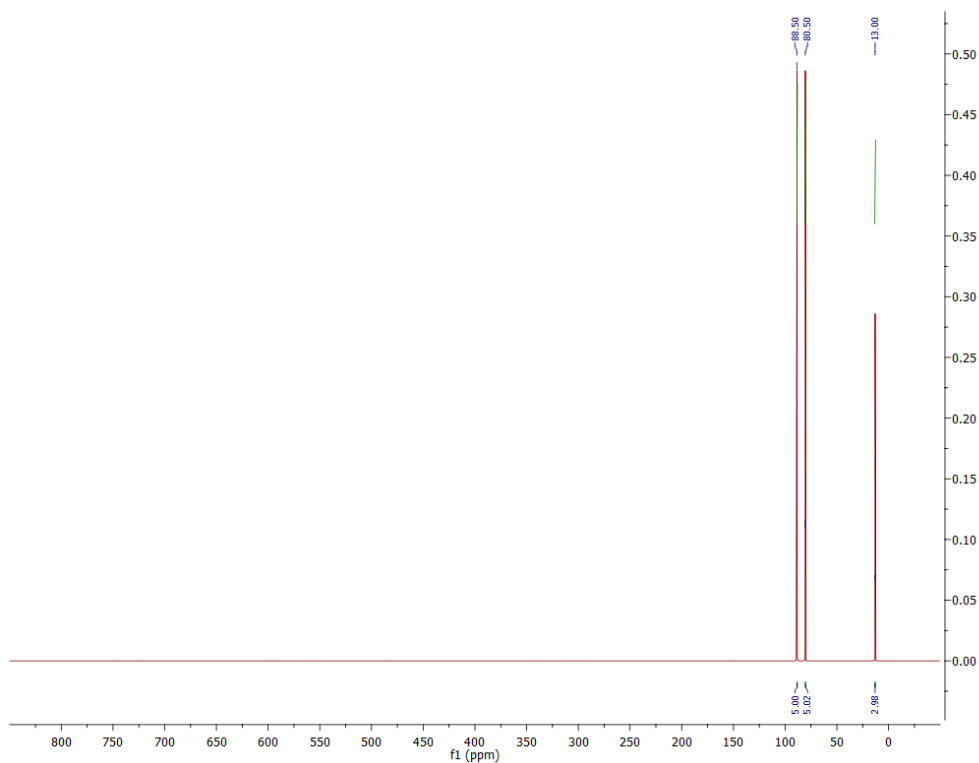
Слика ДМ167. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-C2**.



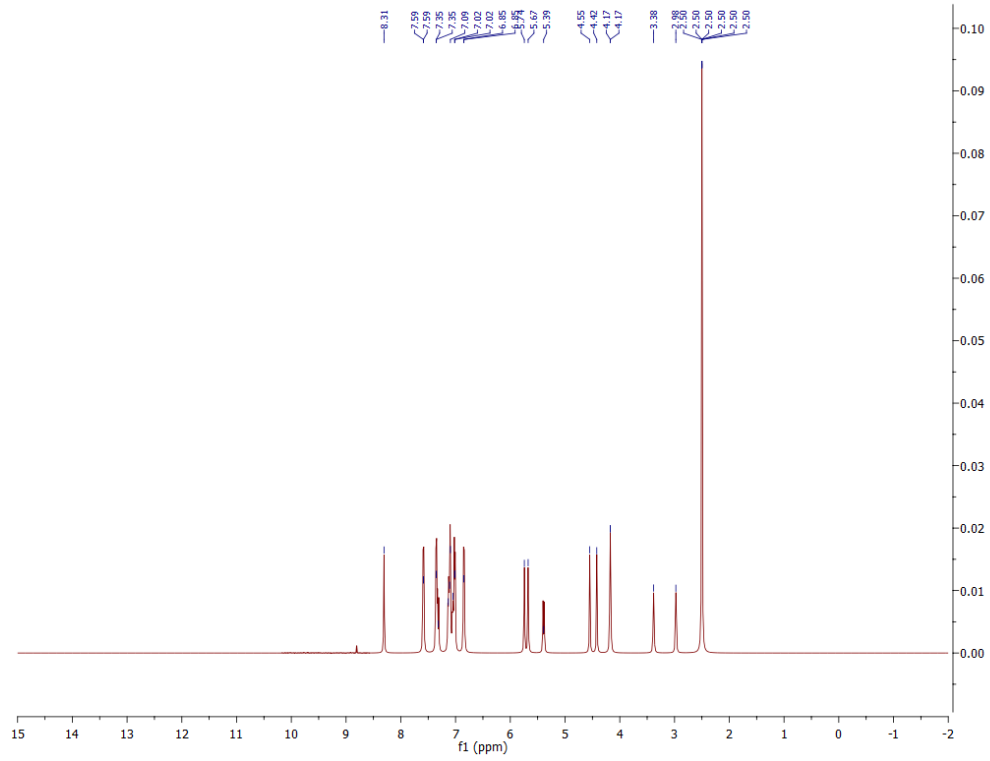
Слика ДМ168. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-C3**.



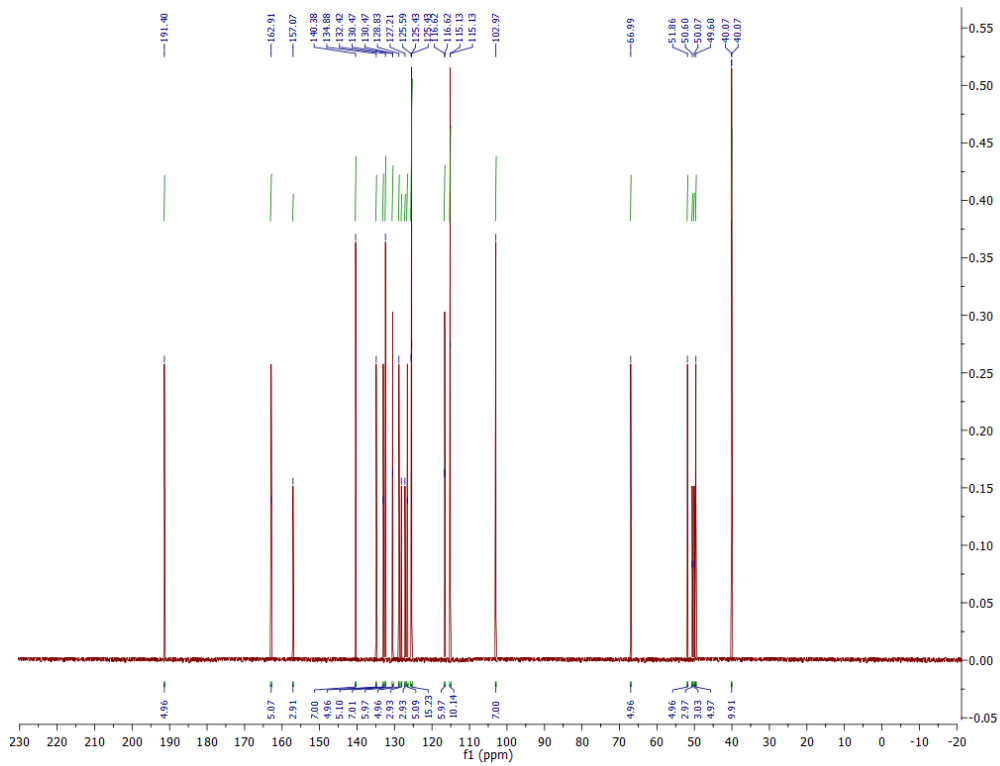
Слика ДМ169. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-C3**.



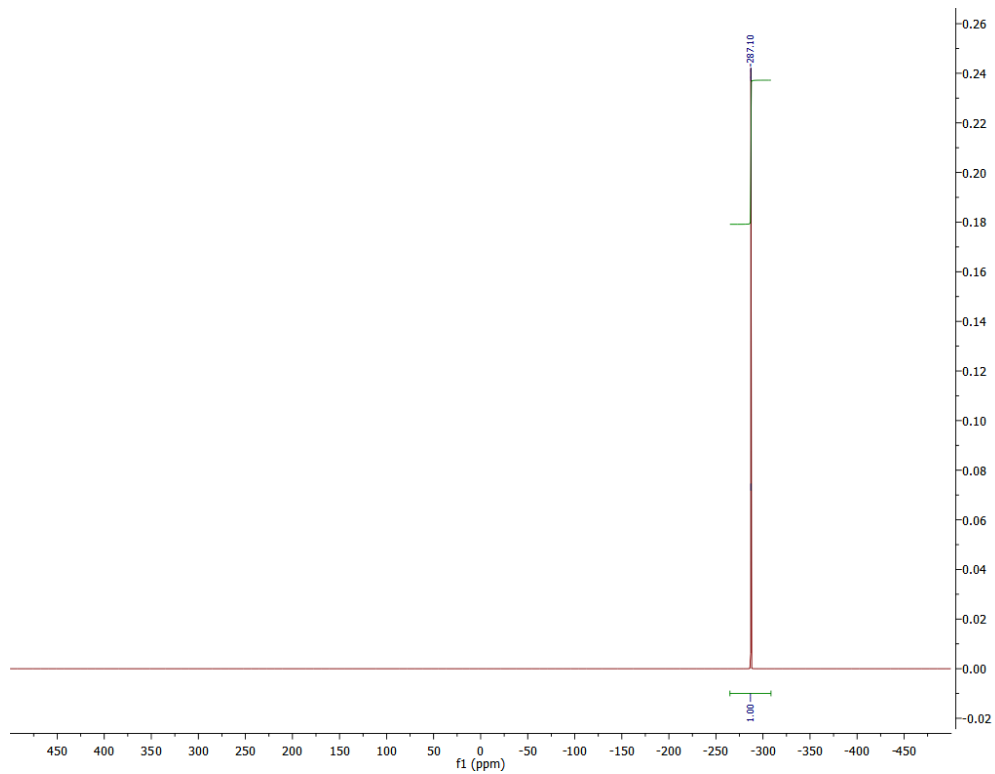
Слика ДМ170. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-C3**.



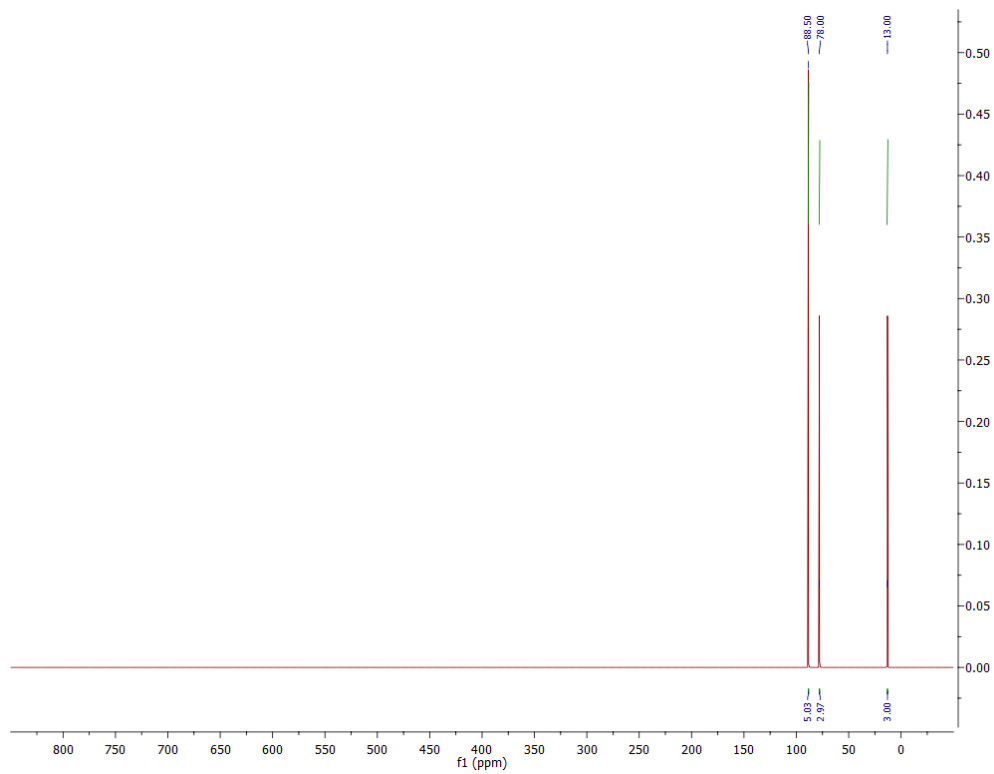
Слика ДМ171. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-C3-1**.



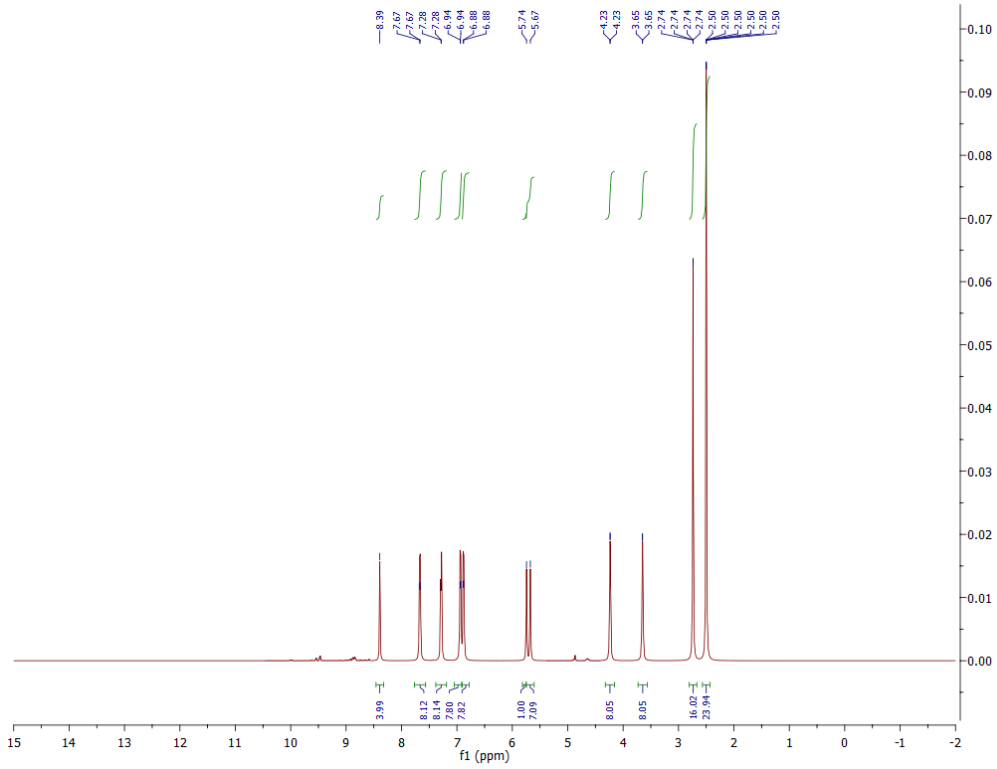
Слика ДМ172. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-C3-1**.



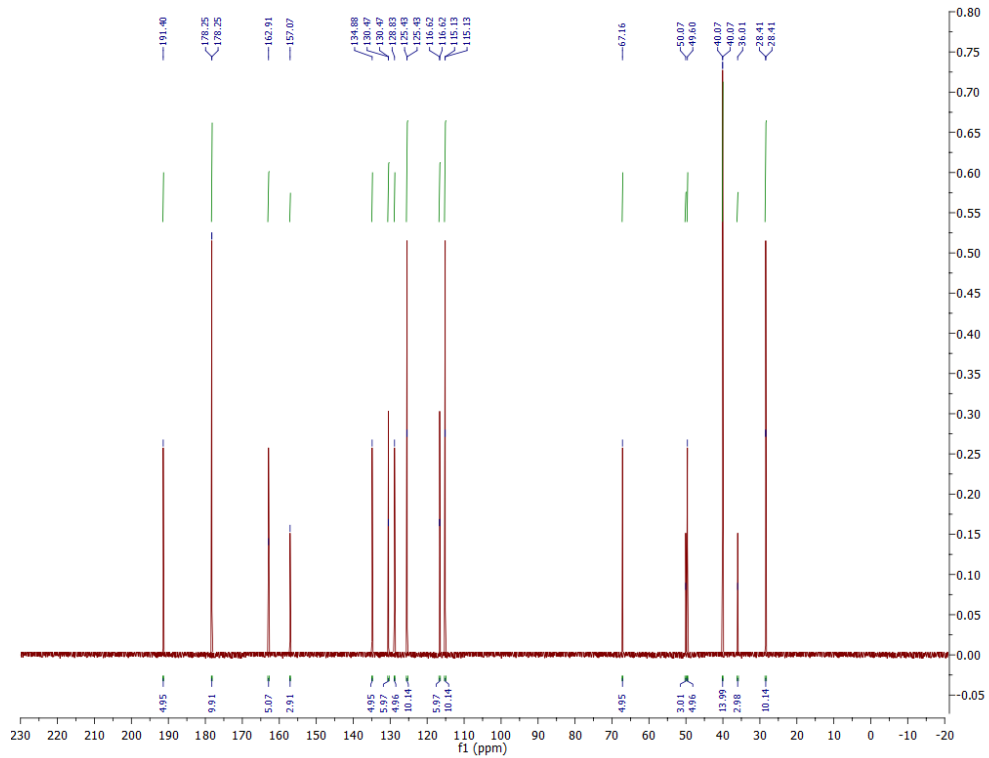
Слика ДМ173. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-C3-1**.



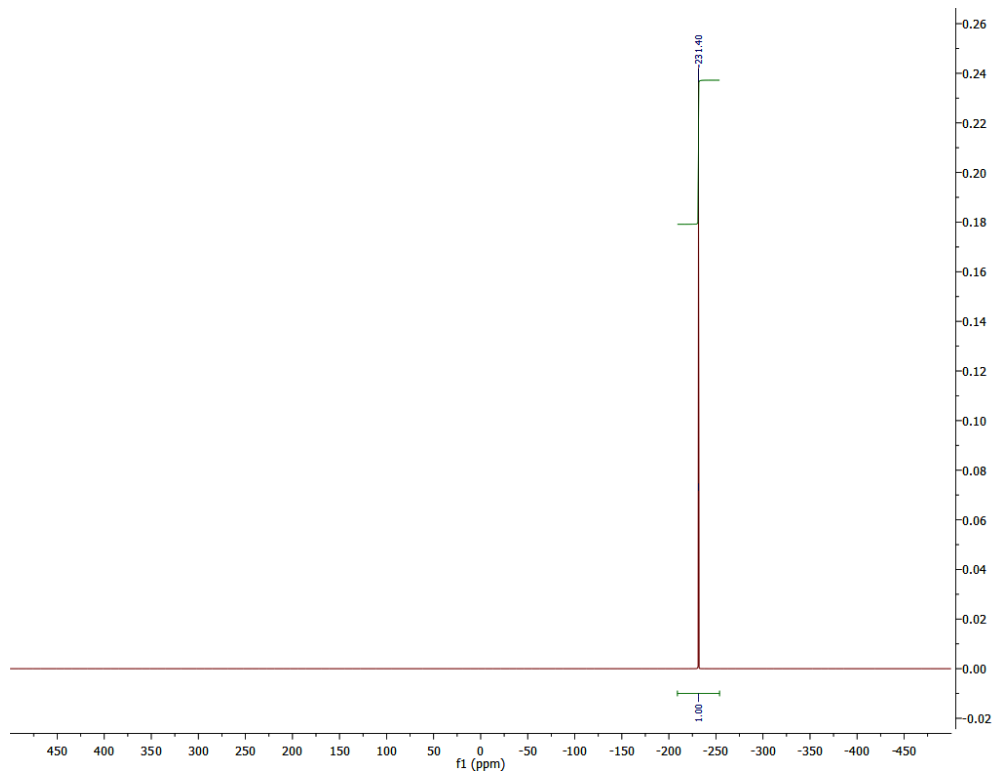
Слика ДМ174. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-C3-1**.



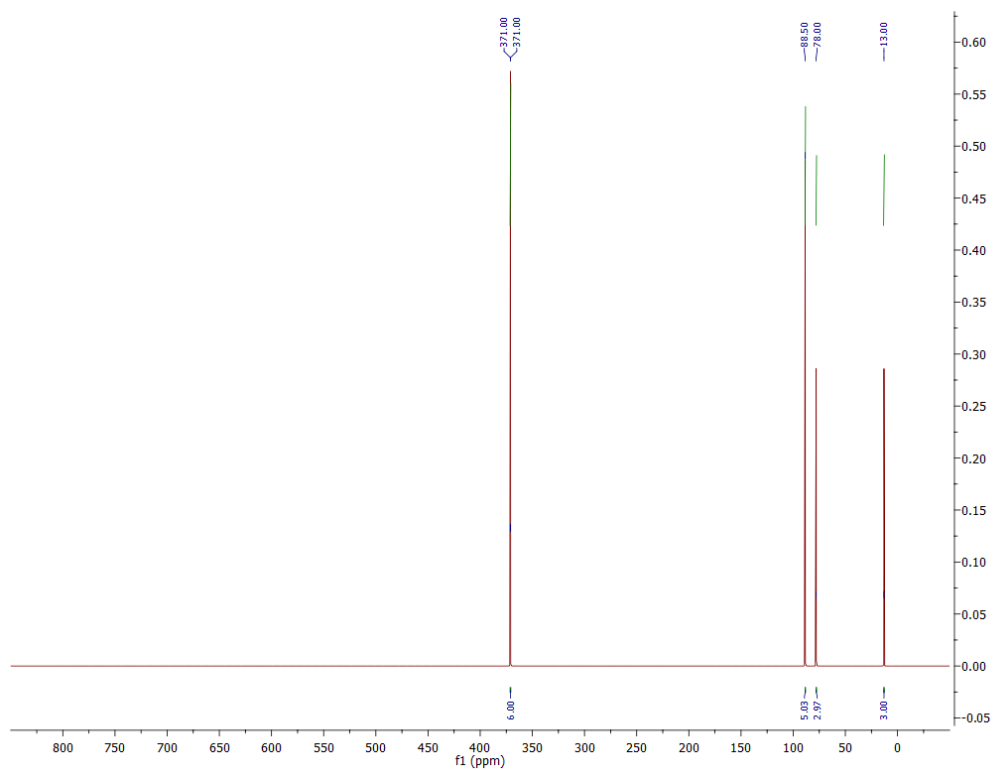
Слика ДМ175. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-C3-2.



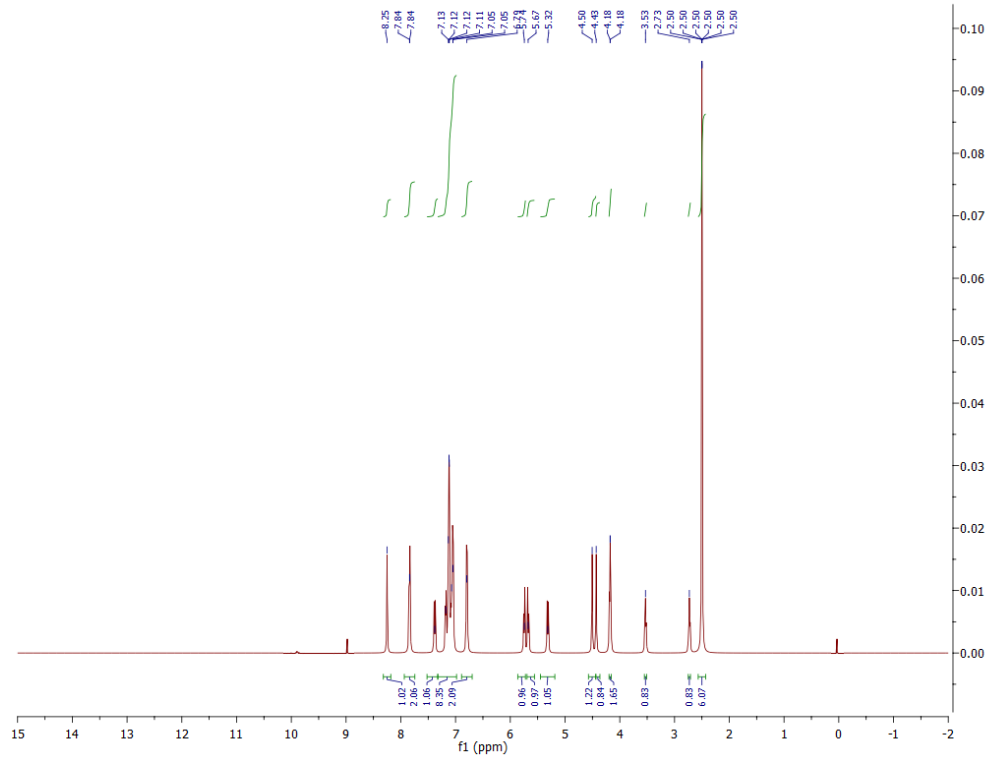
Слика ДМ176. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-C3-2.



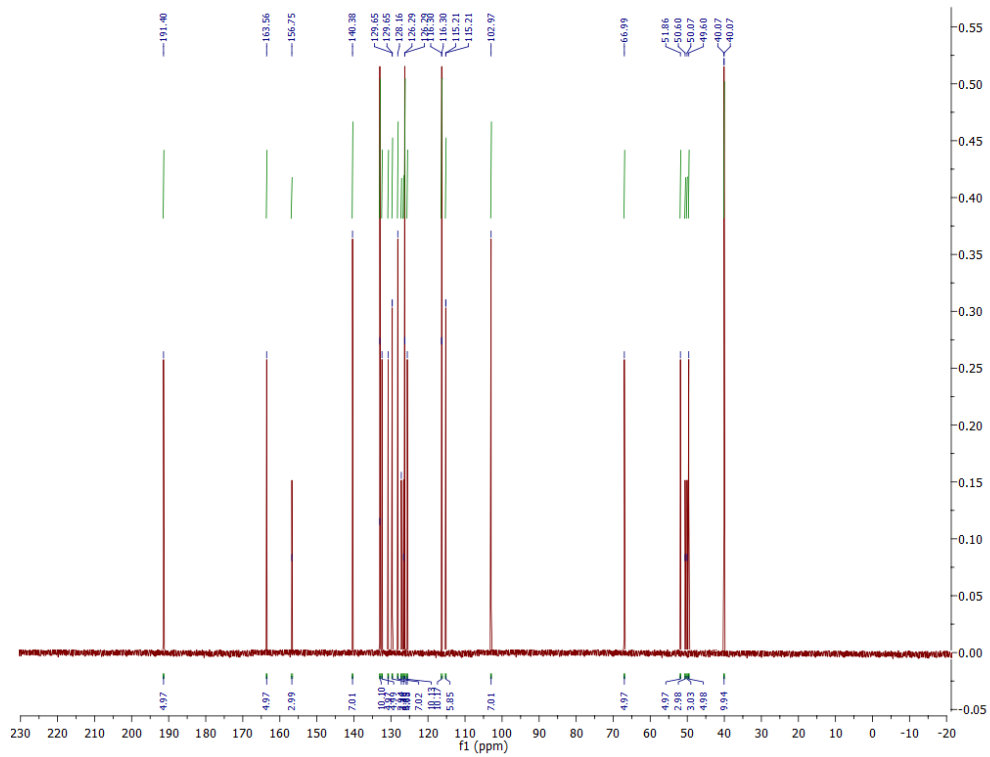
Слика ДМ177. ^{15}N NMR спектар једињења 3DQ-C3-2.



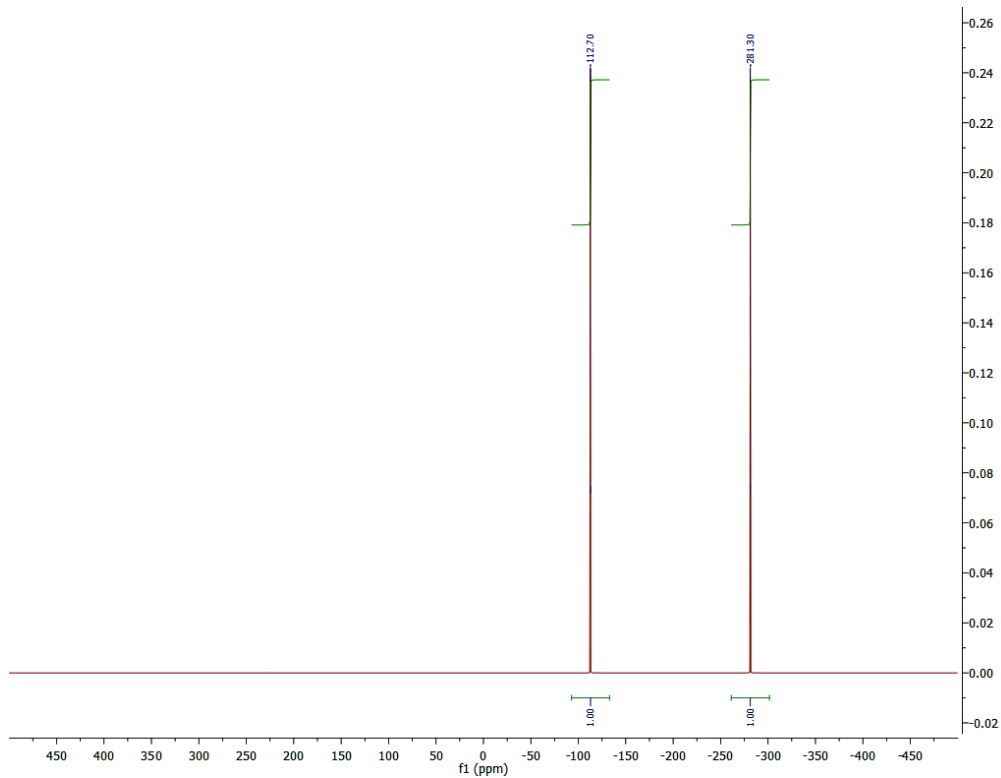
Слика ДМ178. ^{17}O NMR спектар једињења 3DQ-C3-2.



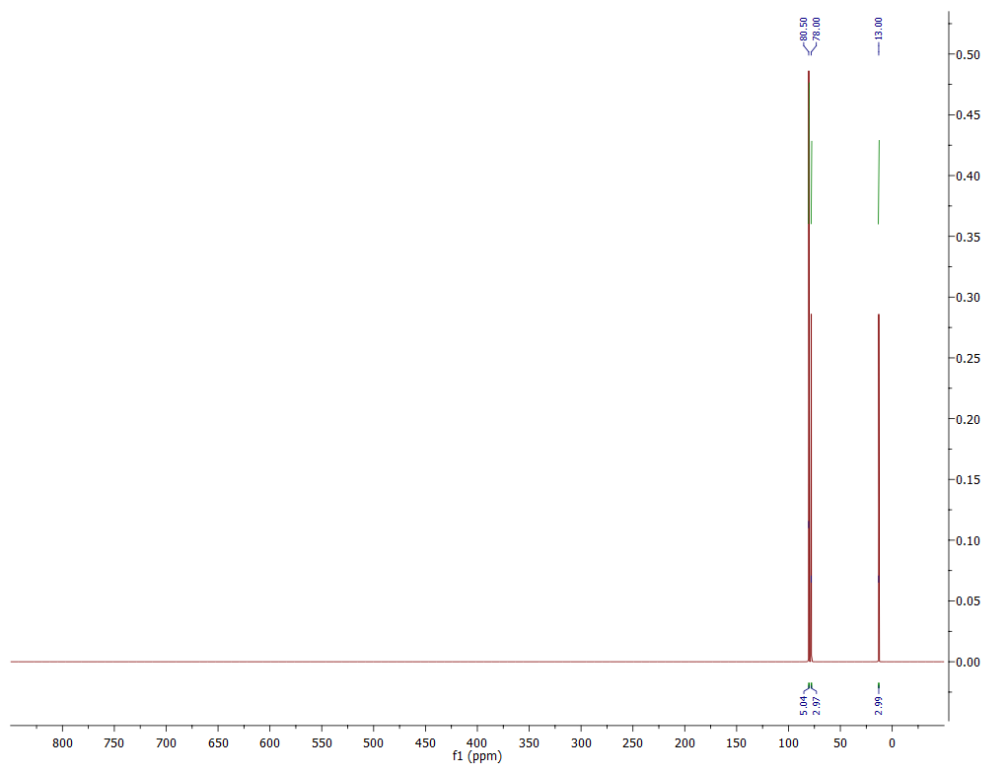
Слика ДМ179. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-C3-3**.



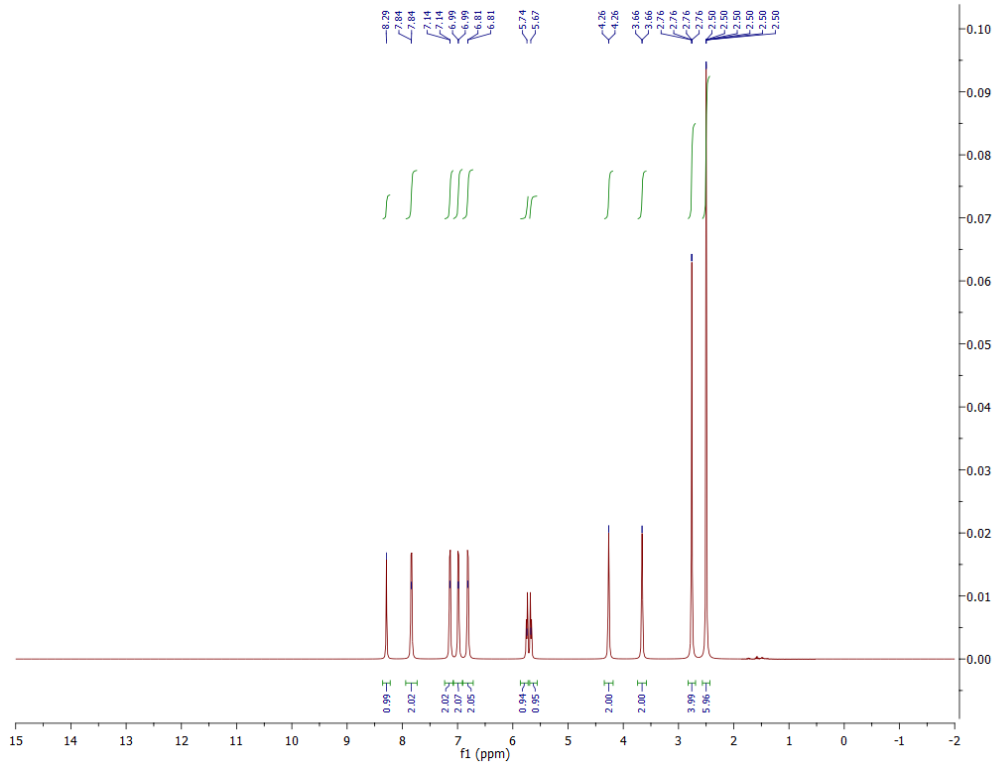
Слика ДМ180. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-C3-3**.



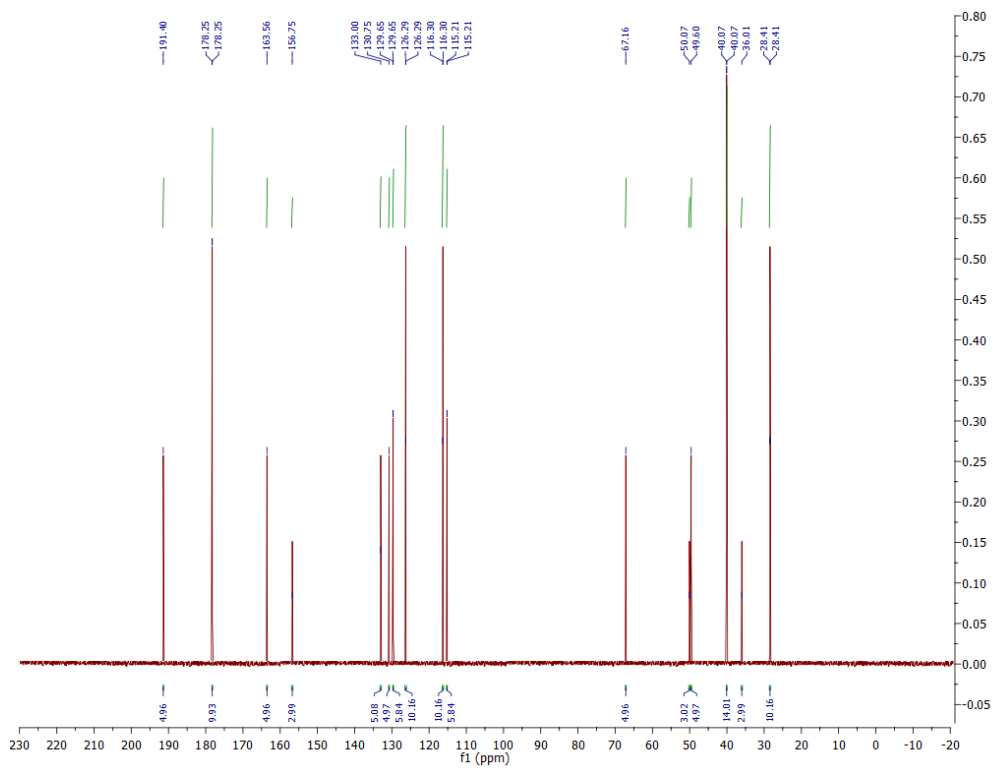
Слика ДМ181. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-C3-3**.



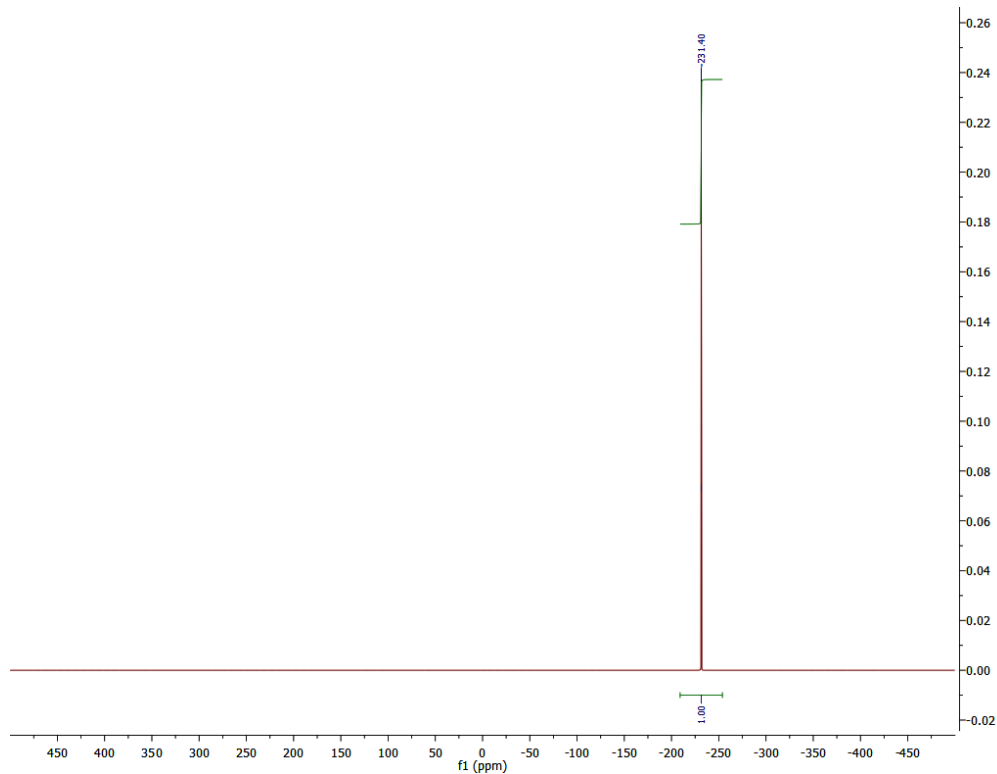
Слика ДМ182. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-C3-3**.



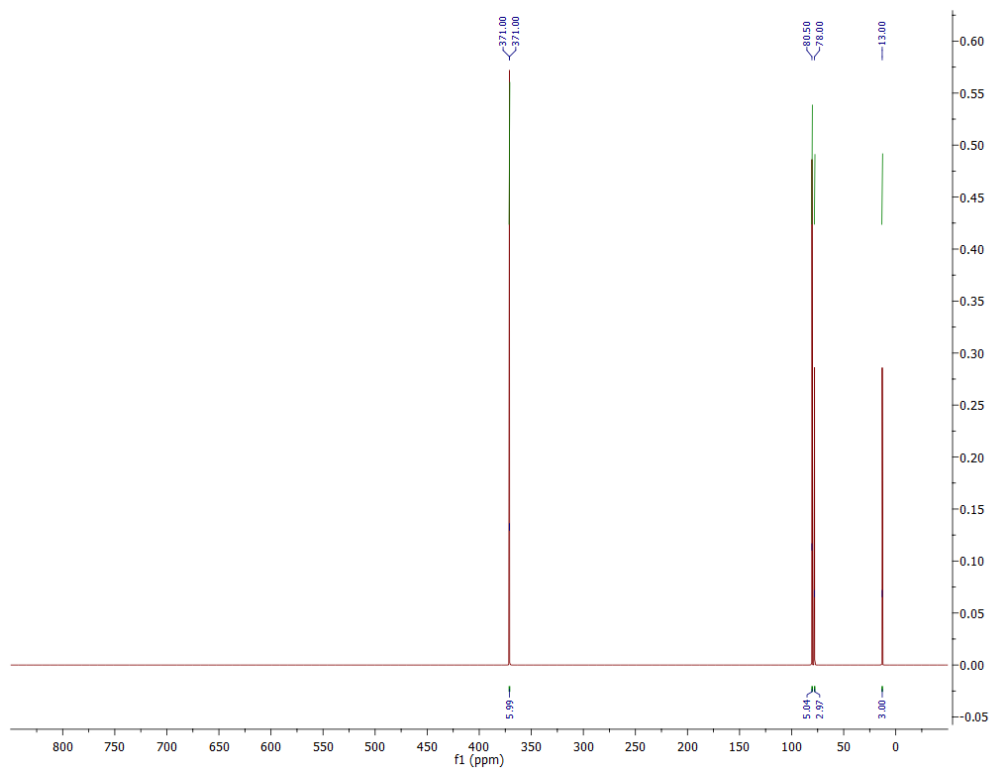
Слика ДМ183. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-C3-4.



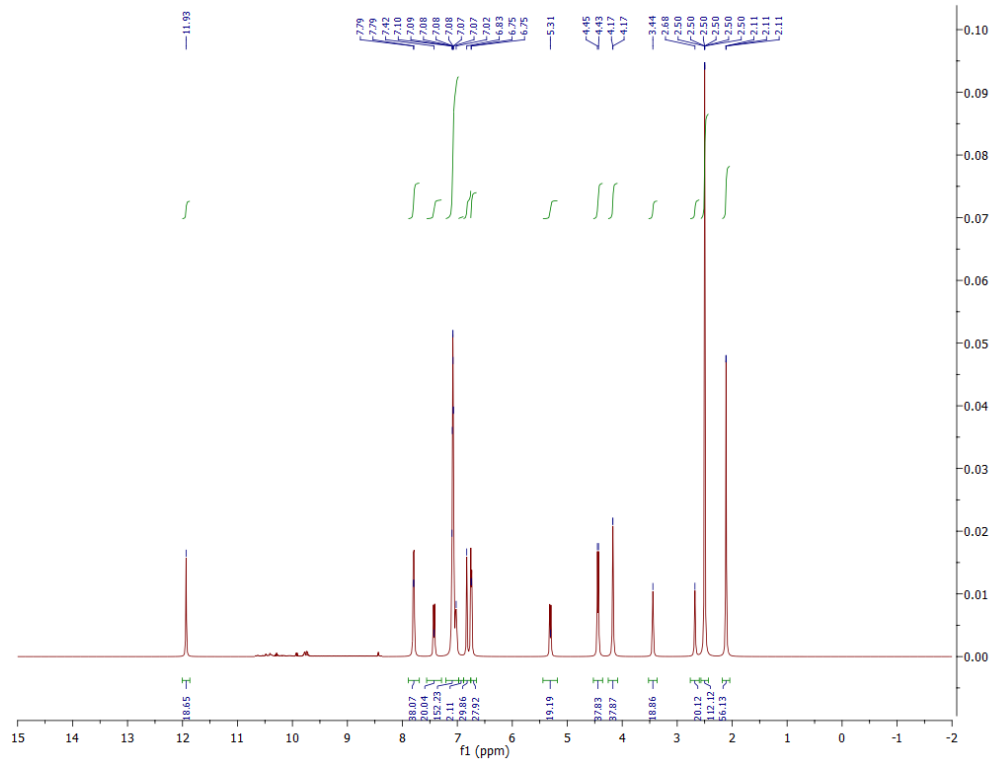
Слика ДМ184. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-C3-4.



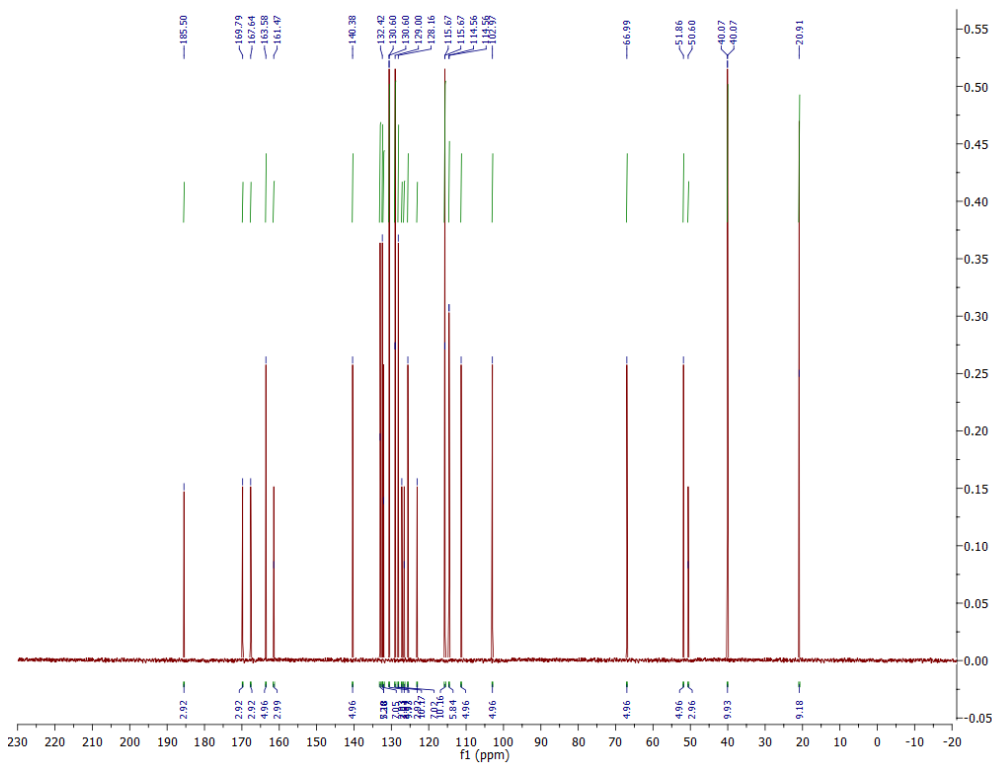
Слика ДМ185. ^{15}N NMR спектар једињења 3DQ-C3-4.



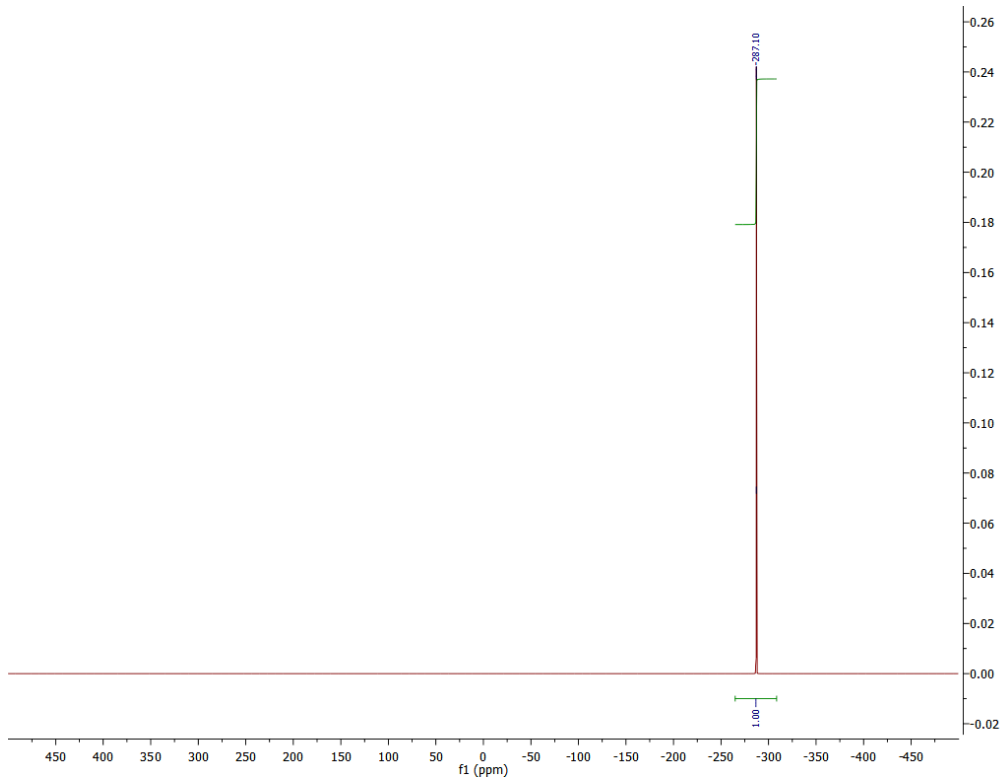
Слика ДМ186. ^{17}O NMR спектар једињења 3DQ-C3-4.



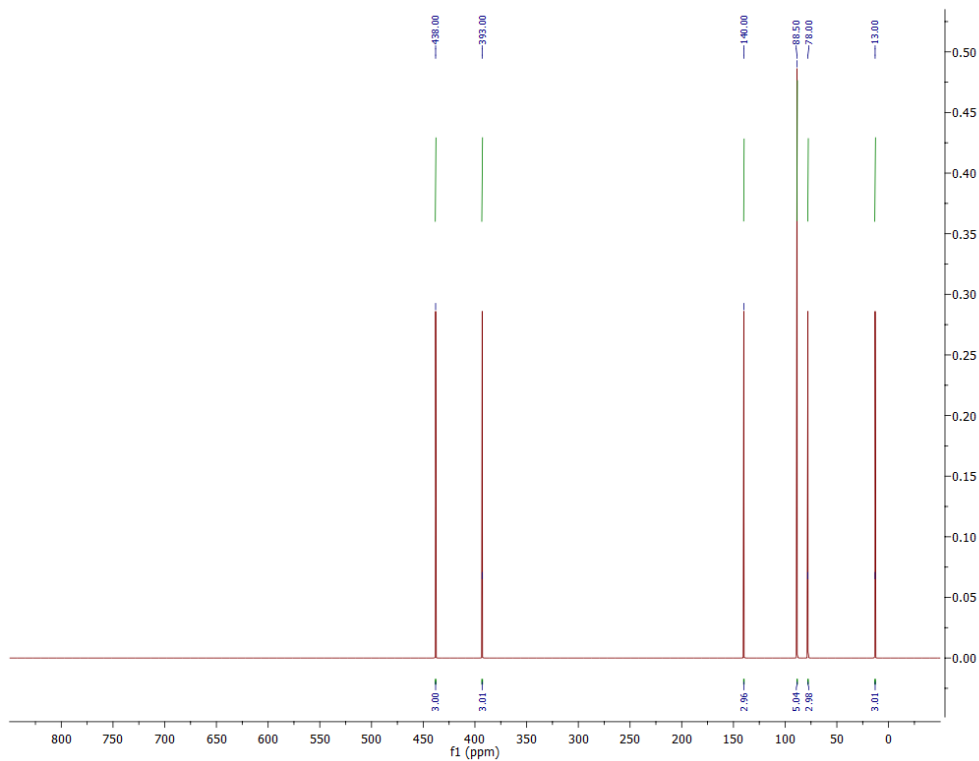
Слика ДМ187. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1c**.



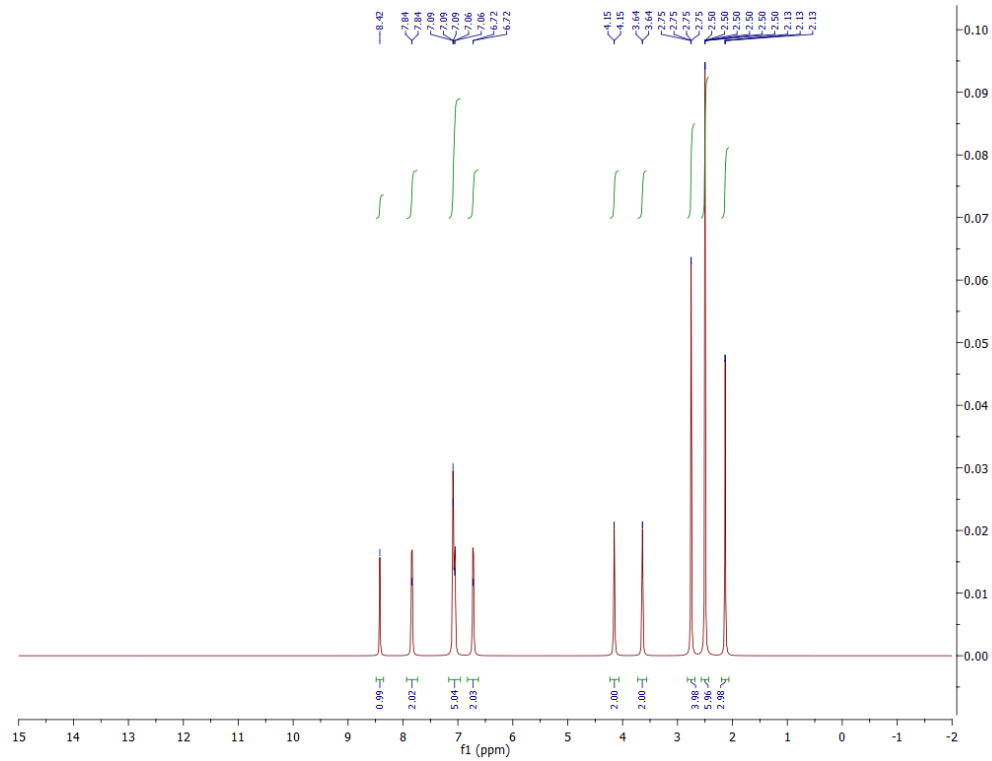
Слика ДМ188. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1c**.



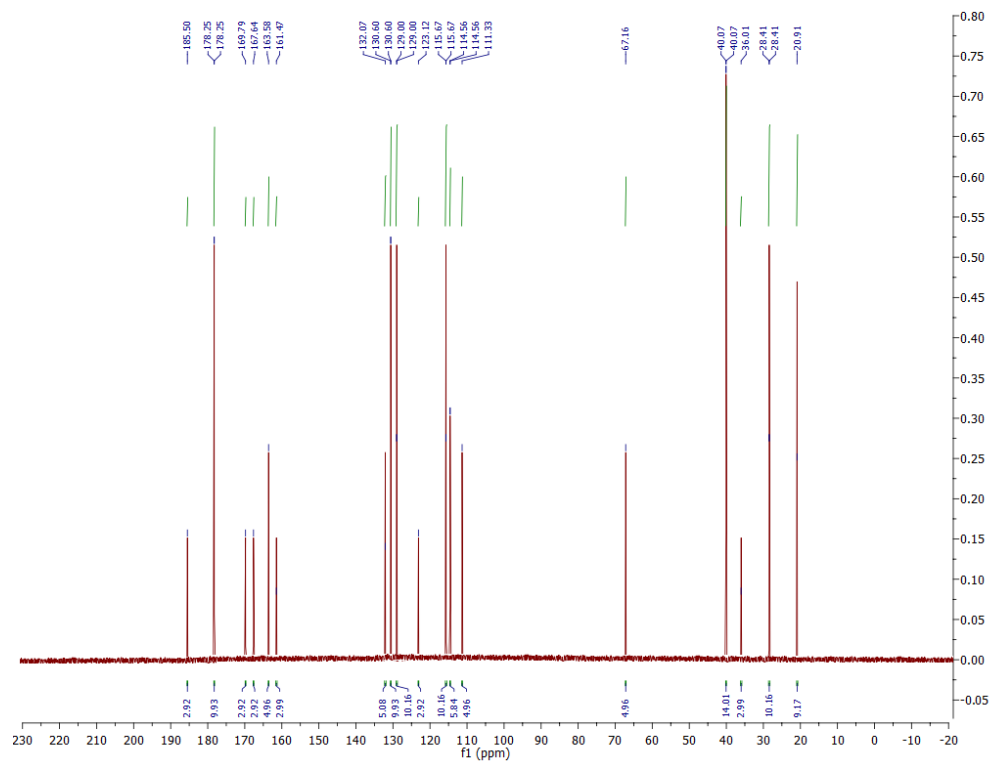
Слика ДМ189. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1c**.



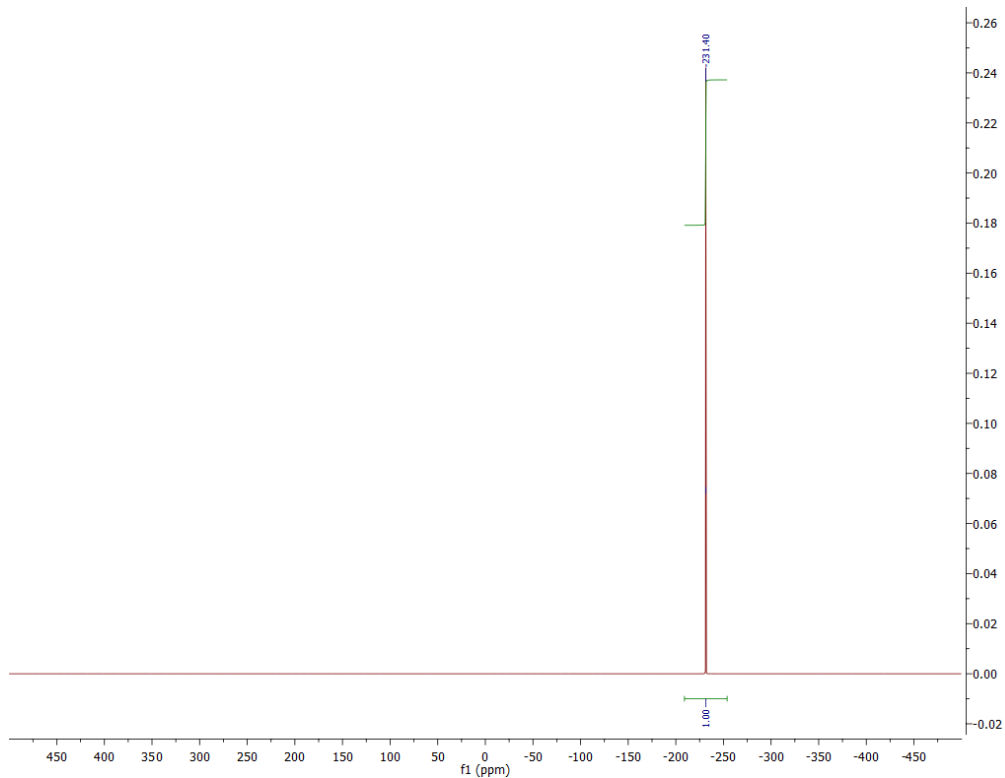
Слика ДМ190. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1c**.



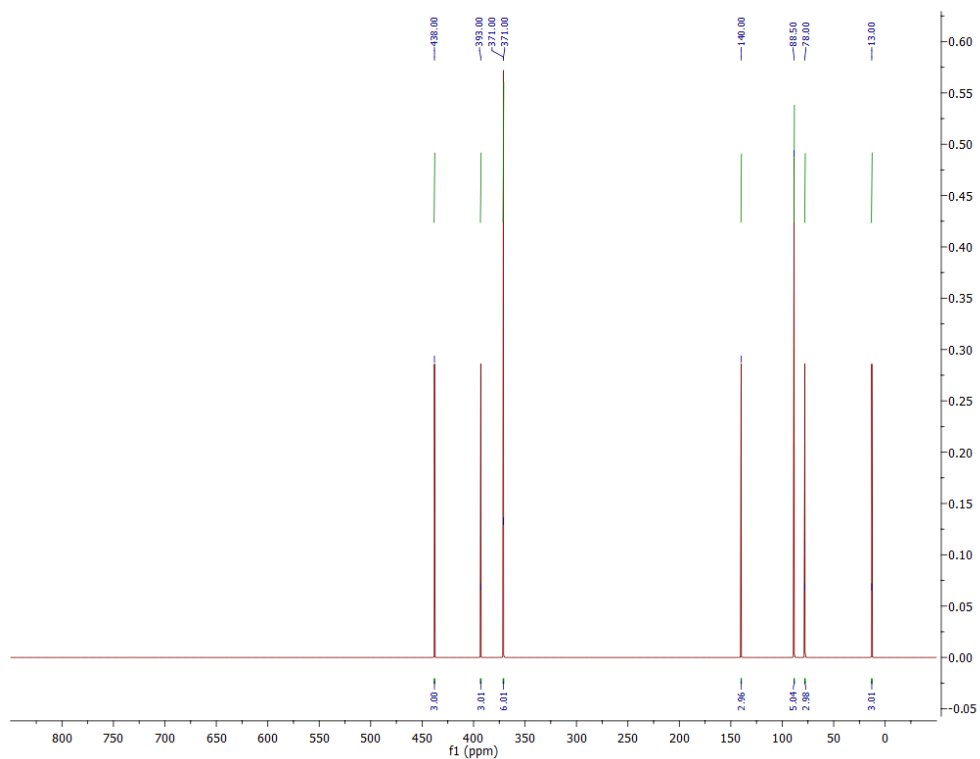
Слика ДМ191. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2c**.



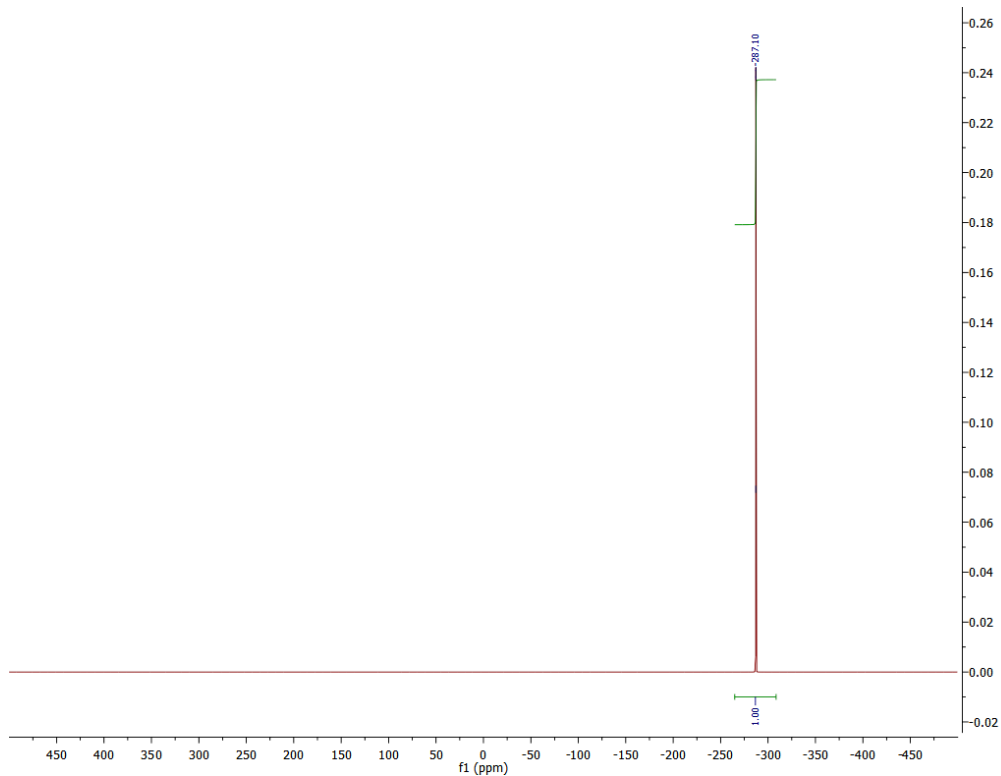
Слика ДМ192. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2c**.



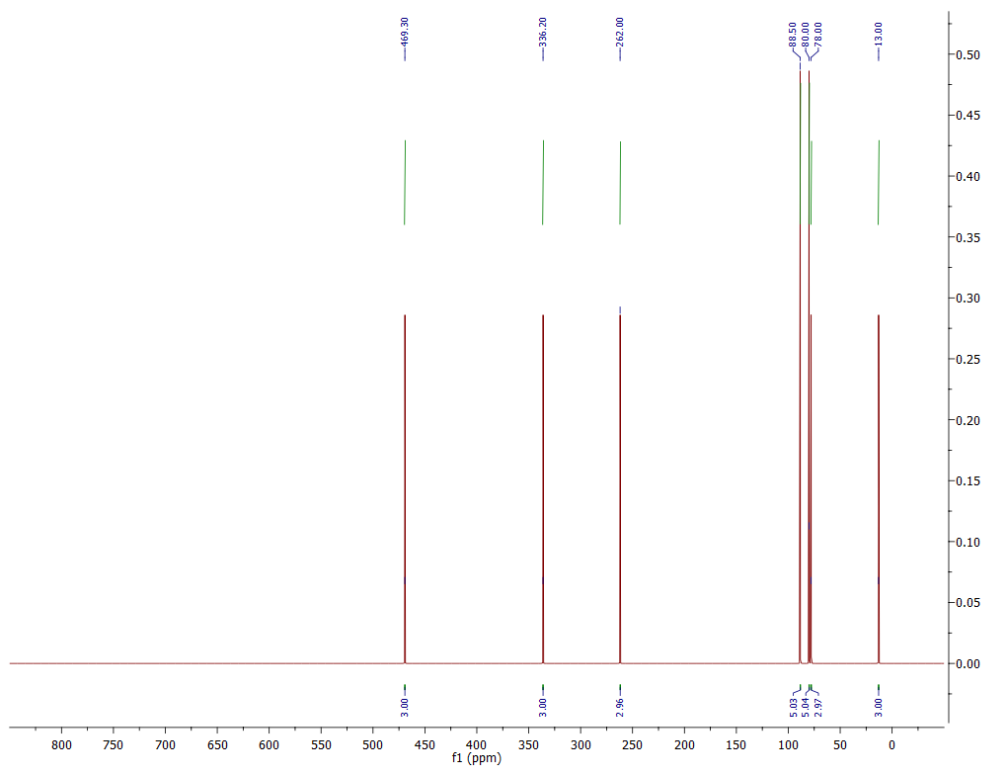
Слика ДМ193. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2c**.



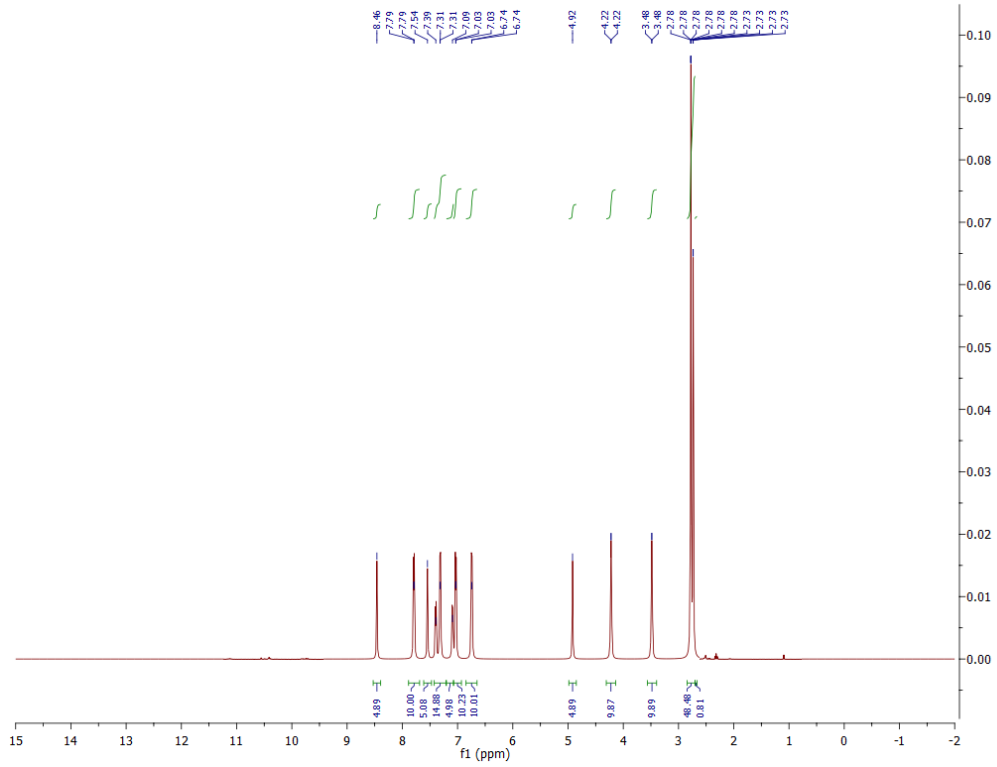
Слика ДМ194. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-2c**.



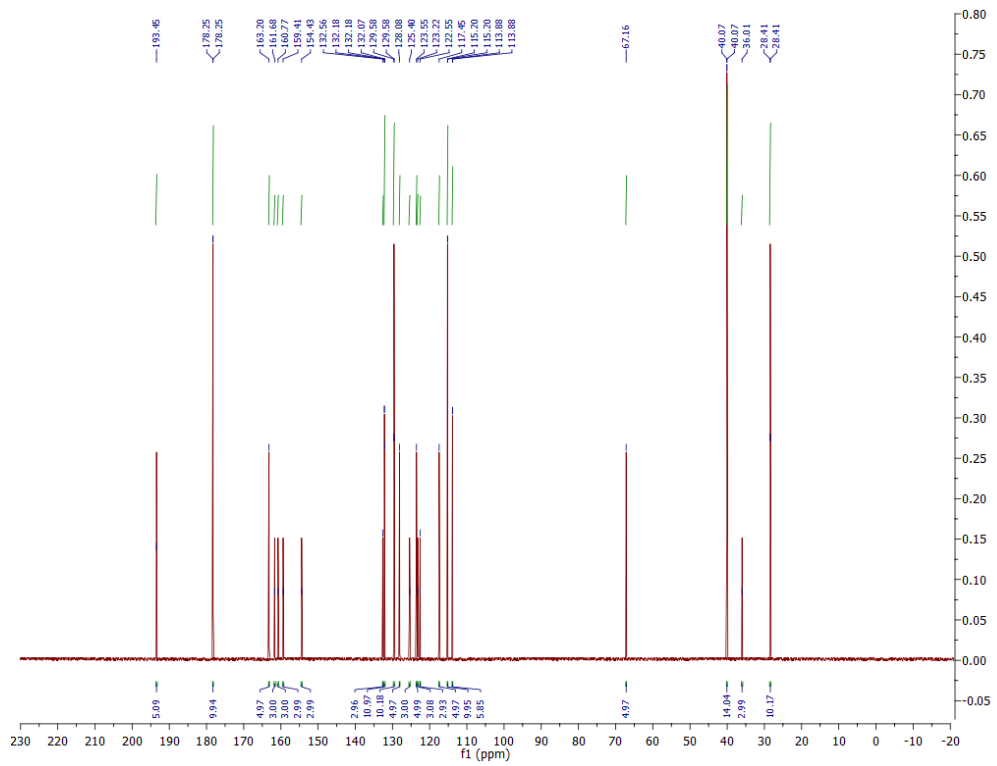
Слика ДМ197. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1c**.



Слика ДМ198. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1c**.

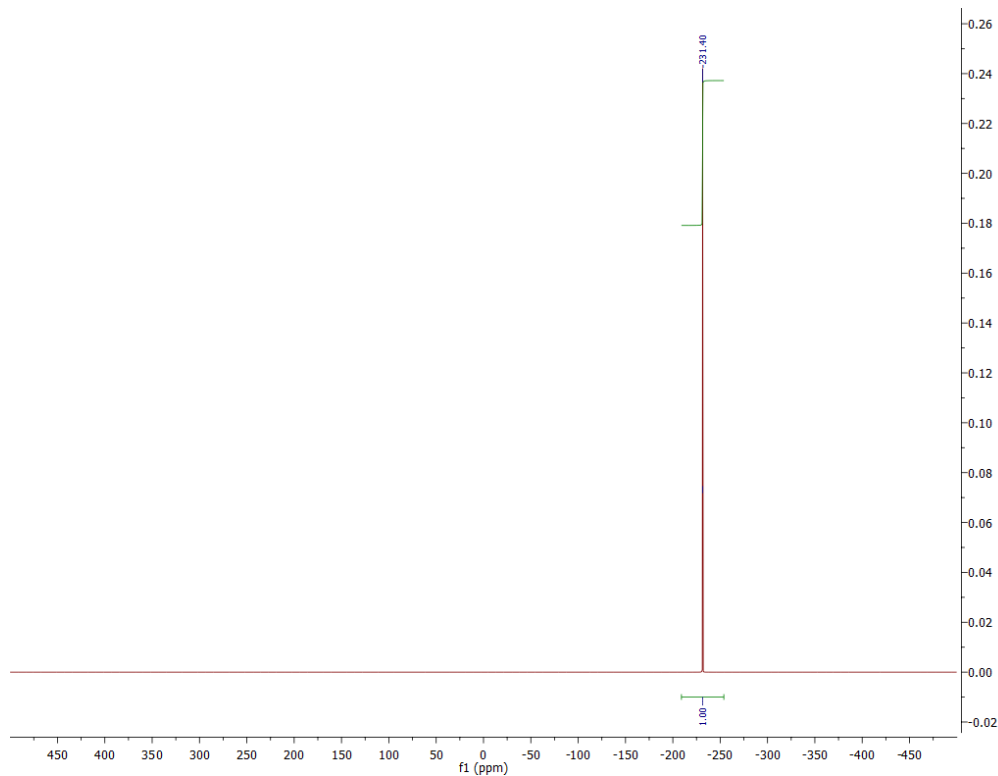


Слика ДМ199. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-2c.

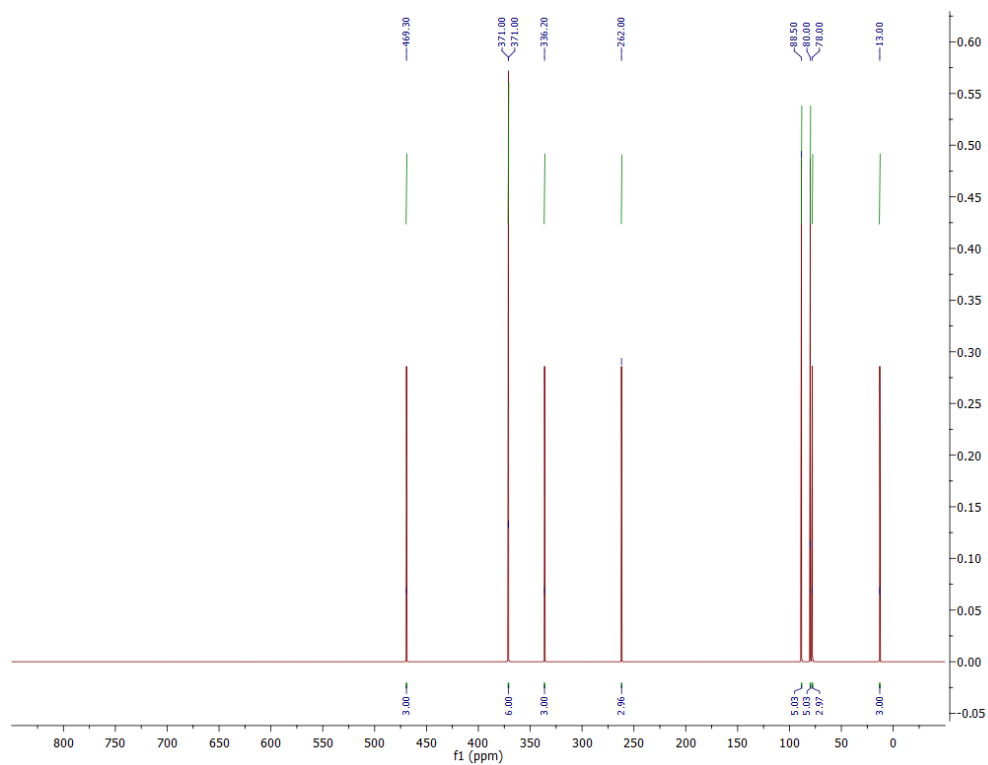


Слика ДМ200. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-2c.

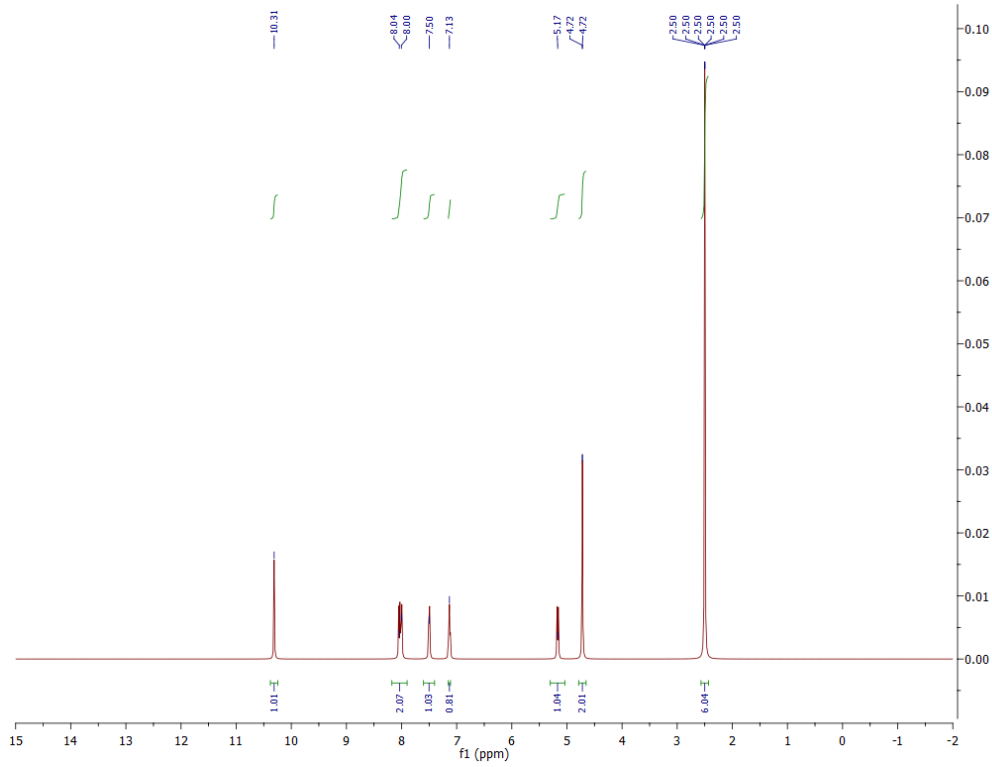
ДМ: 260



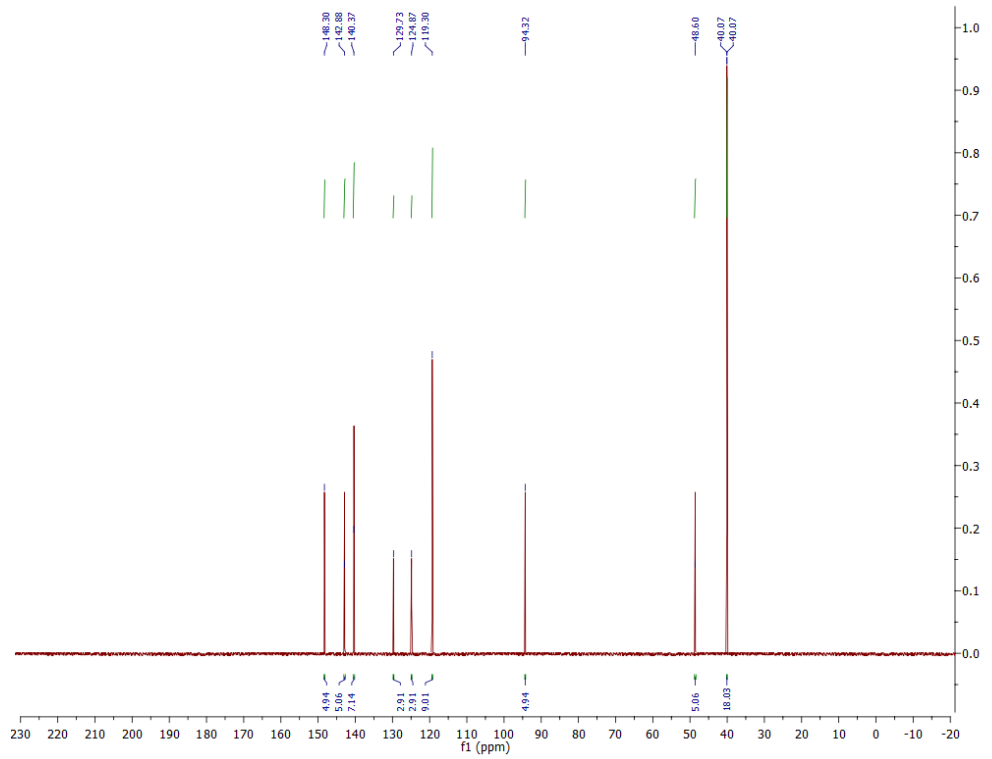
Слика ДМ201. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-2c**.



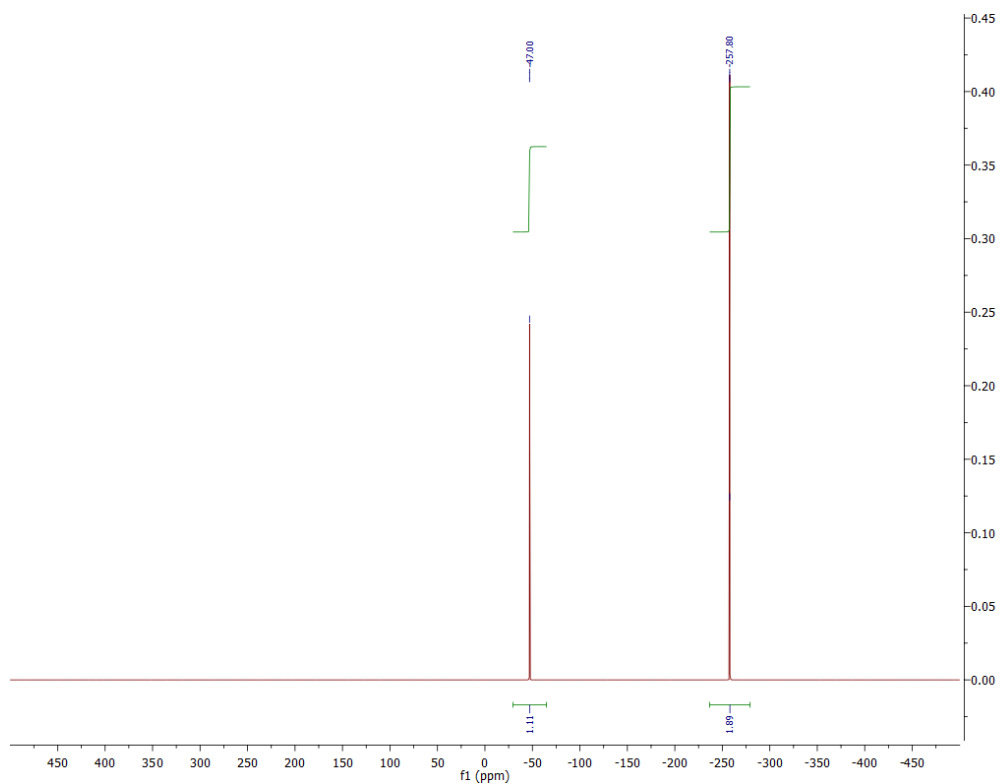
Слика ДМ202. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-2c**.



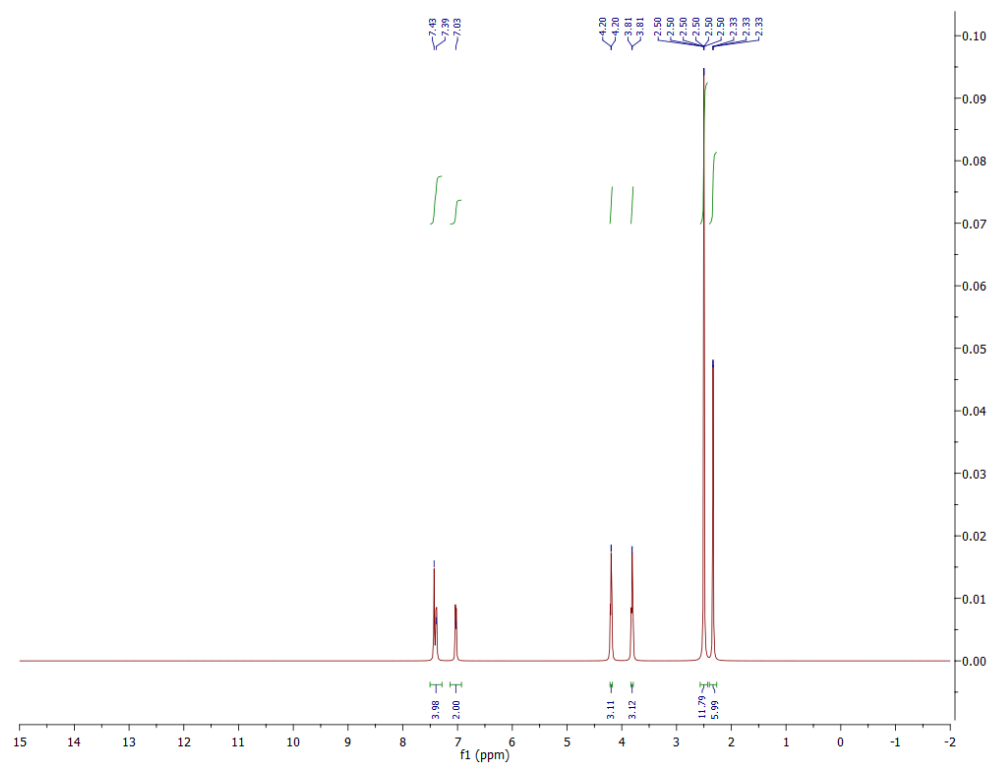
Слика ДМ203. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-R1d.



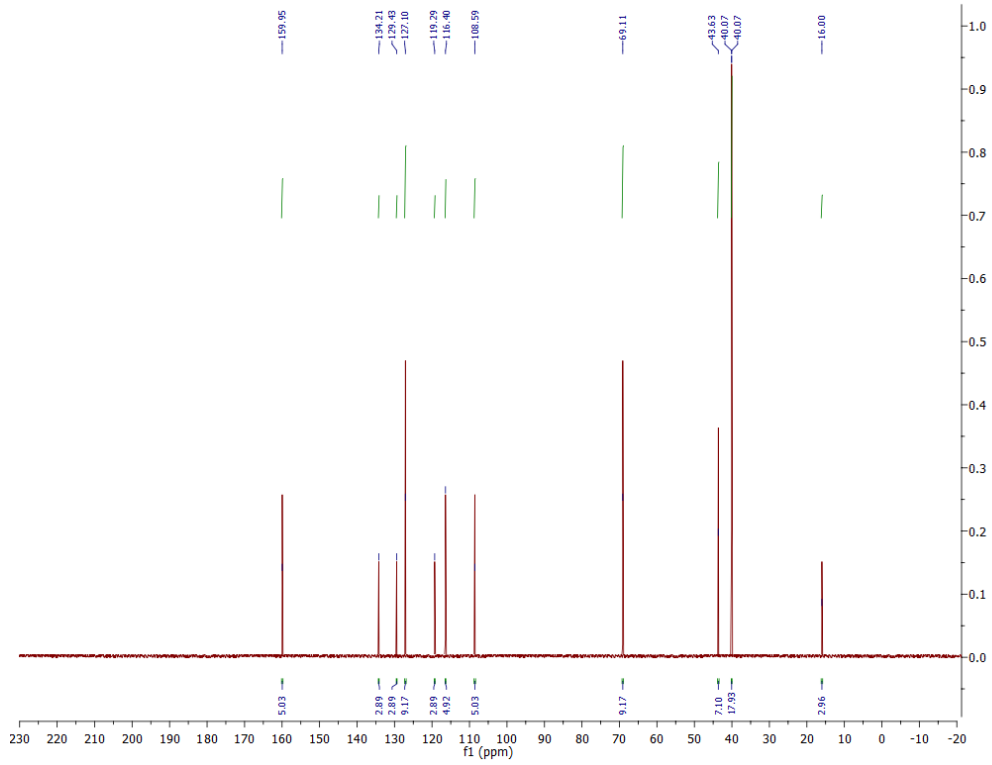
Слика ДМ204. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-R1d.



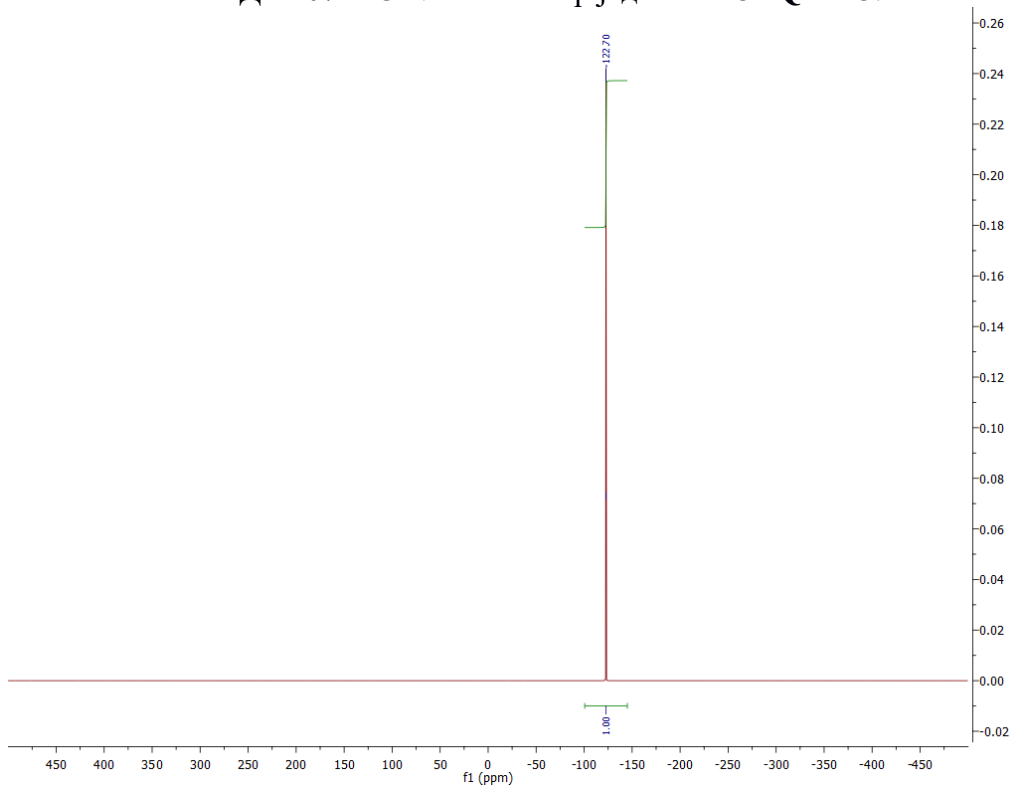
Слика ДМ205. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-R1d**.



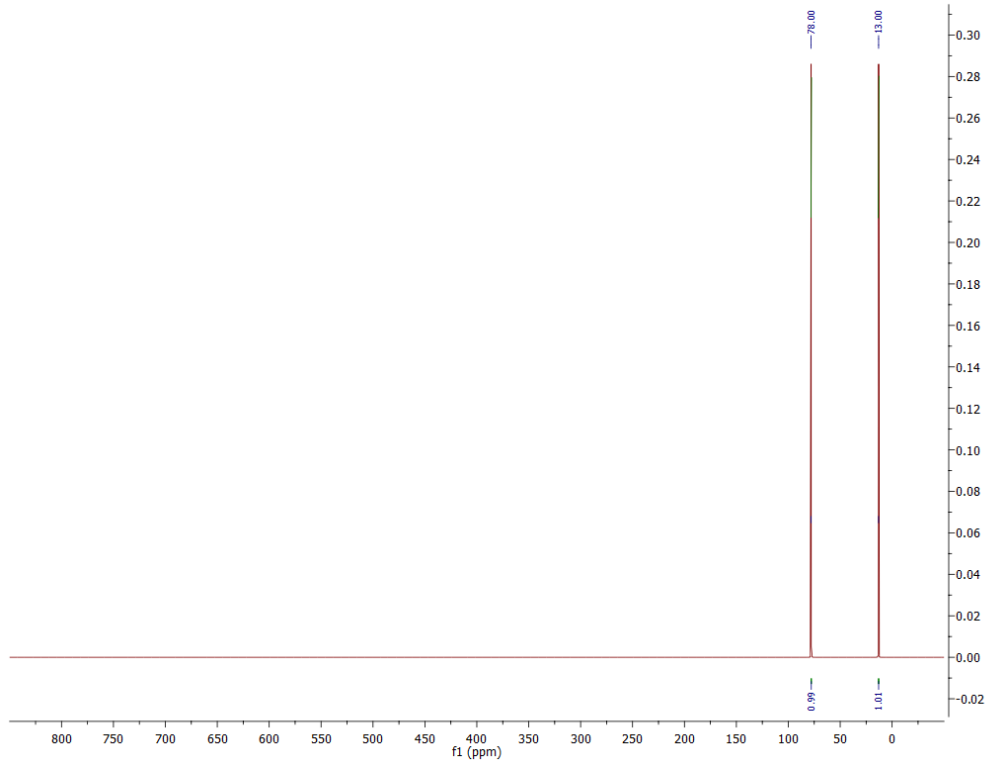
Слика ДМ206. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RD3**.



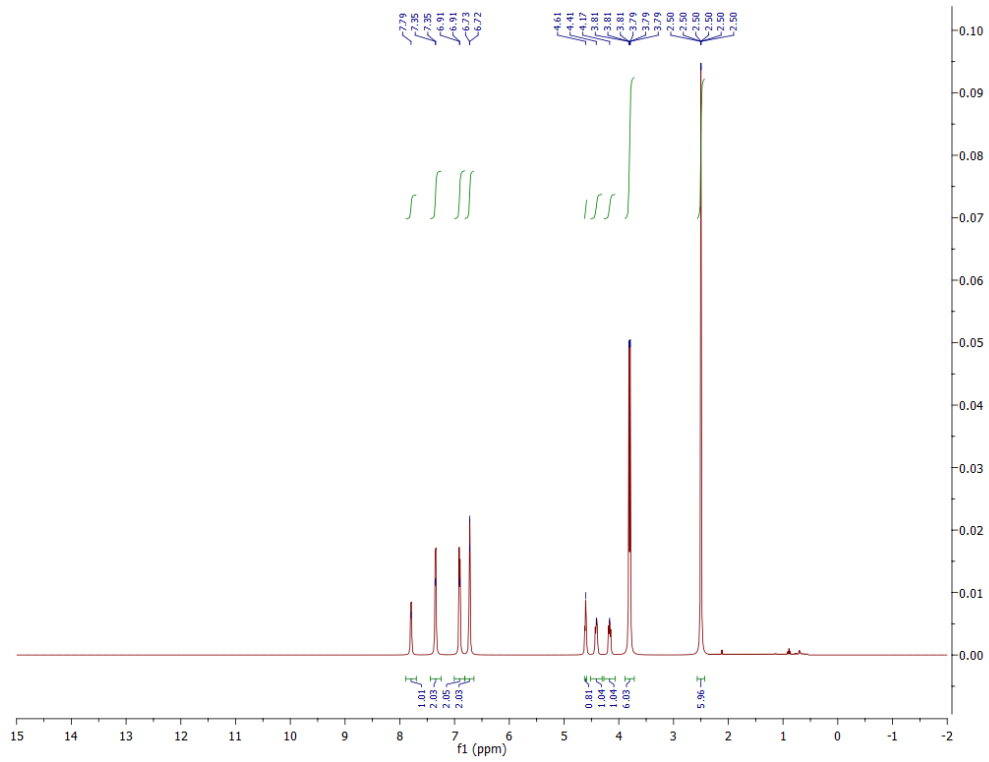
Слика ДМ207. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RD3**.



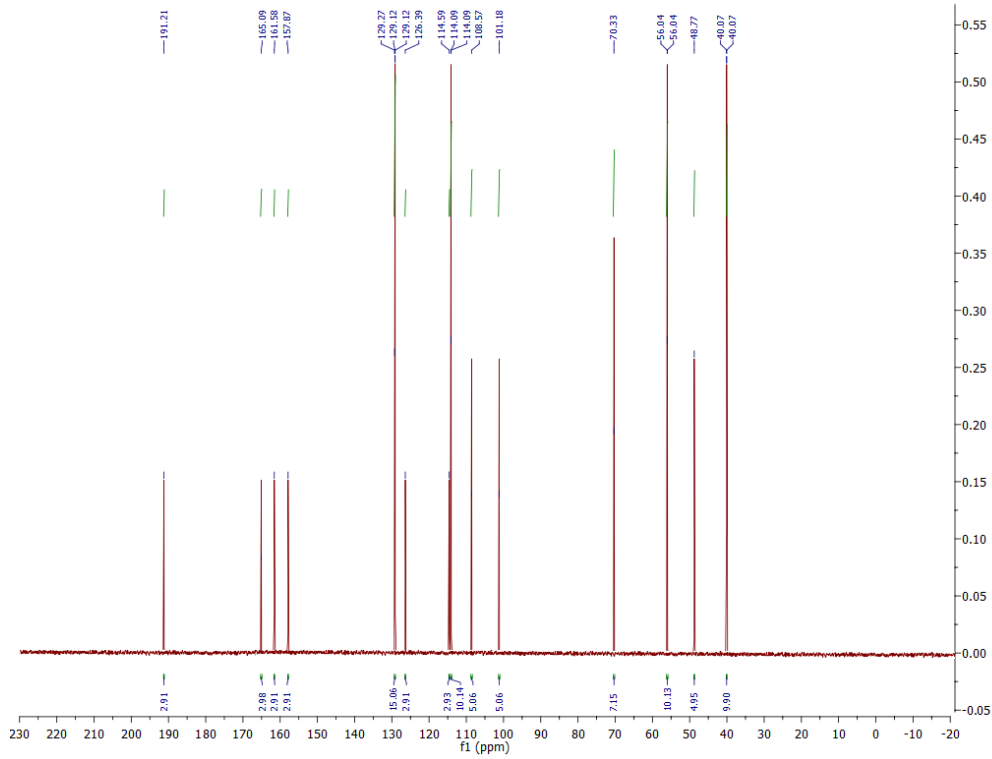
Слика ДМ208. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-RD3**.



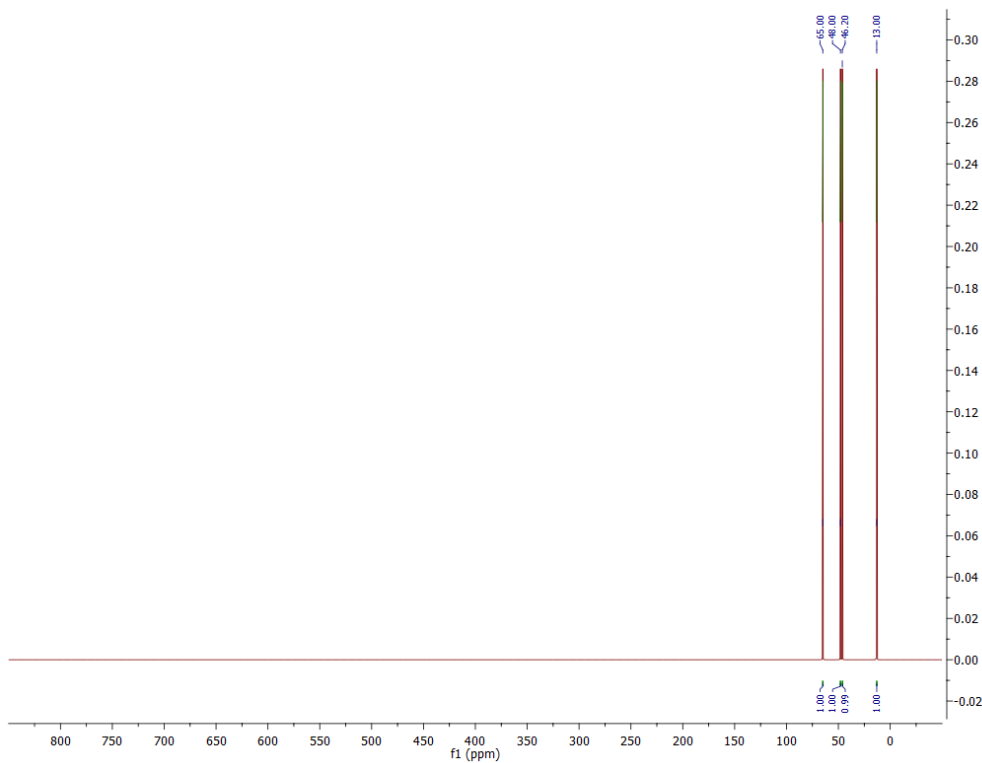
Слика ДМ209. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RD3**.



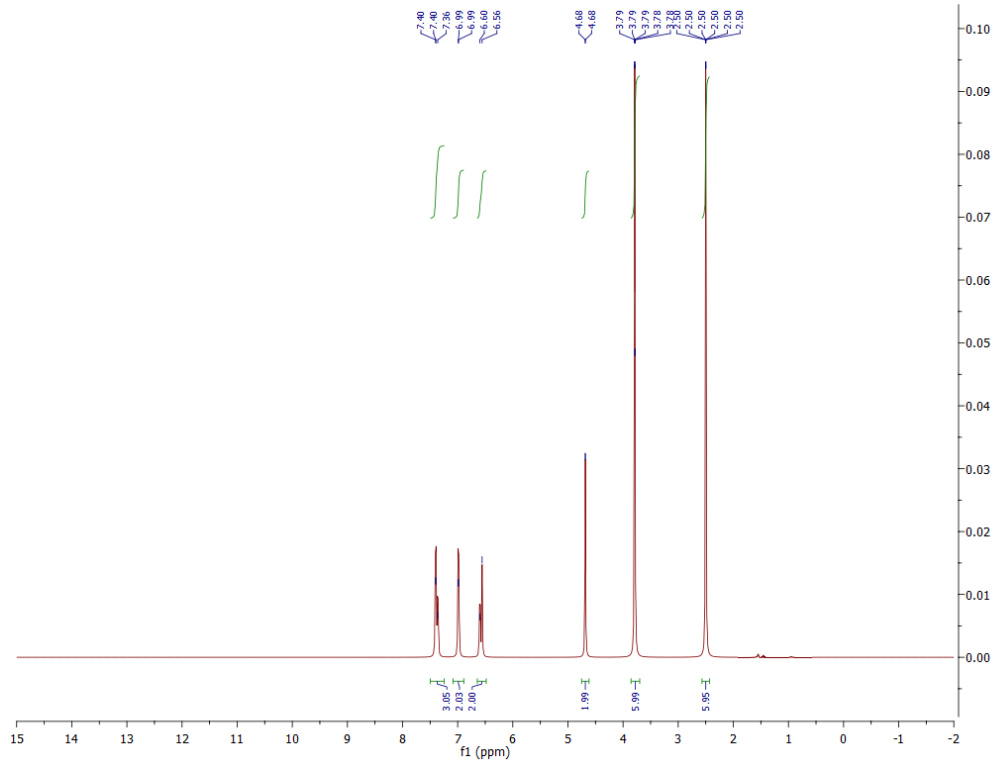
Слика ДМ210. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-D1**.



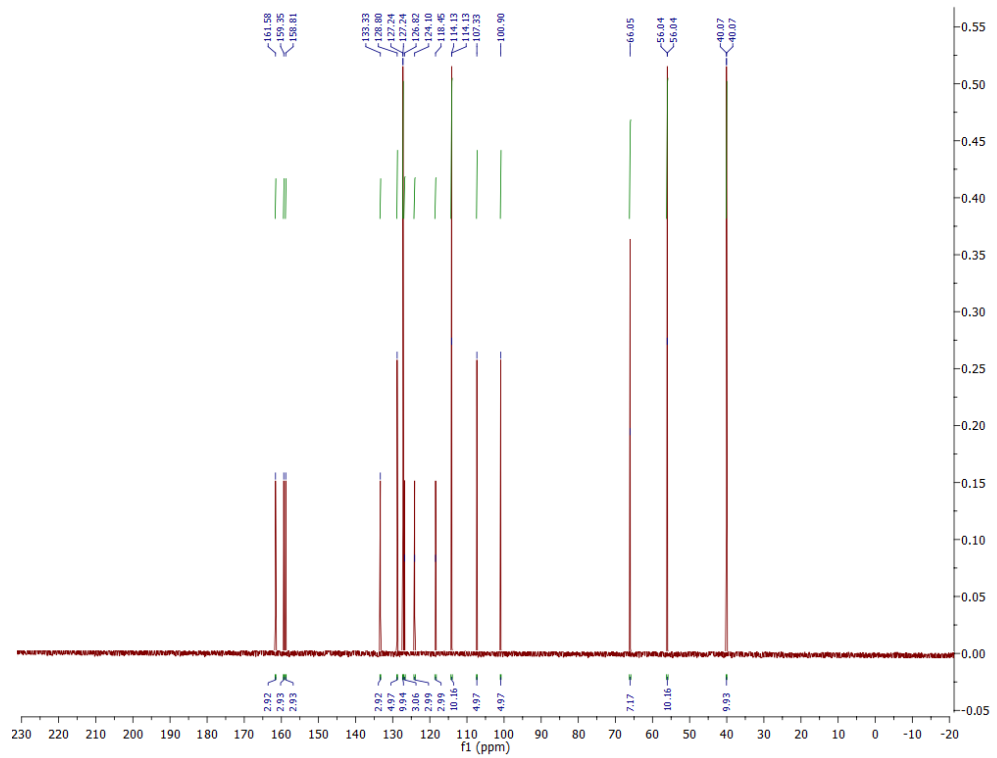
Слика ДМ211. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-D1**.



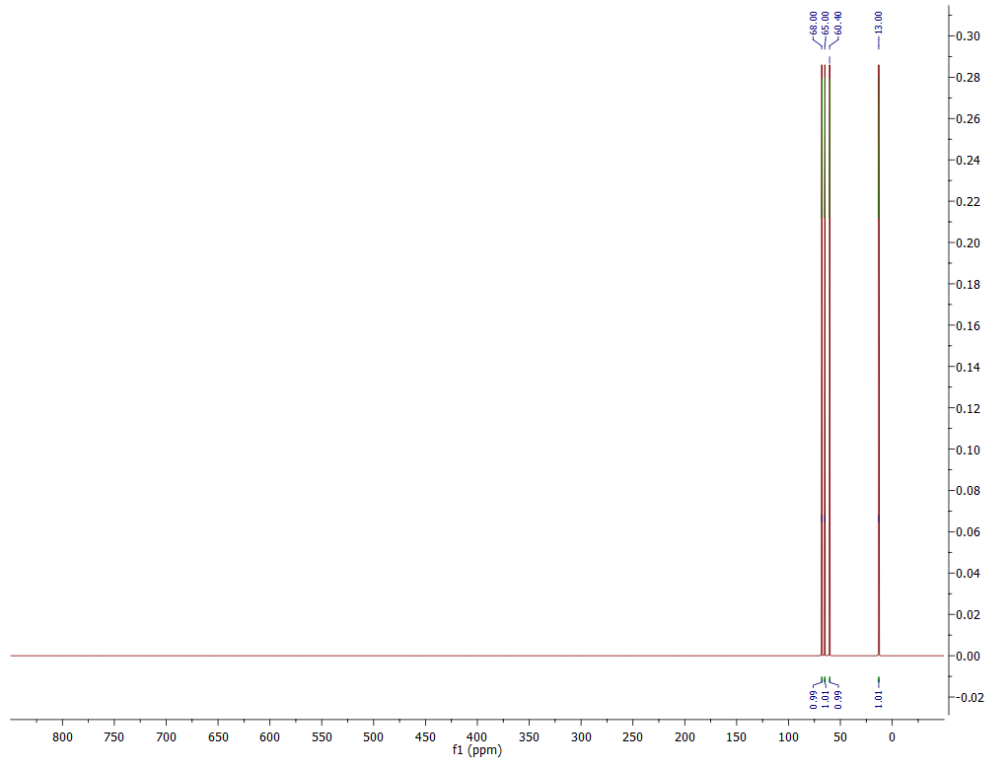
Слика ДМ212. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-D1**.



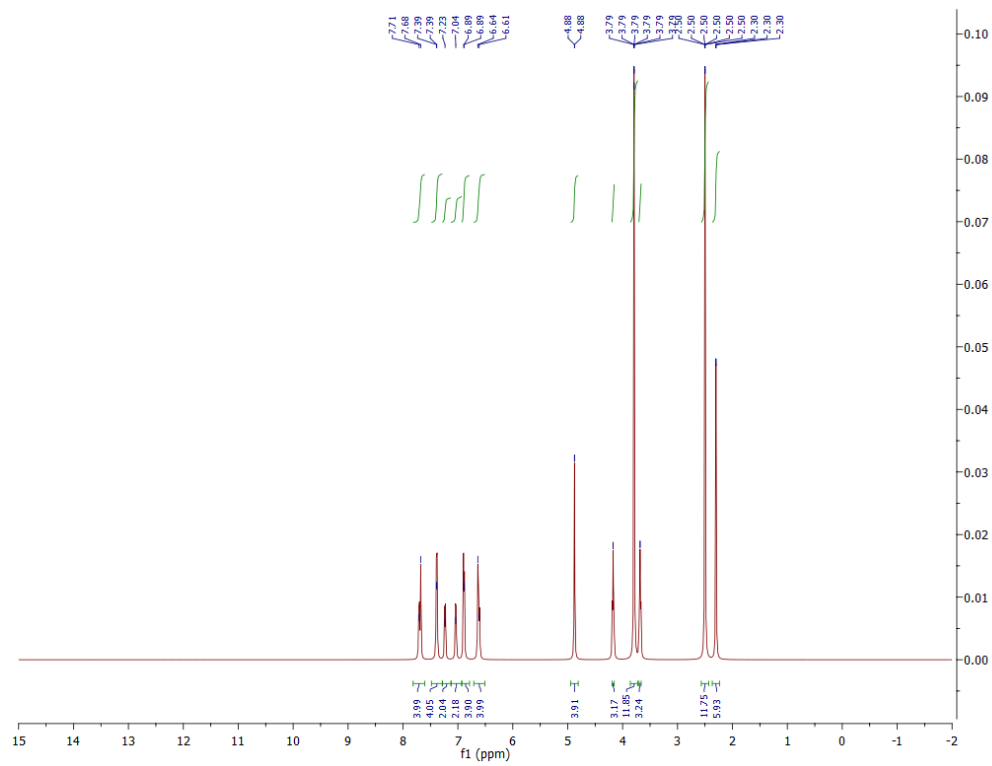
Слика ДМ213. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-D2**.



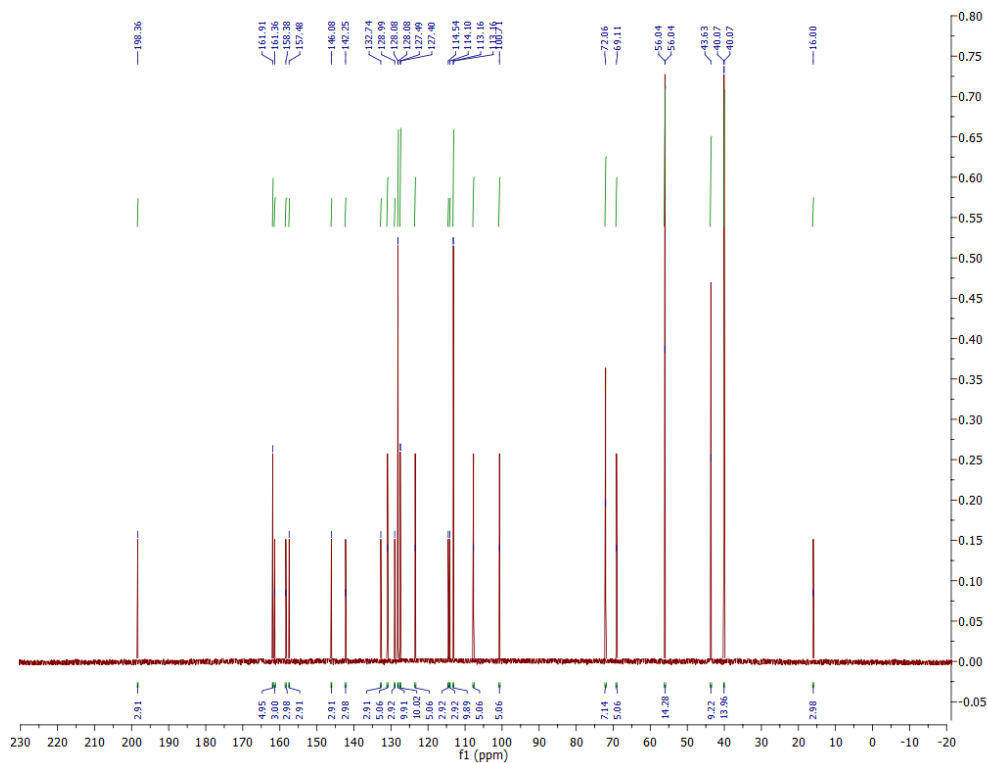
Слика ДМ214. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-D2**.



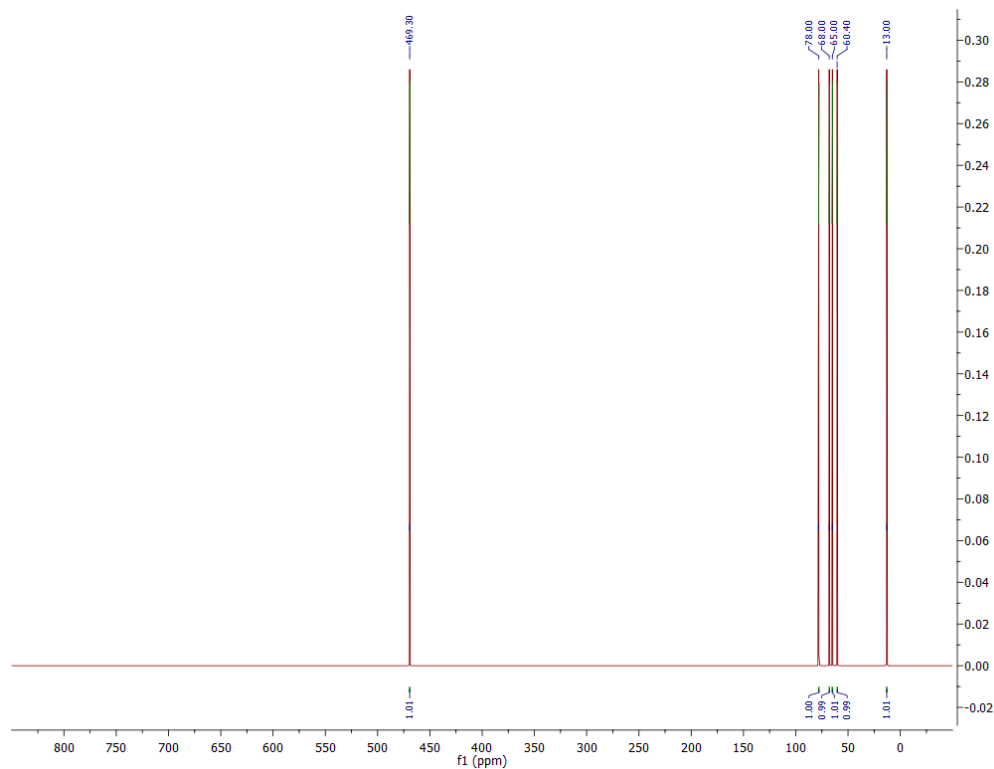
Слика ДМ215. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-D2**.



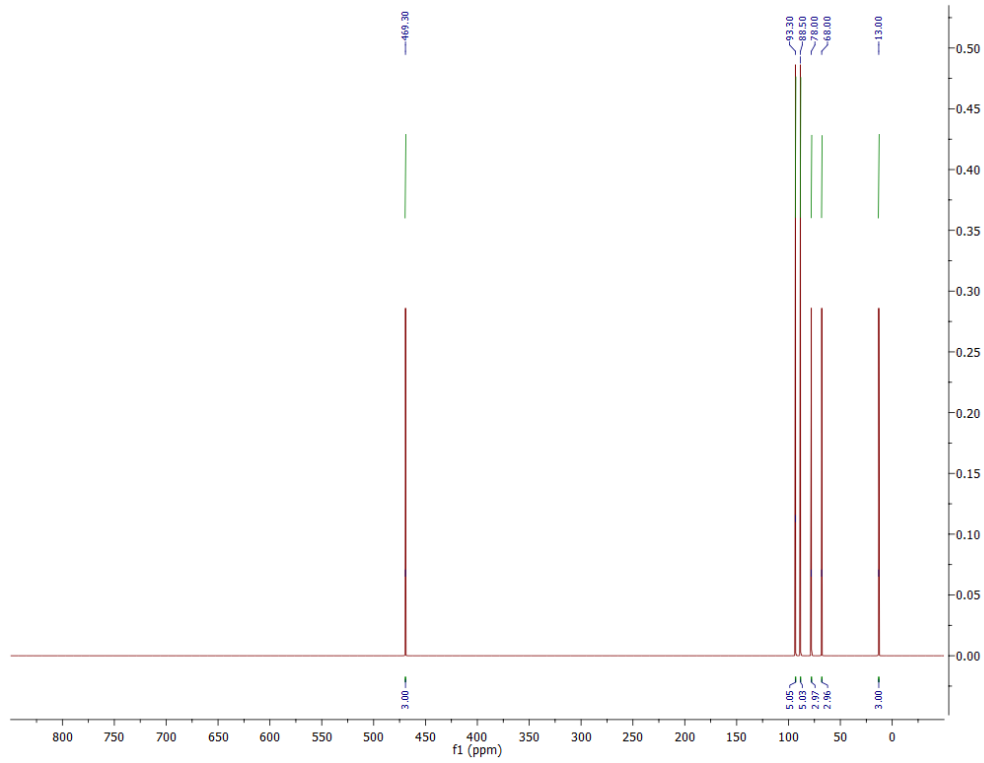
Слика ДМ216. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-D3**.



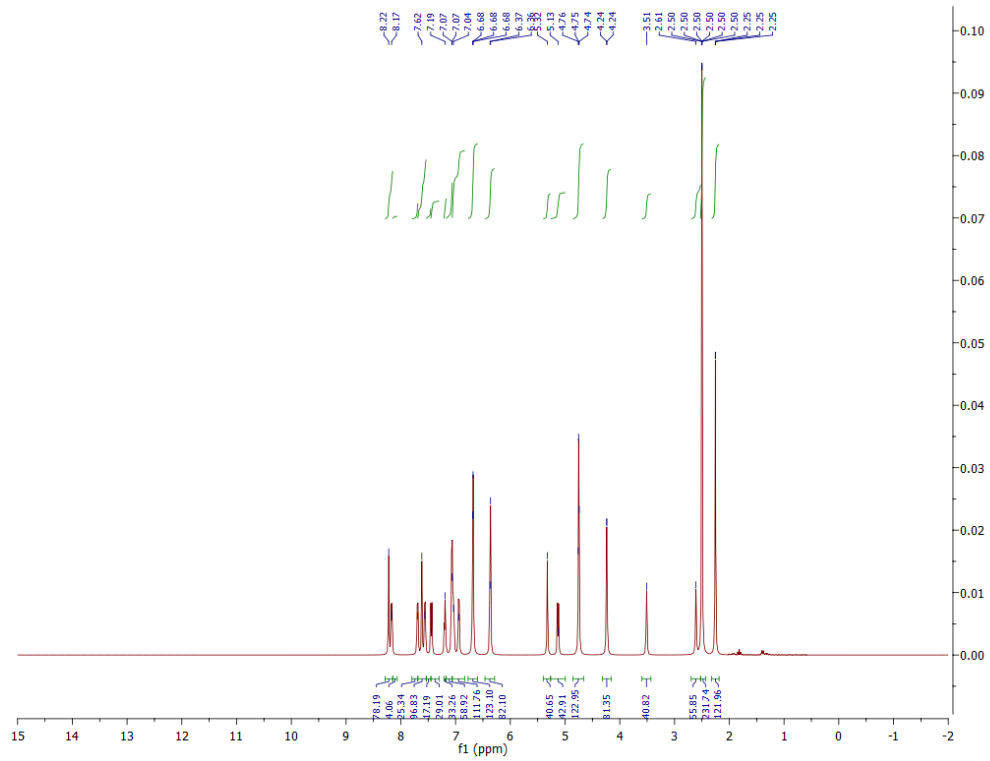
Слика ДМ217. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-D3**.



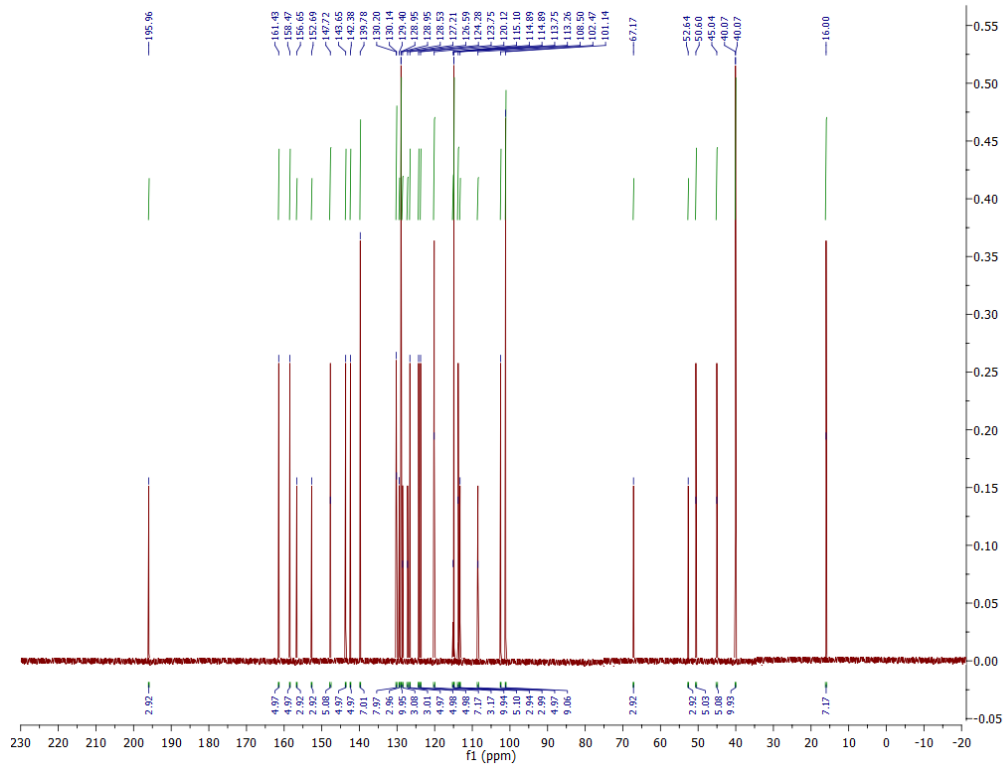
Слика ДМ218. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-D3**.



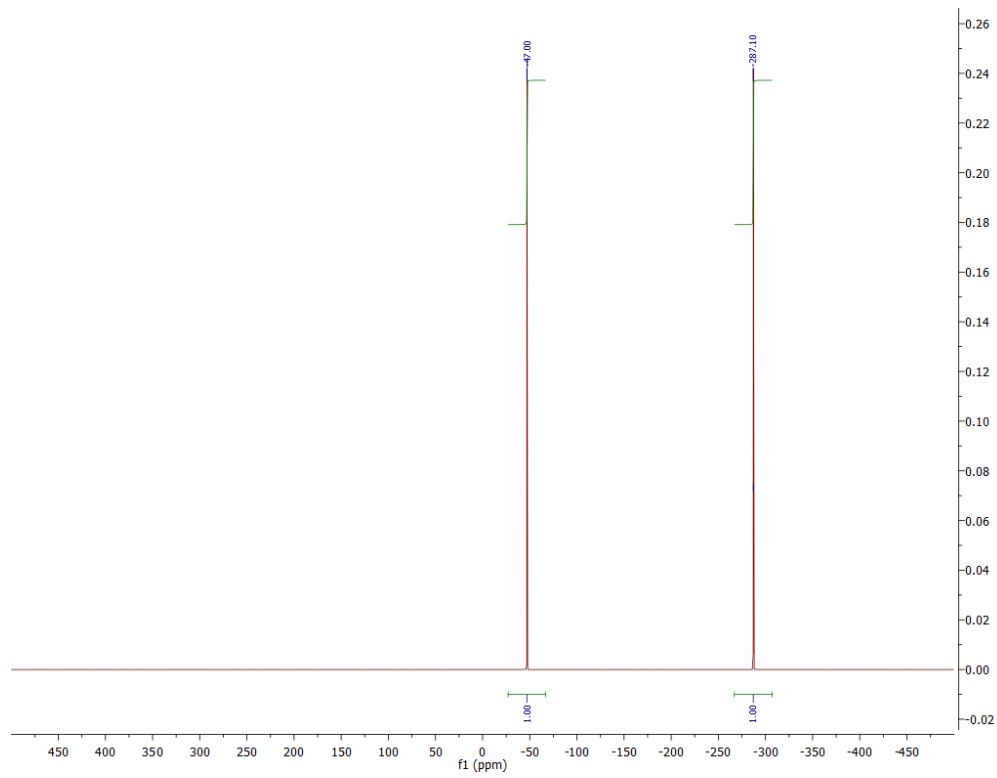
Слика ДМ221. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1d,2d**.



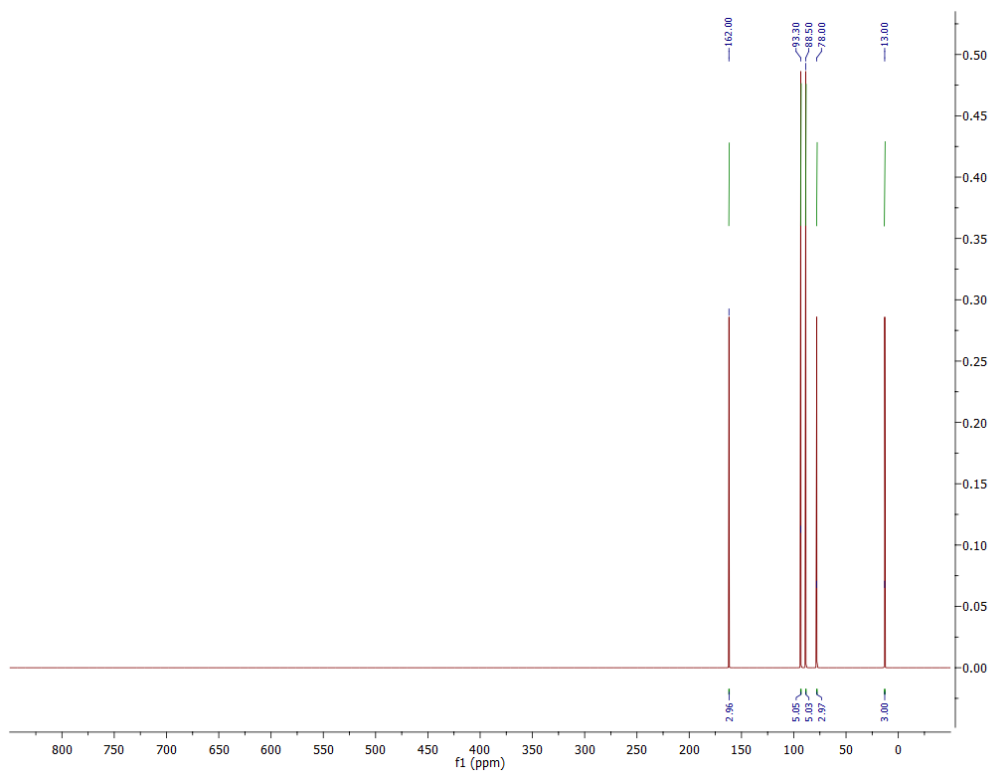
Слика ДМ222. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-1d**.



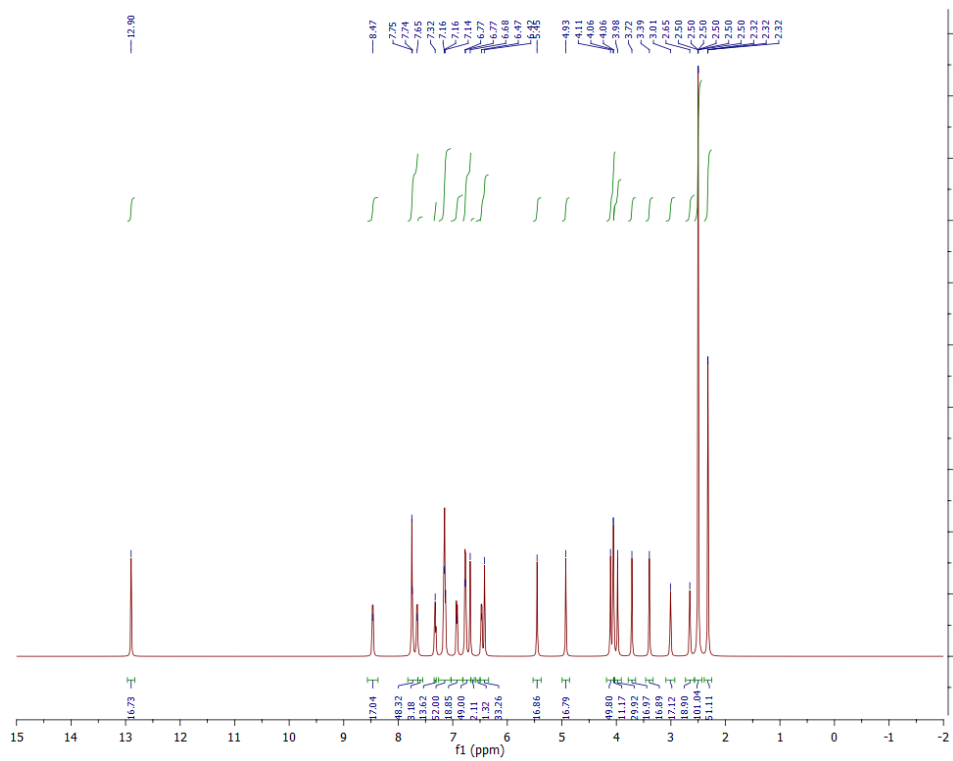
Слика ДМ223. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-1d**.



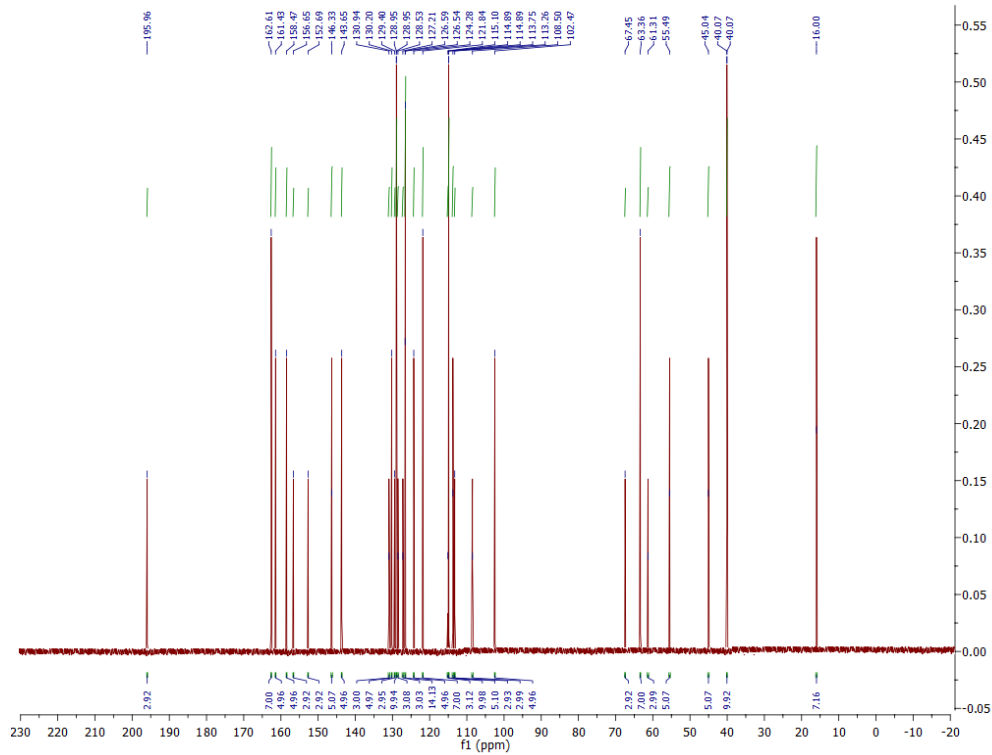
Слика ДМ224. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1d**.



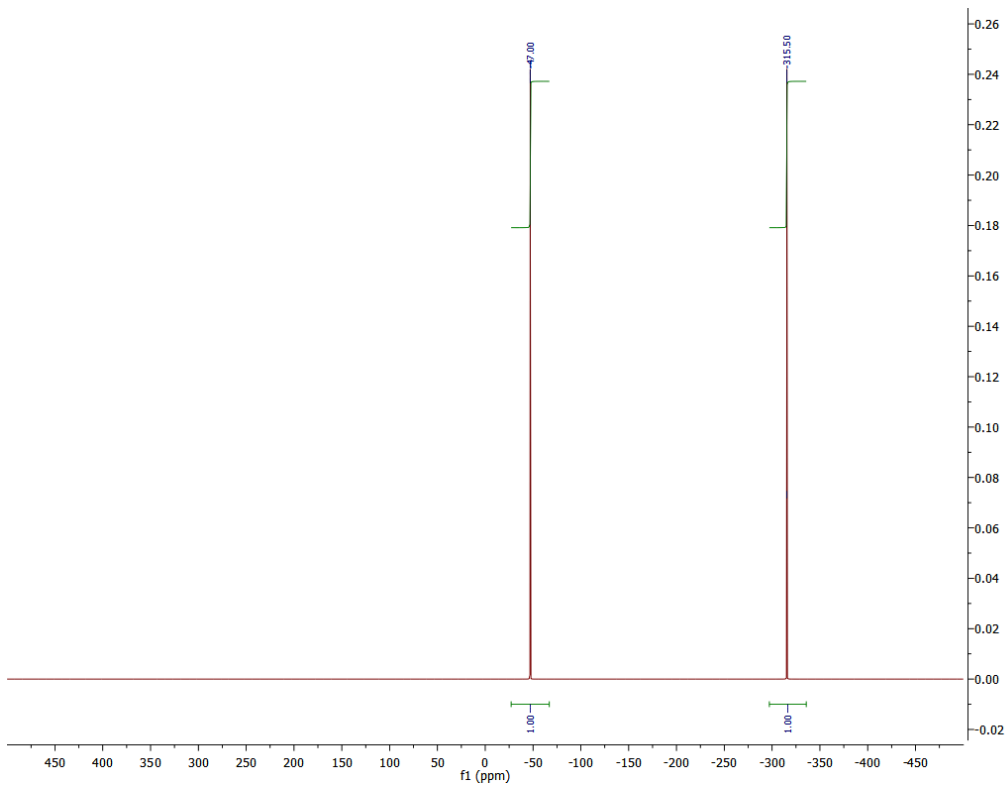
Слика ДМ225. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1d**.



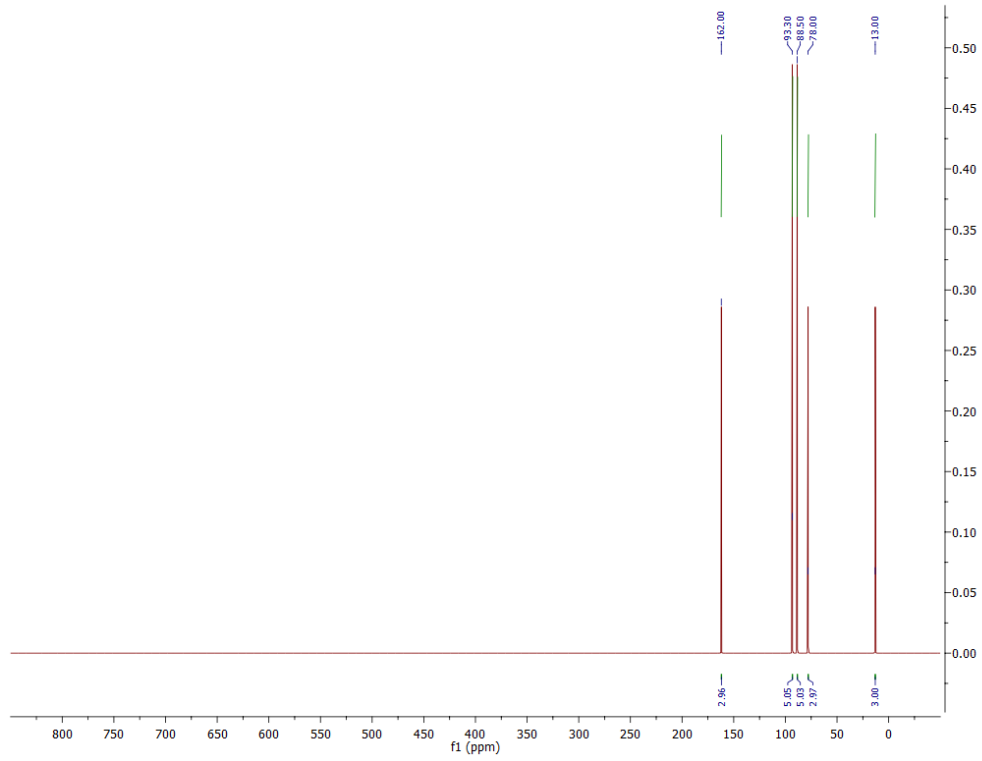
Слика ДМ226. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-2d**.



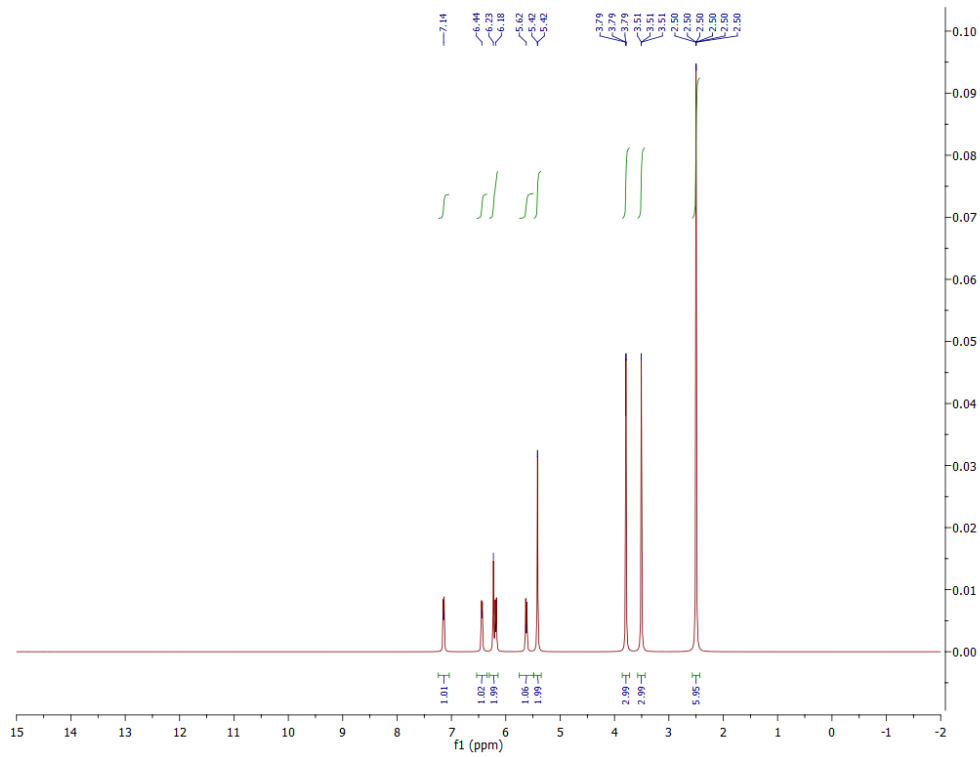
Слика ДМ227. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-2d**.



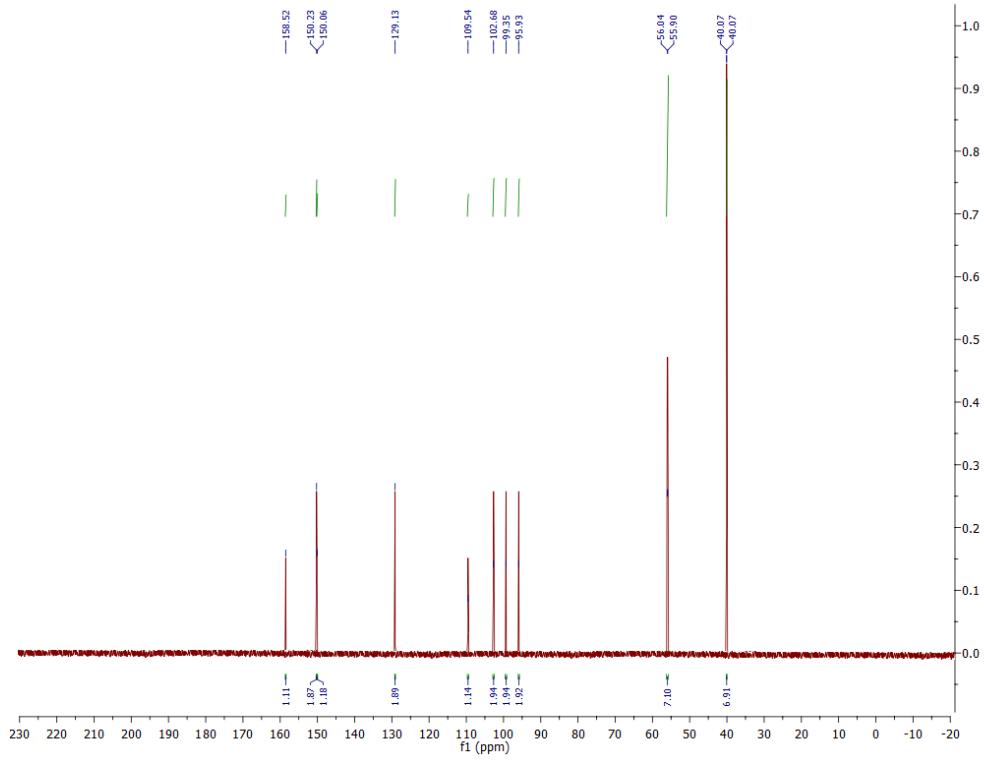
Слика ДМ228. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-2d**.



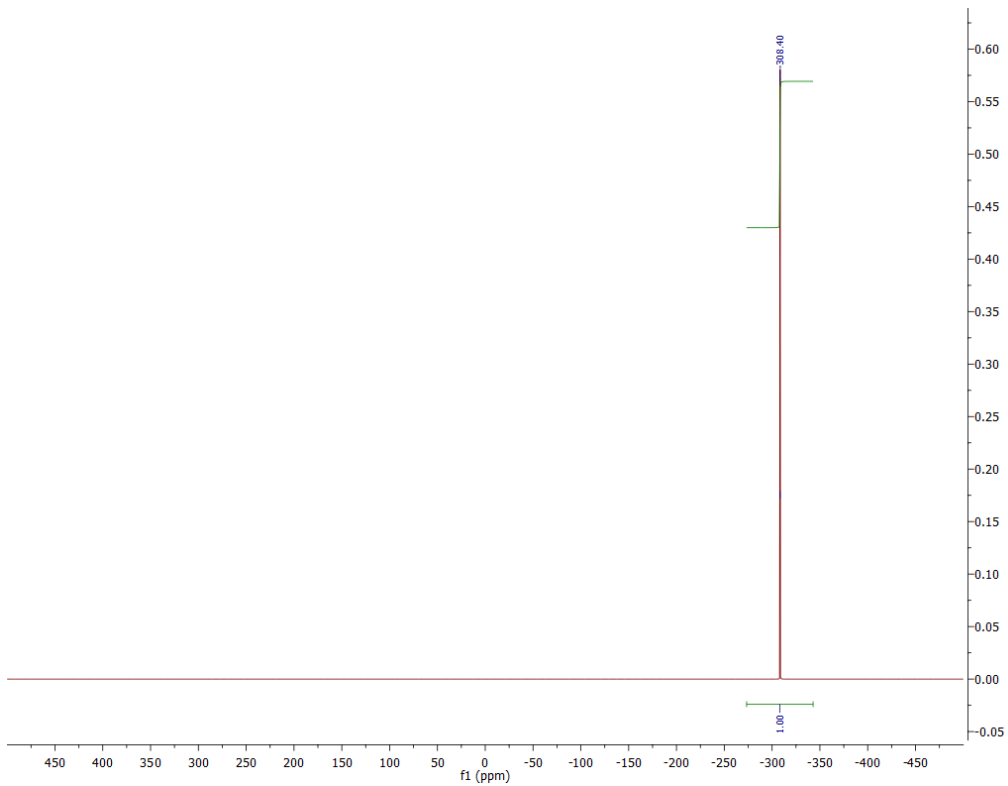
Слика ДМ229. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-2d**.



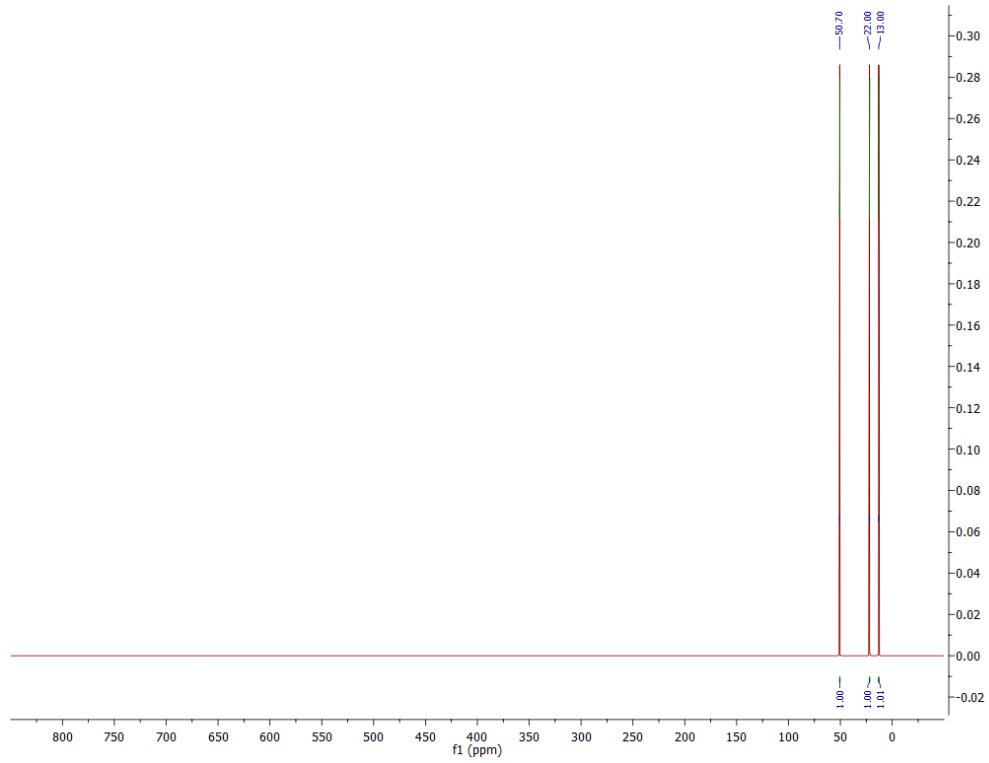
Слика ДМ230. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-E1**.



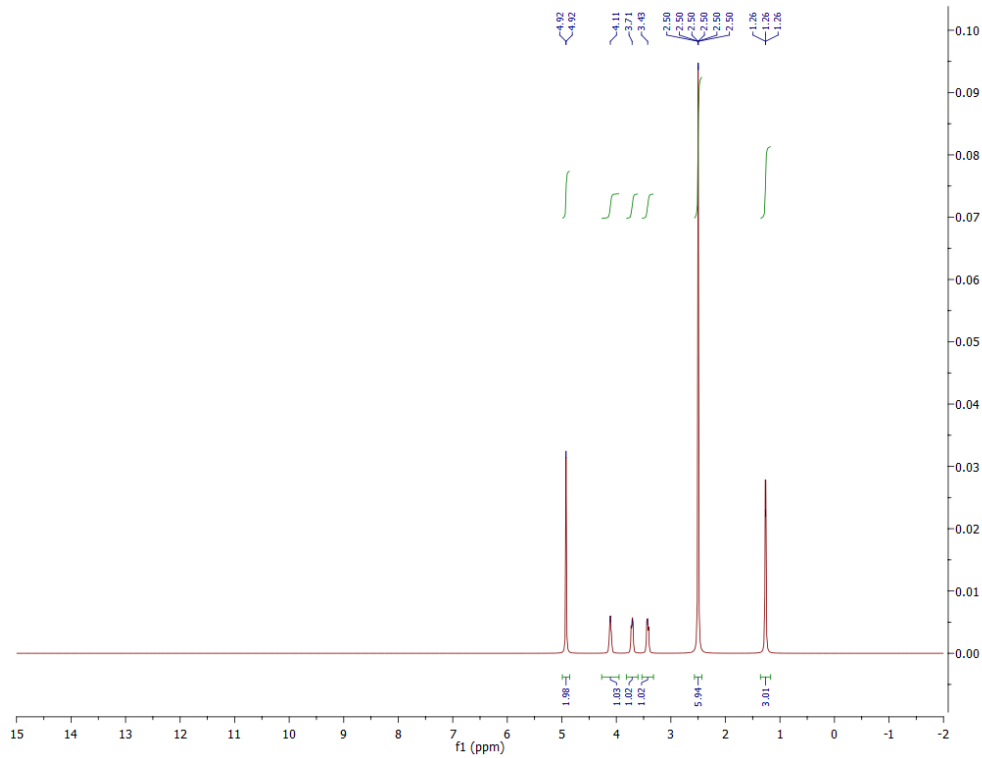
Слика ДМ231. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-E1**.



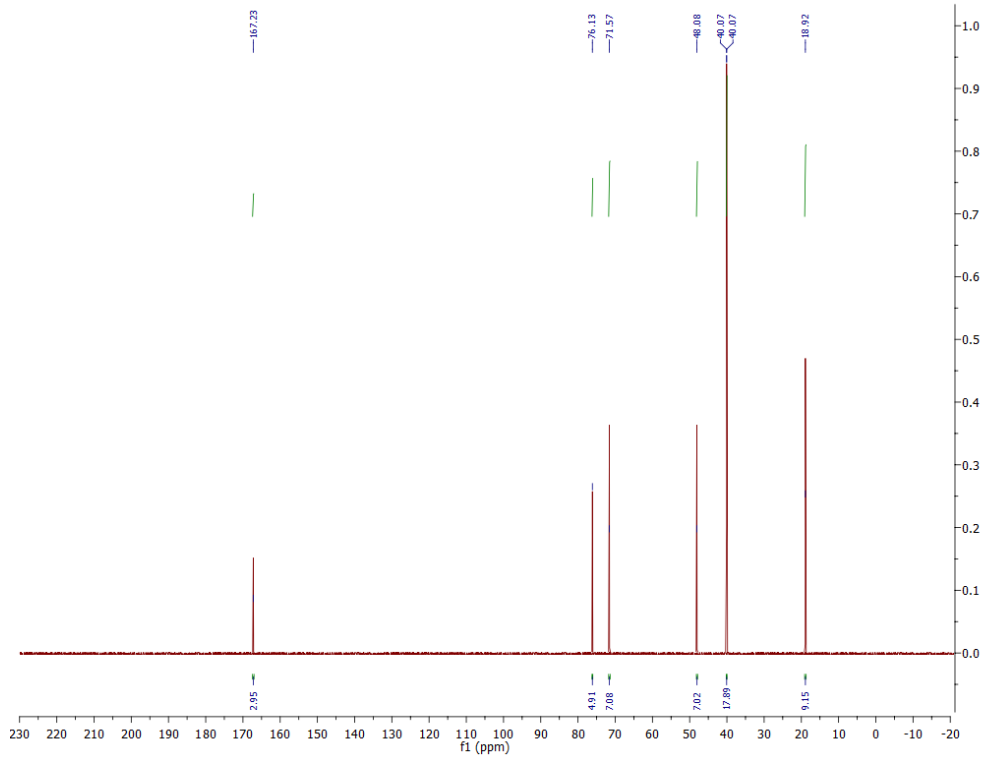
Слика ДМ232. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-E1**.



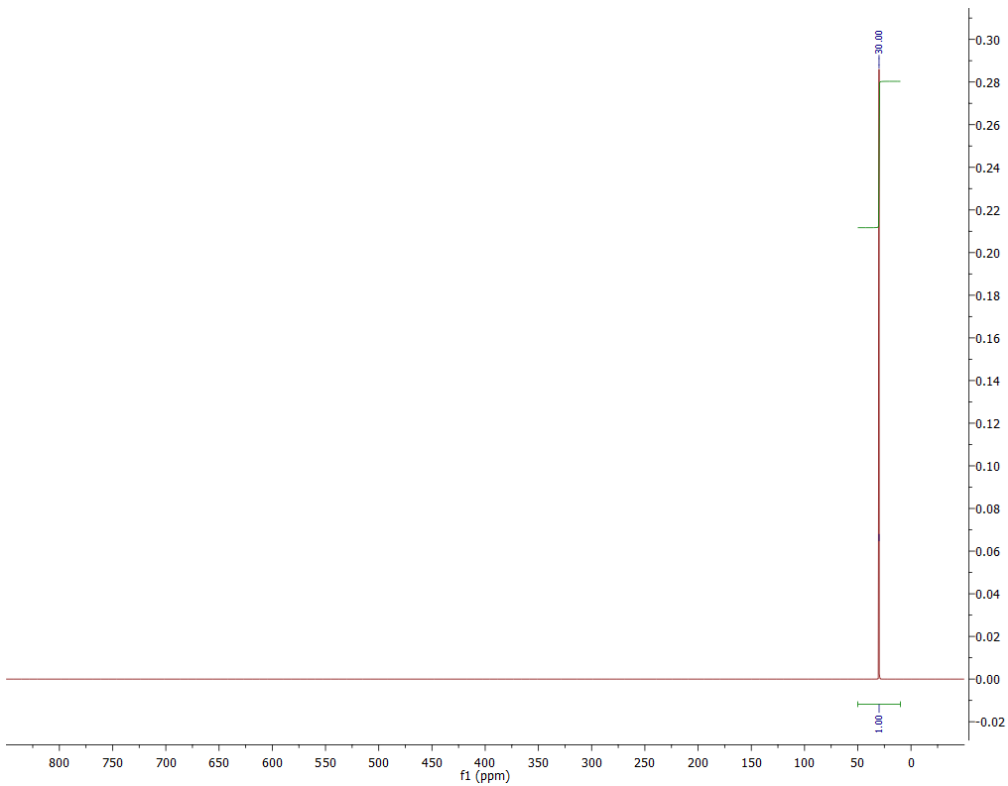
Слика ДМ233. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-E1**.



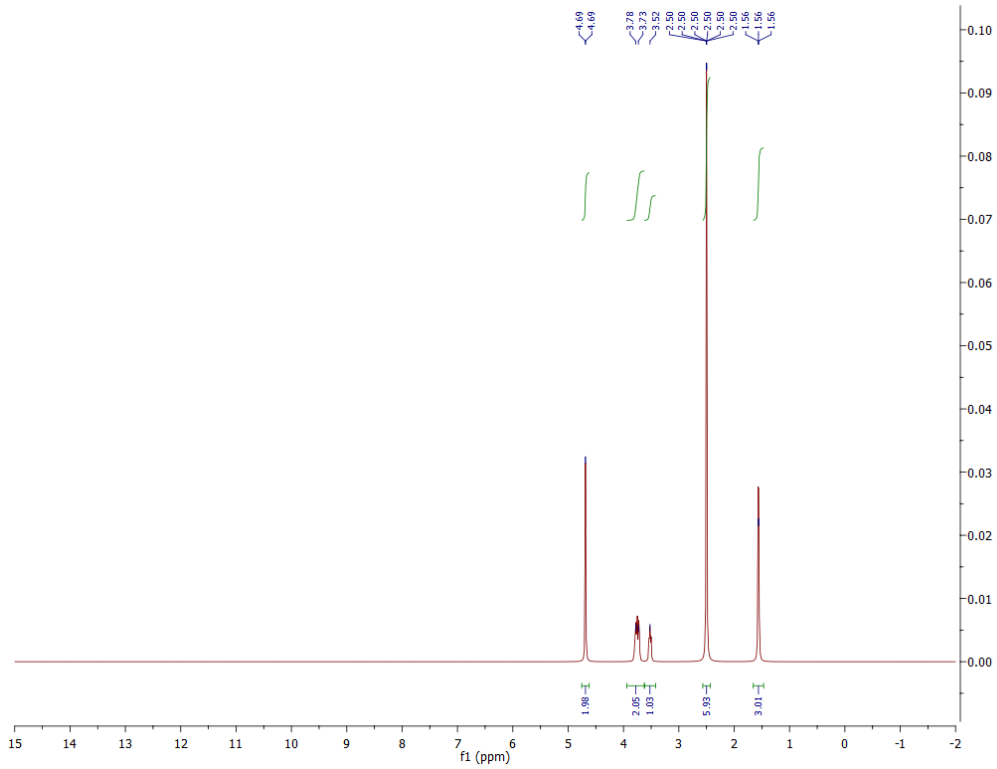
Слика ДМ234. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E**.



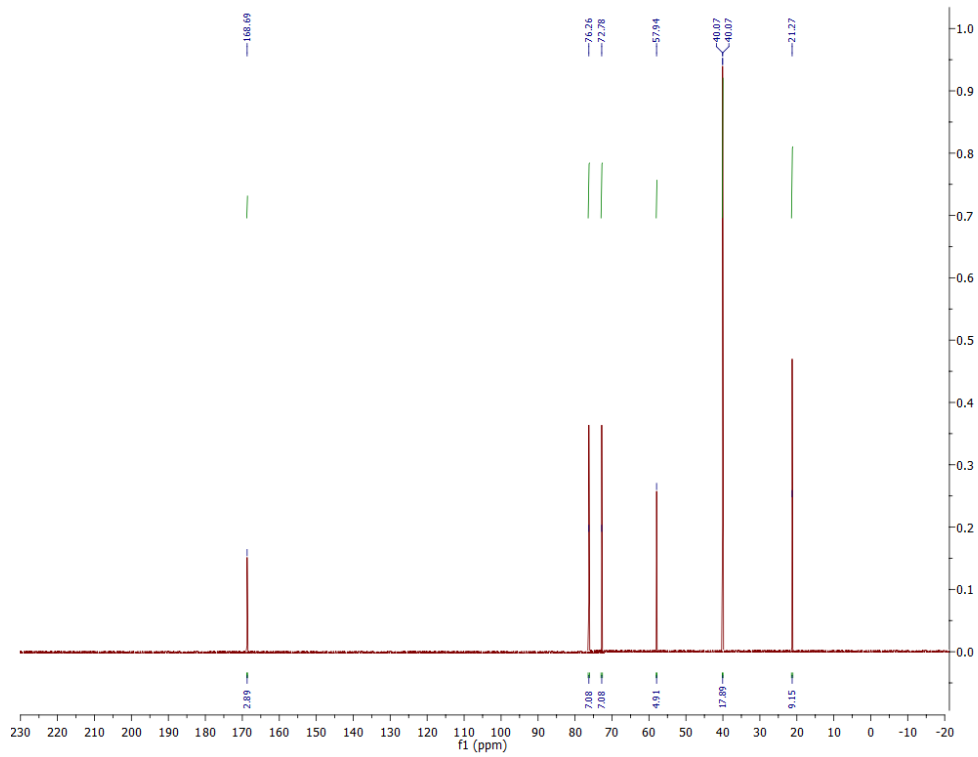
Слика ДМ235. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E**.



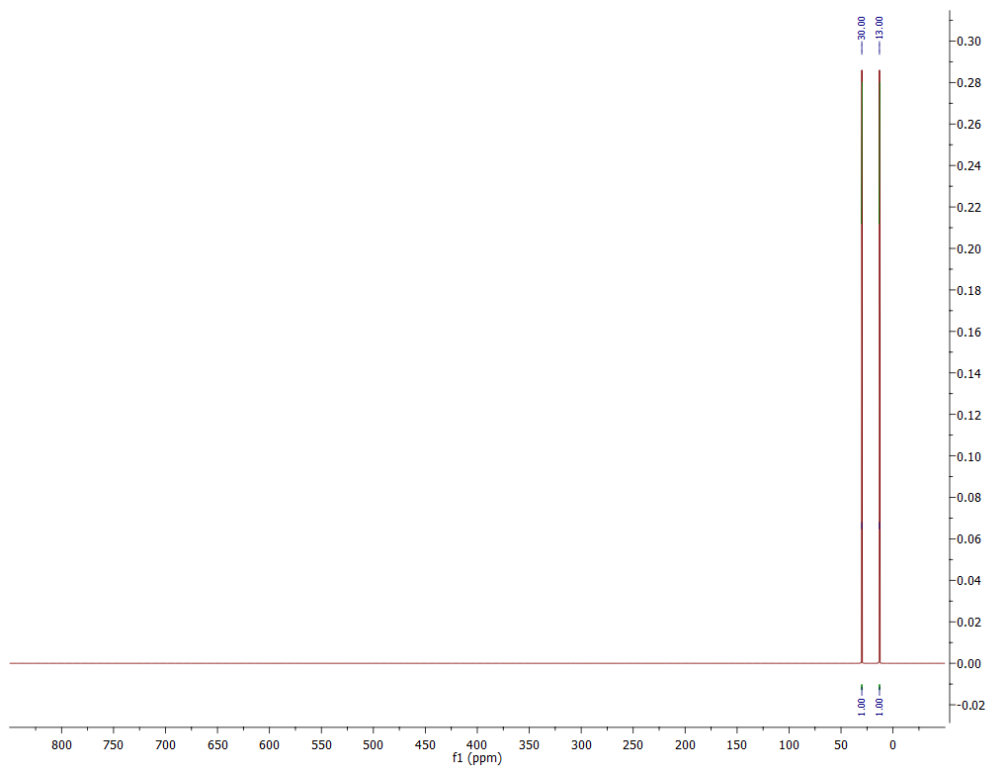
Слика ДМ236. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E**.



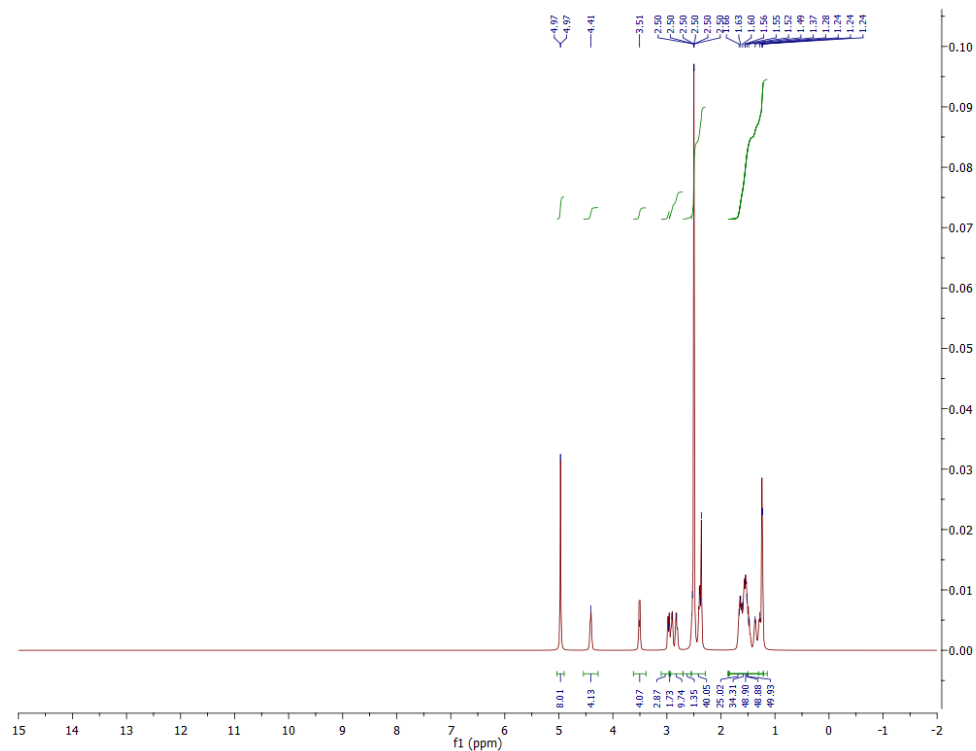
Слика ДМ237. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E***.



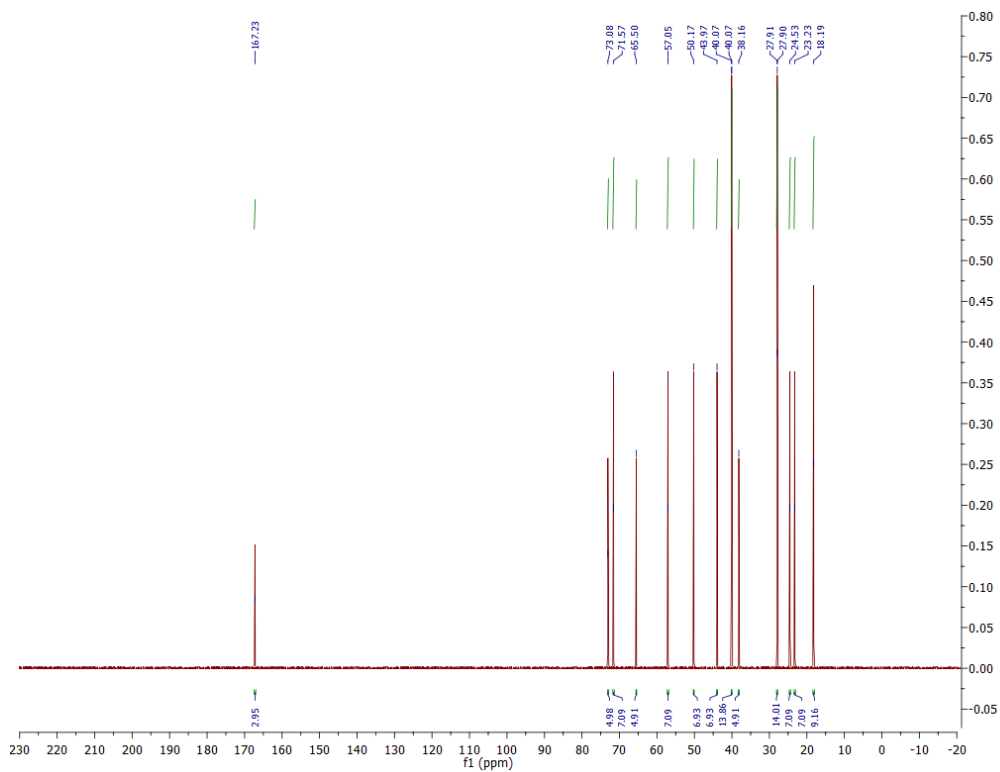
Слика ДМ238. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E***.



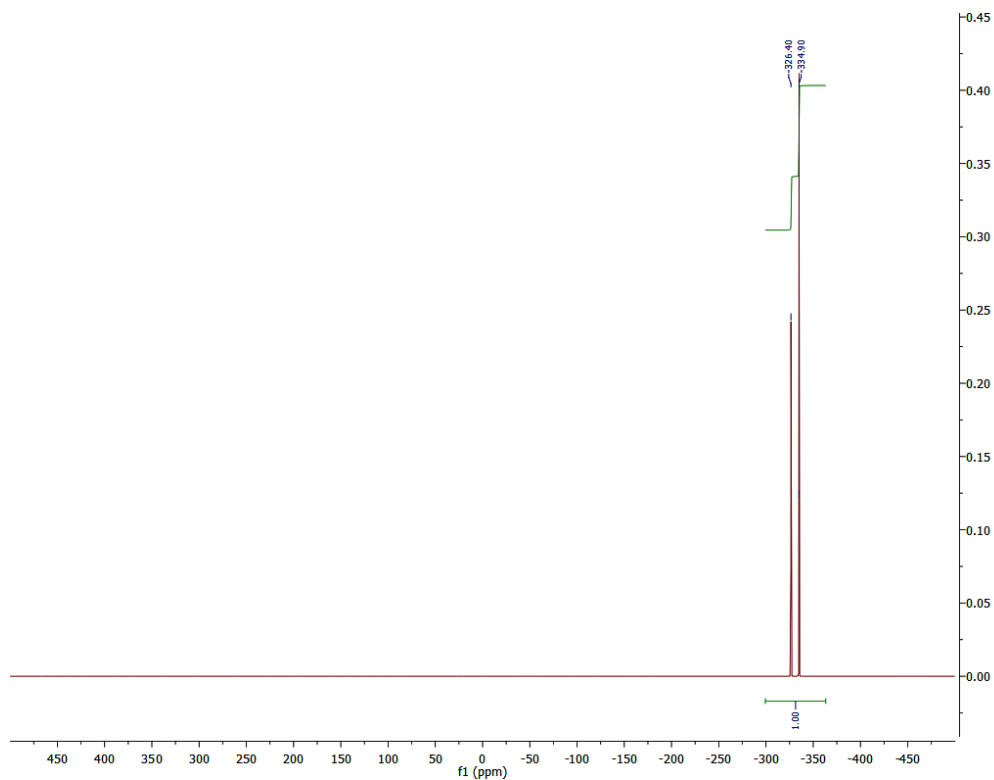
Слика ДМ239. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-RPro-1E***.



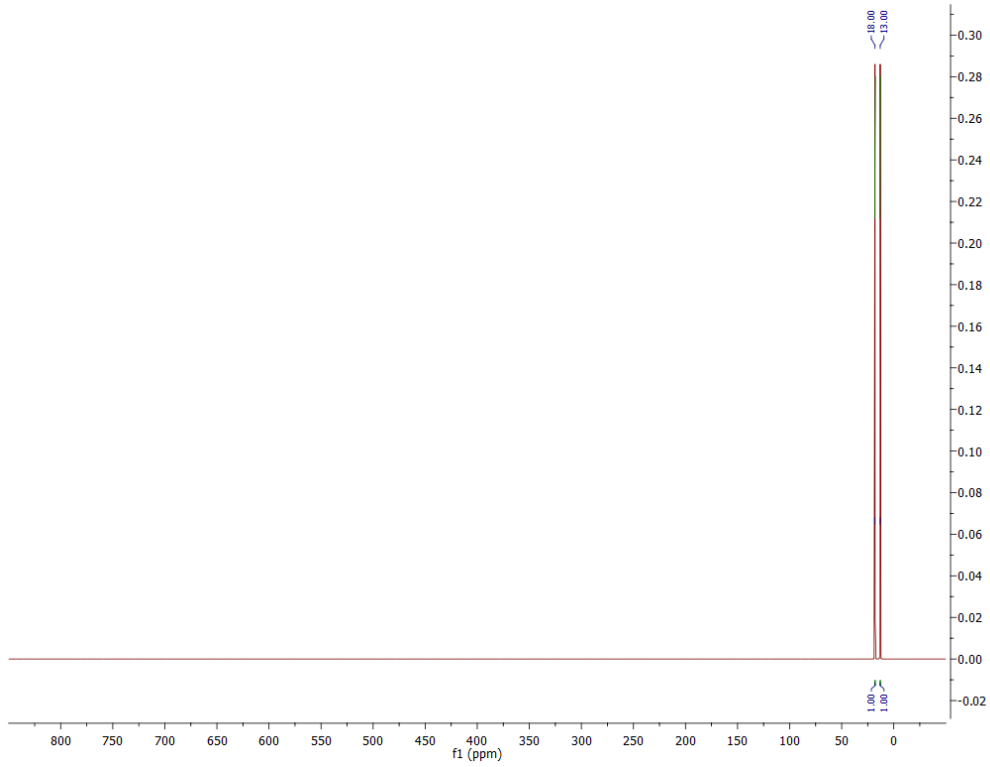
Слика ДМ240. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E**.



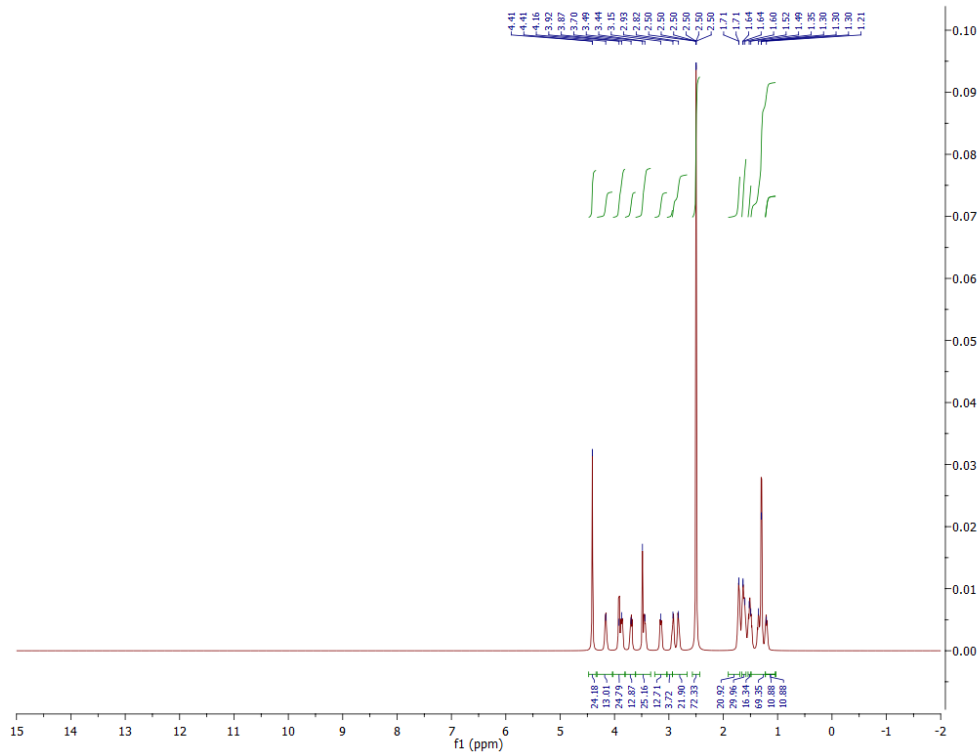
Слика ДМ241. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E**.



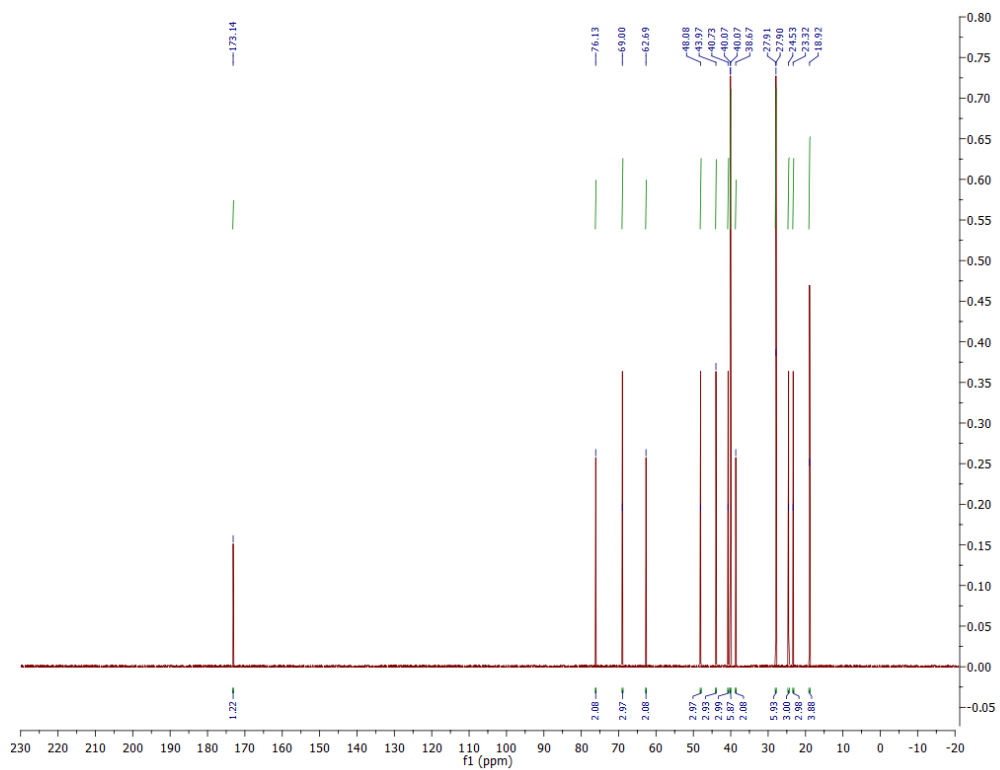
Слика ДМ242. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E**.



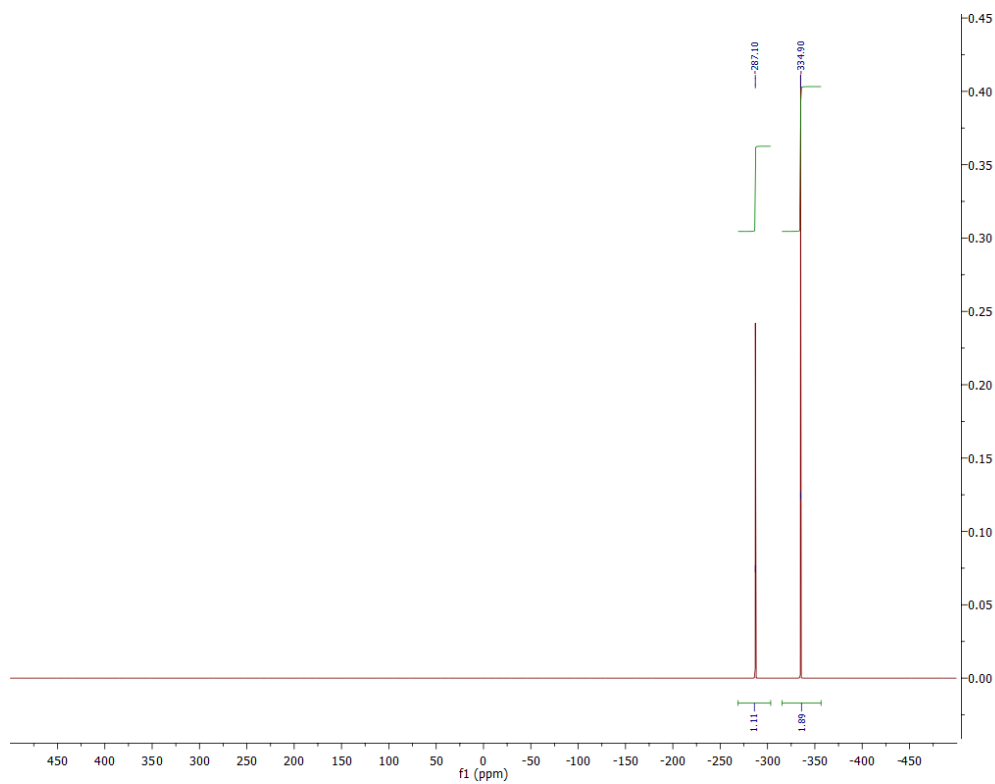
Слика ДМ243. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E**.



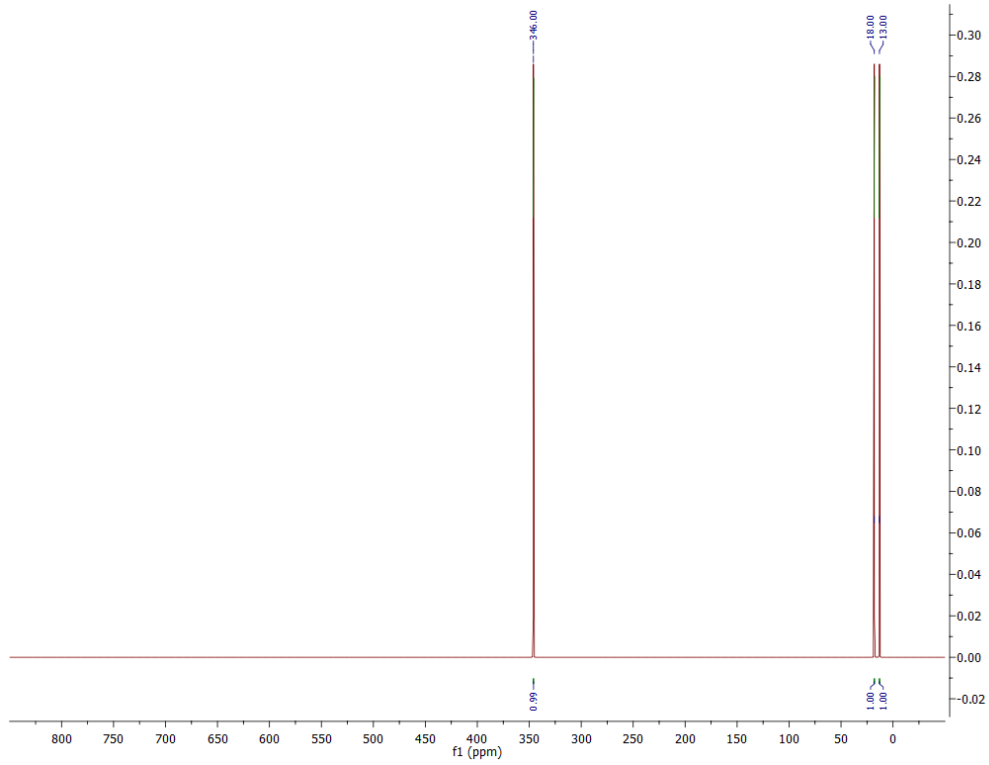
Слика ДМ244. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E***.



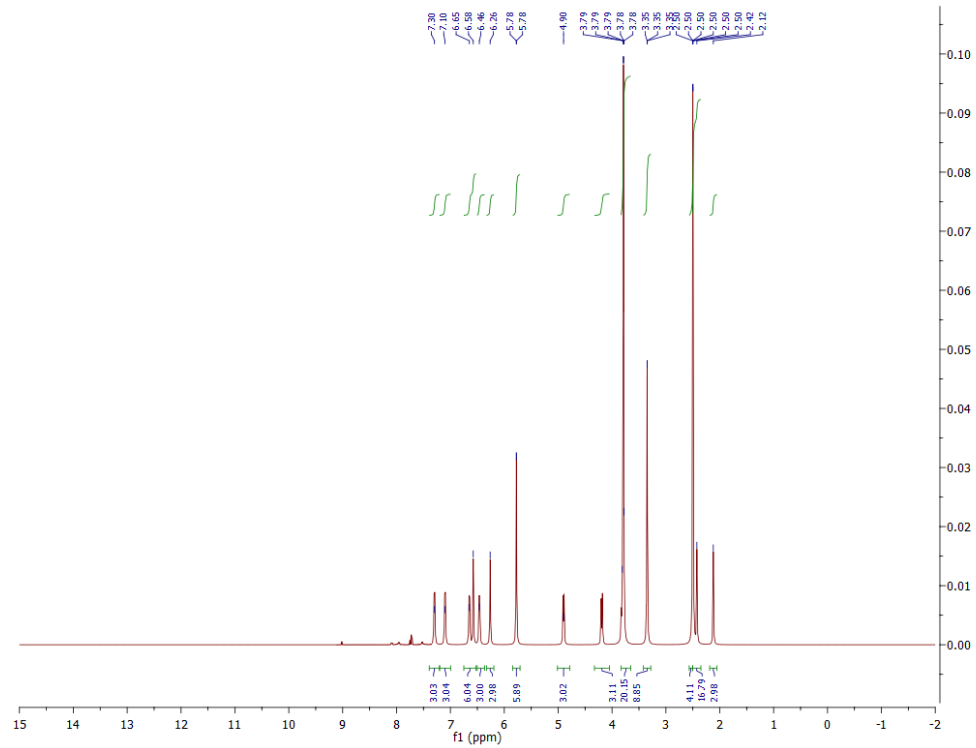
Слика ДМ245. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E***.



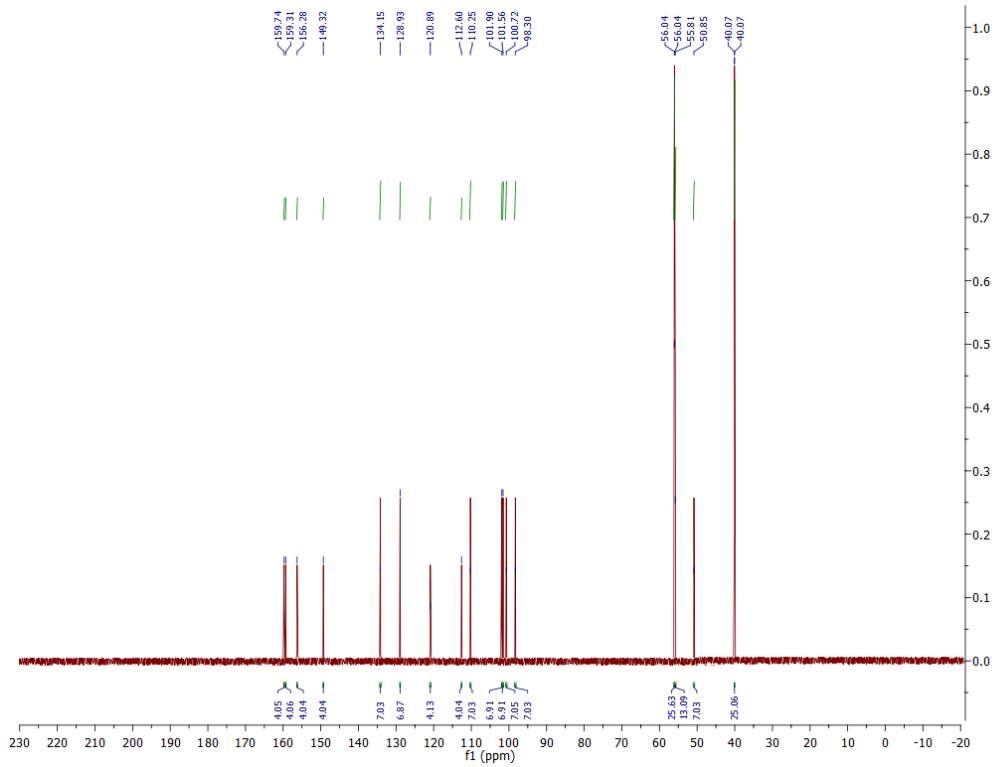
Слика ДМ246. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E***.



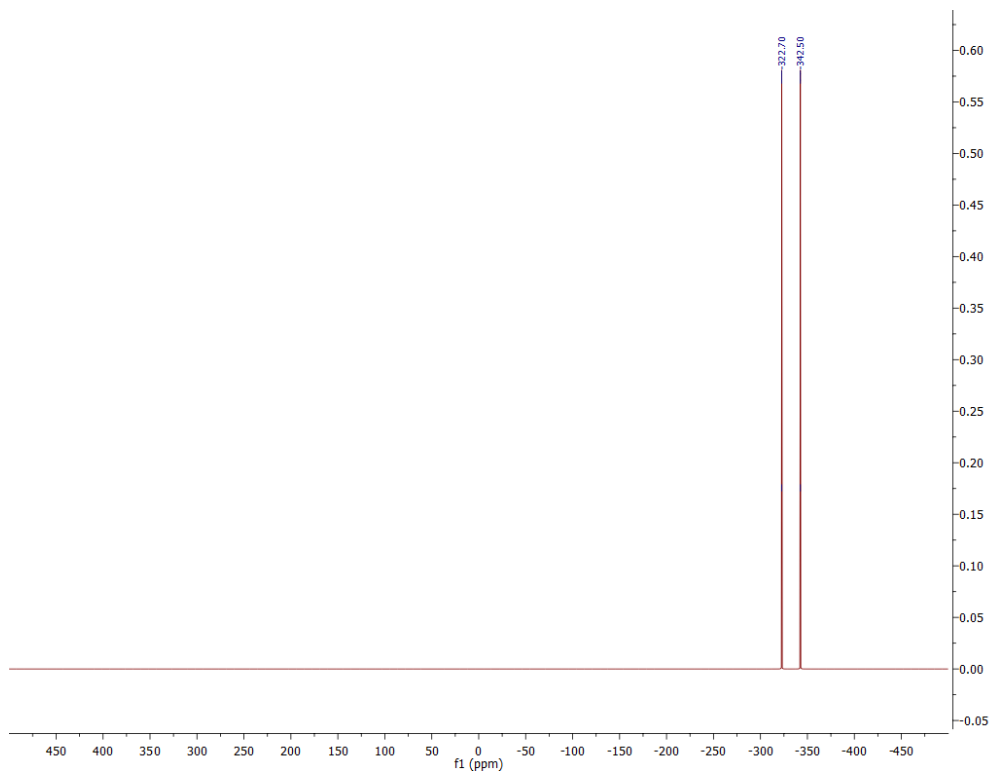
Слика ДМ247. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1E***.



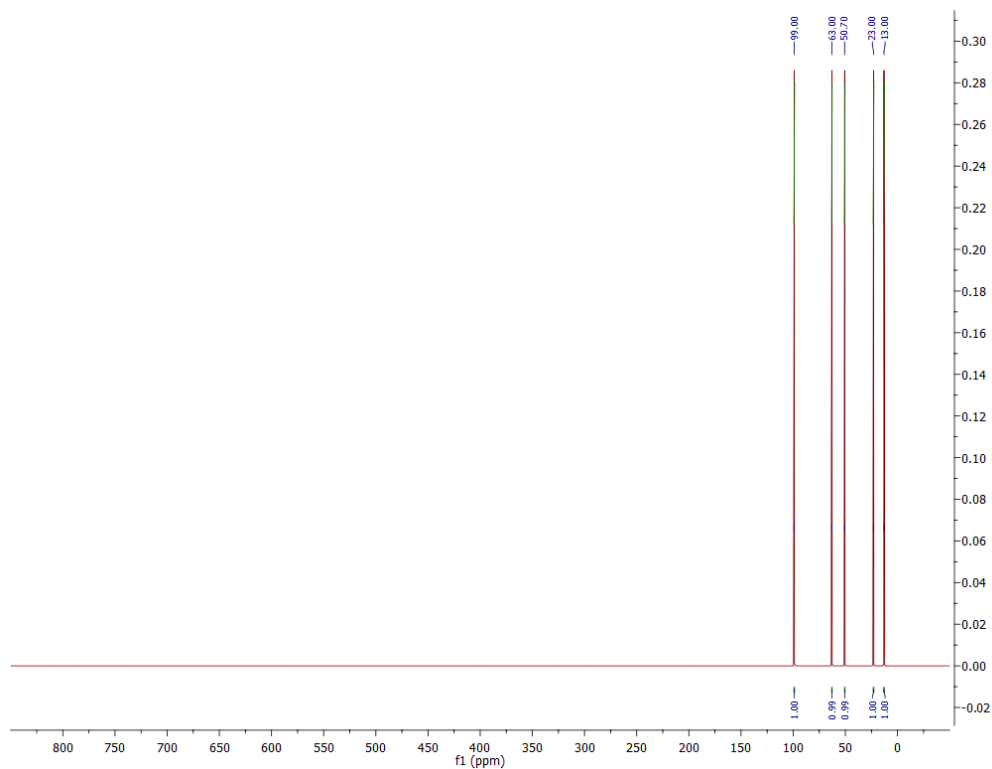
Слика ДМ248. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-E1**.



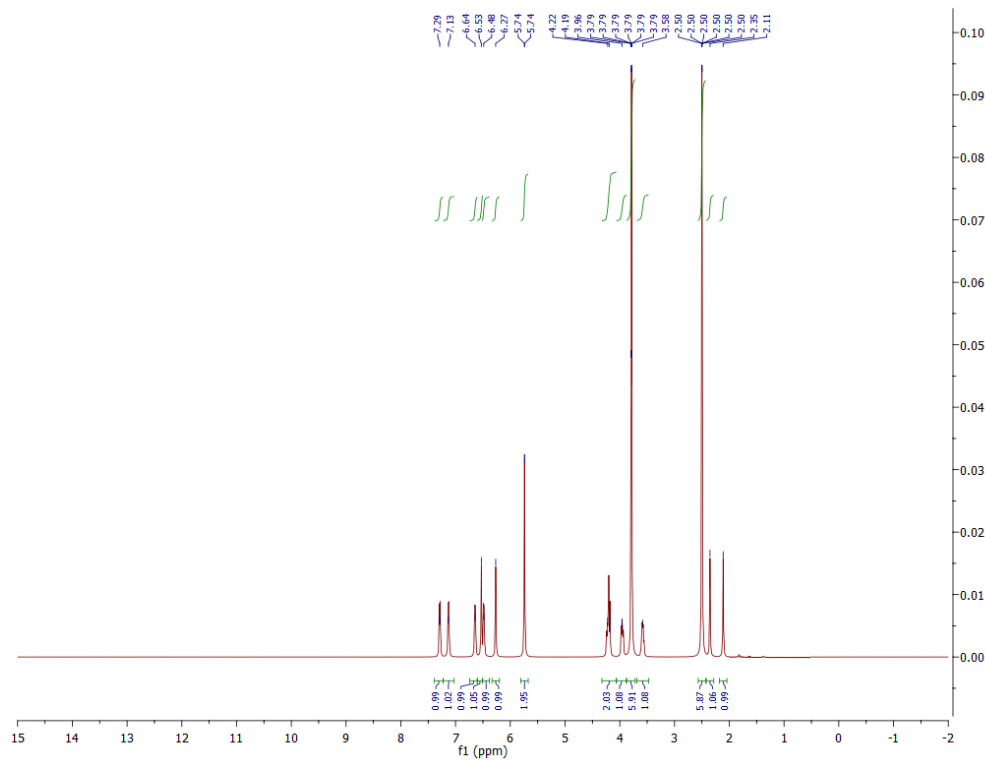
Слика ДМ249. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-E1.



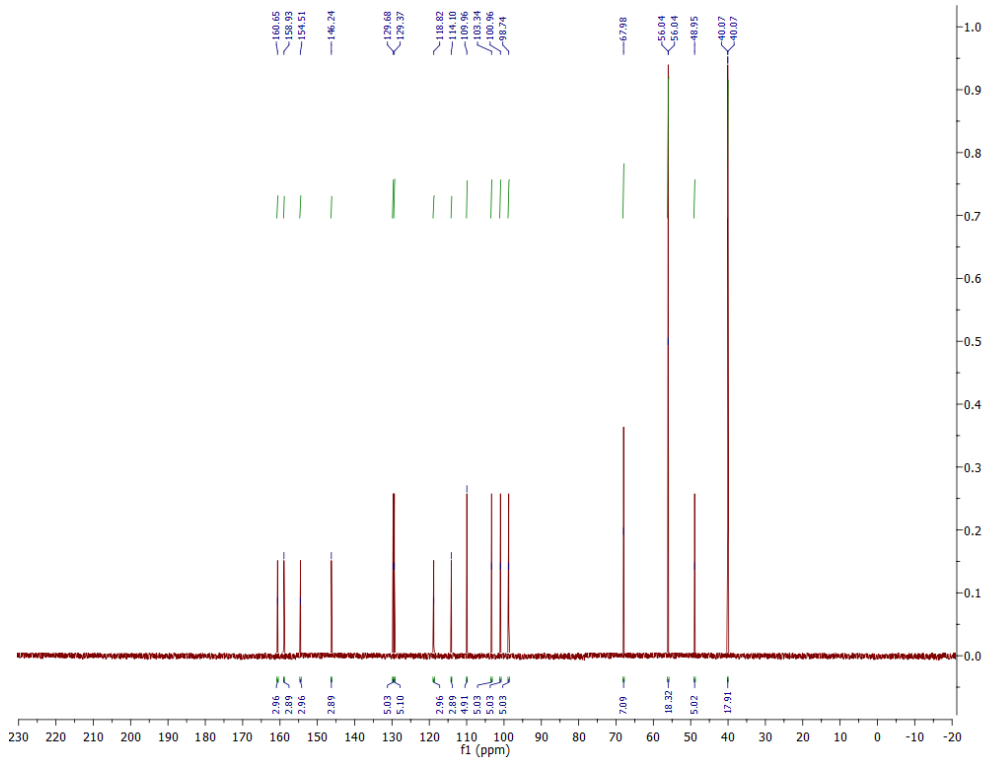
Слика ДМ250. ^{15}N NMR спектар једињења 3DQ-E1.



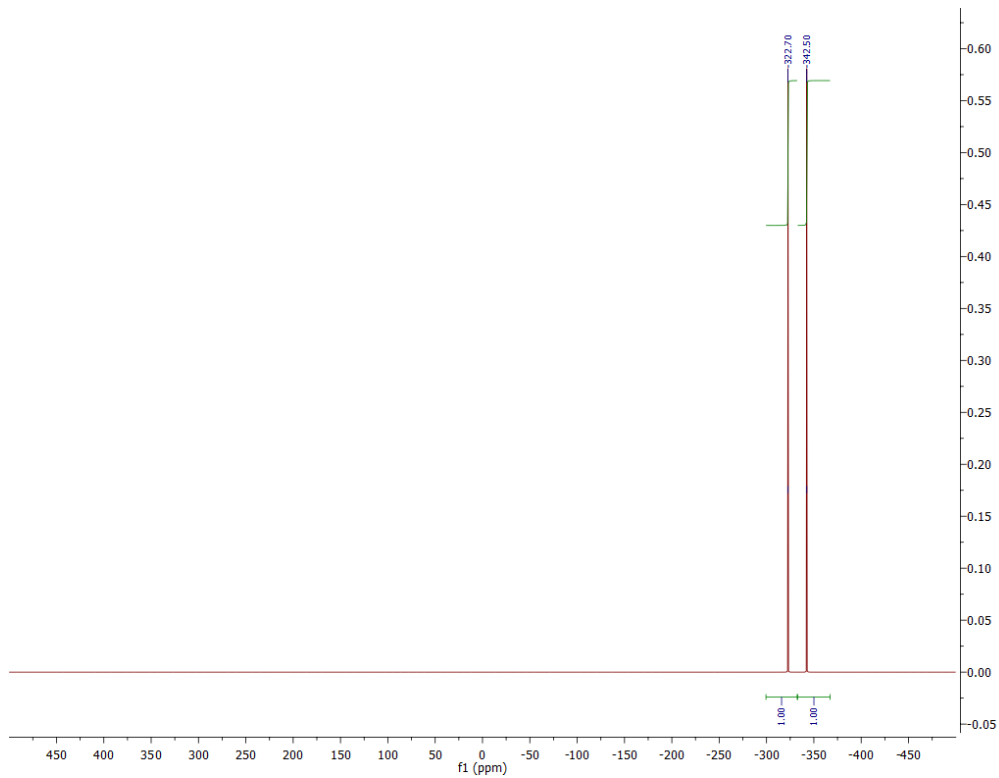
Слика ДМ251. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-E1**.



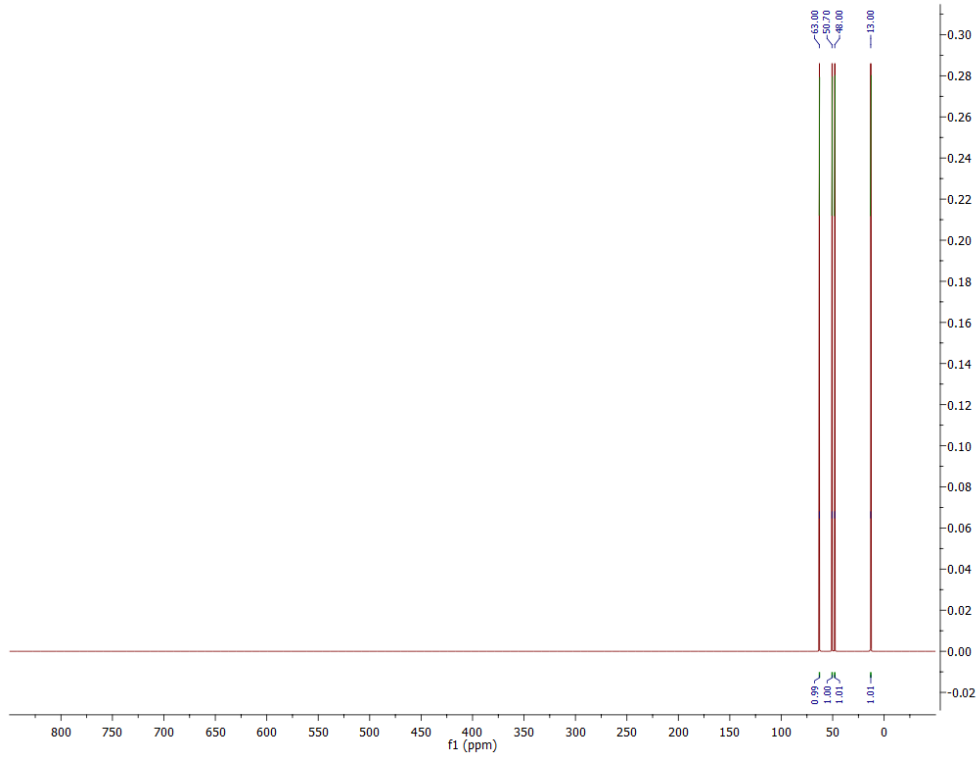
Слика ДМ252. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-E2**.



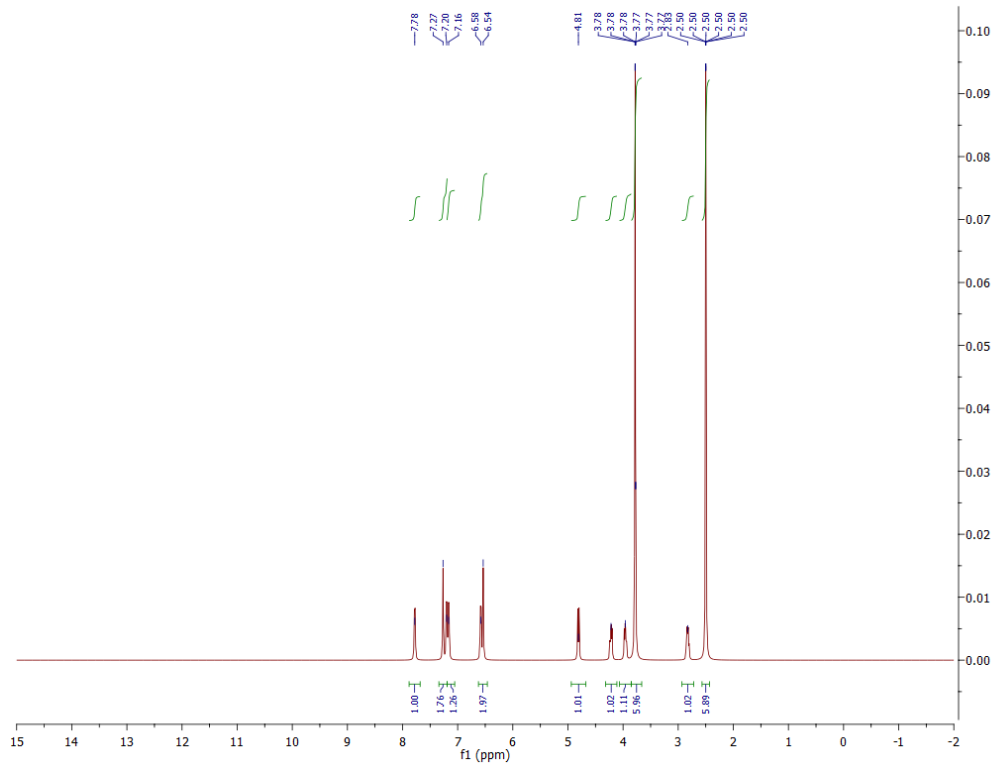
Слика ДМ253. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-E2**.



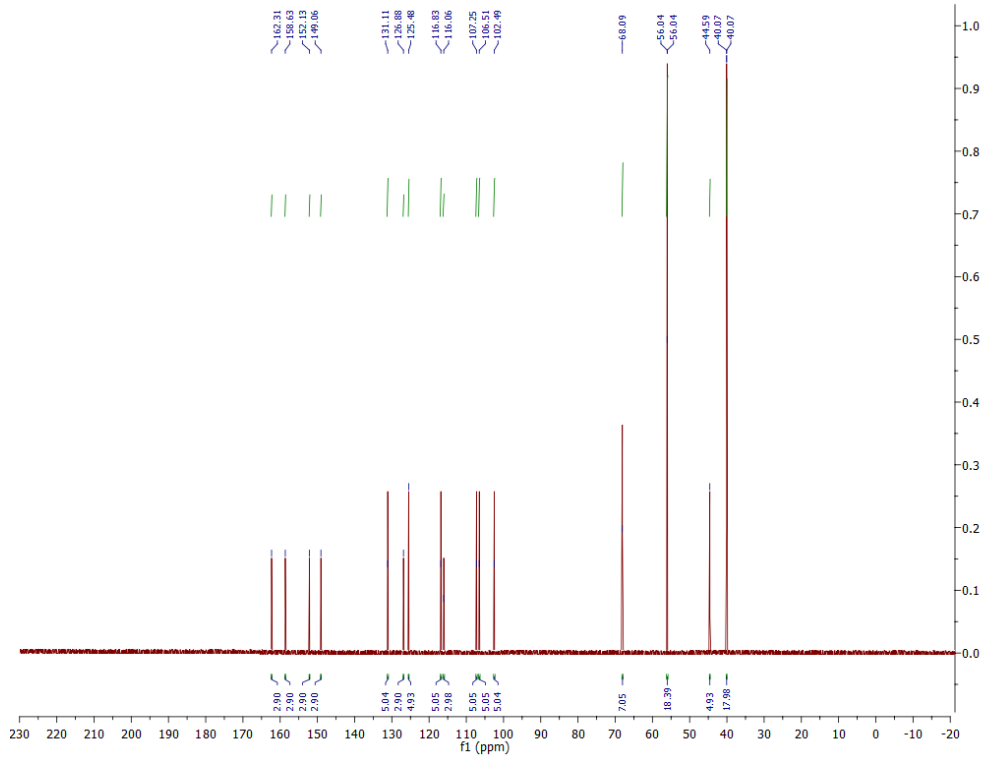
Слика ДМ254. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-E2**.



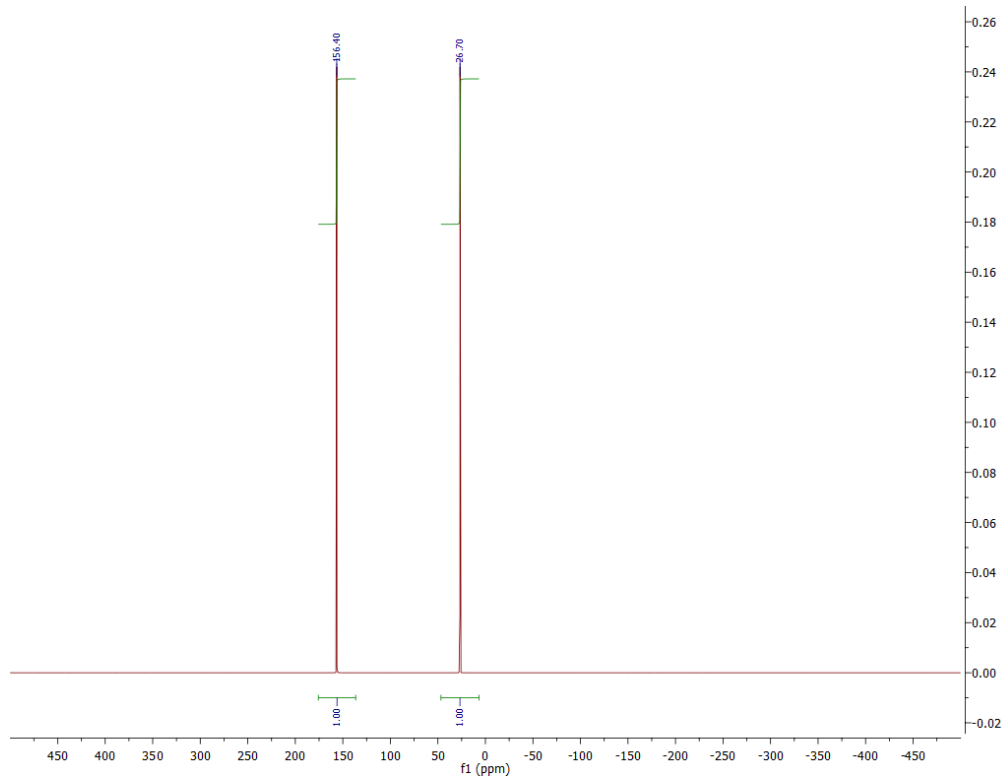
Слика ДМ255. ^{17}O NMR спектар једињења 3DQ-E2.



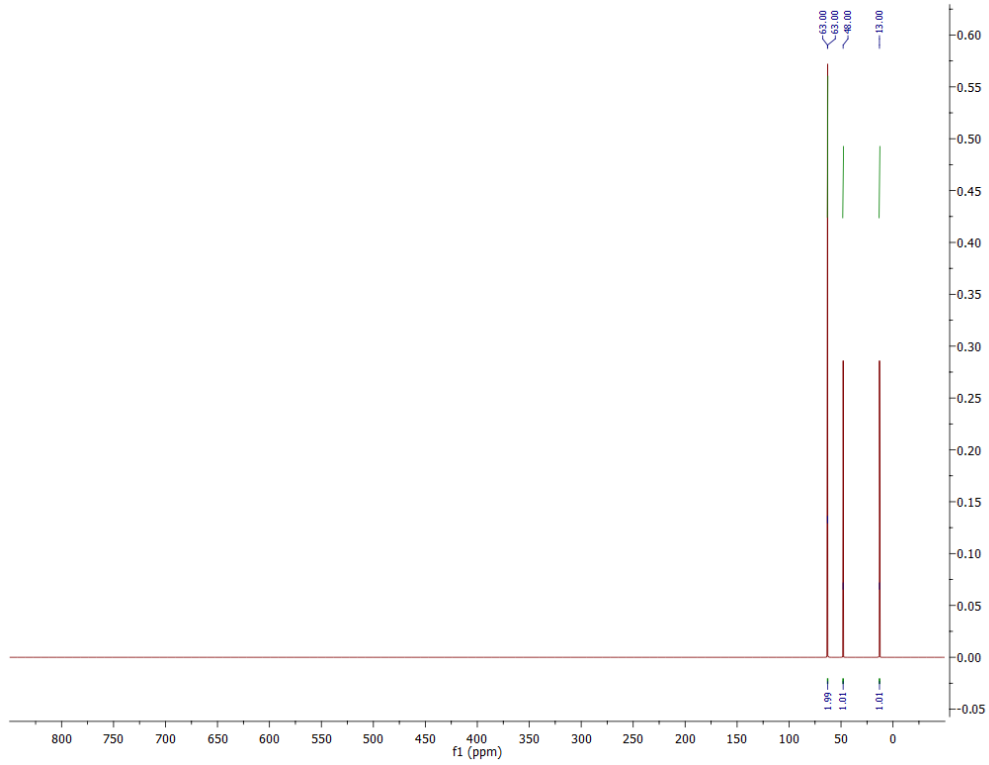
Слика ДМ256. ^1H NMR спектар једињења 3DQ-E3.



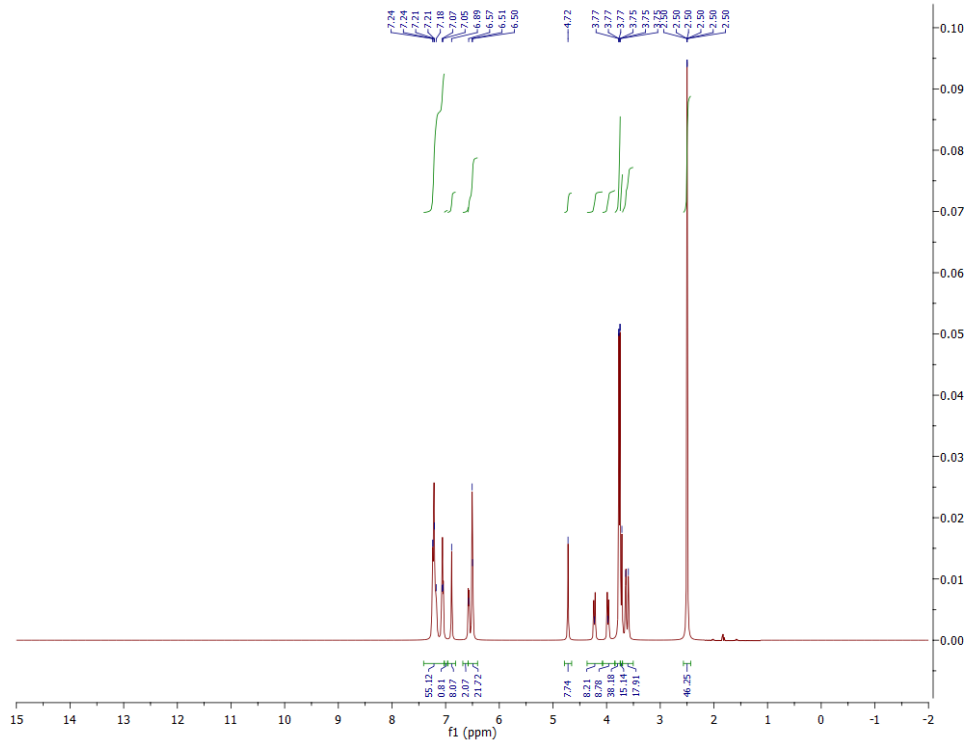
Слика ДМ257. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-E3.



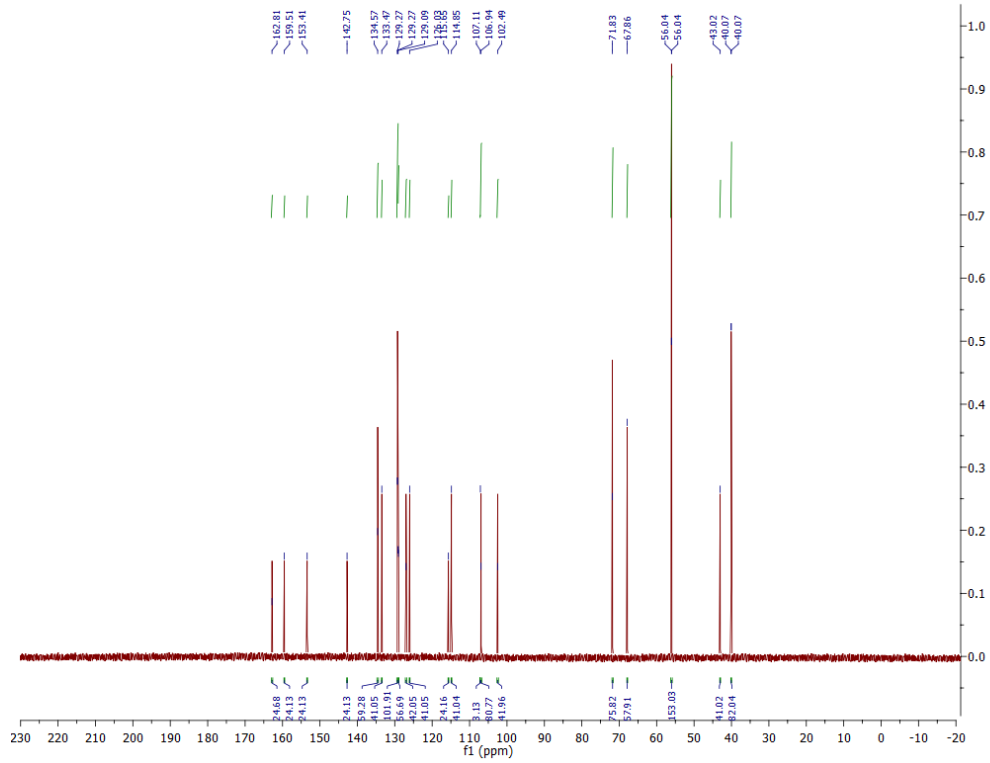
Слика ДМ258. ^{15}N NMR спектар једињења 3DQ-E3.



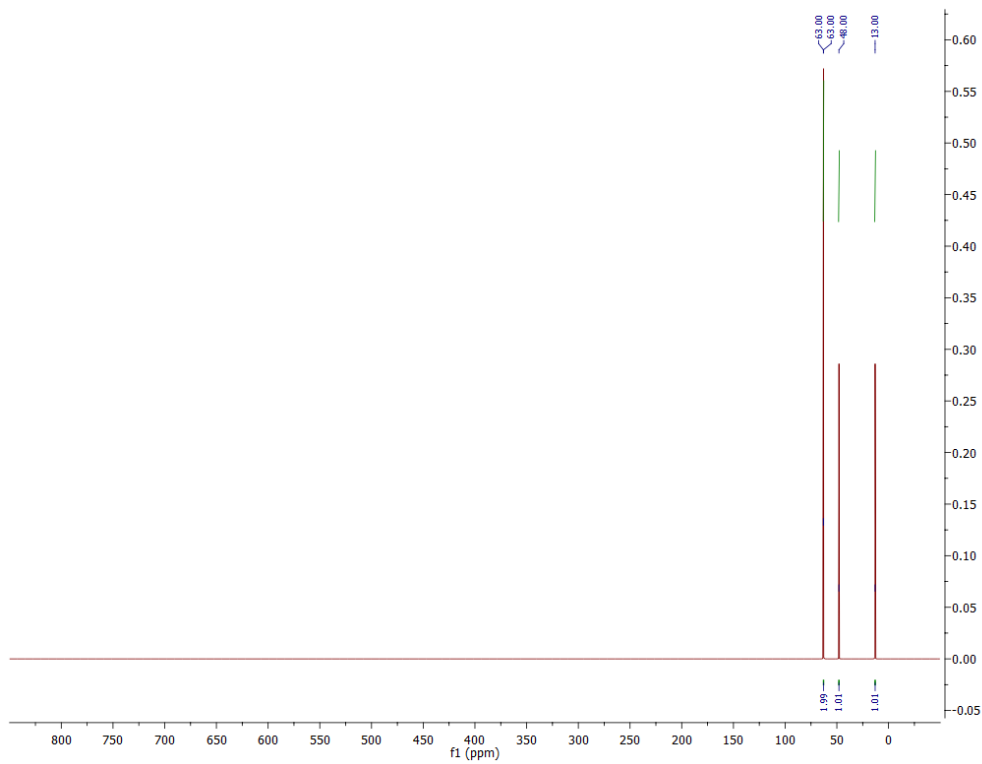
Слика ДМ259. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-E3**.



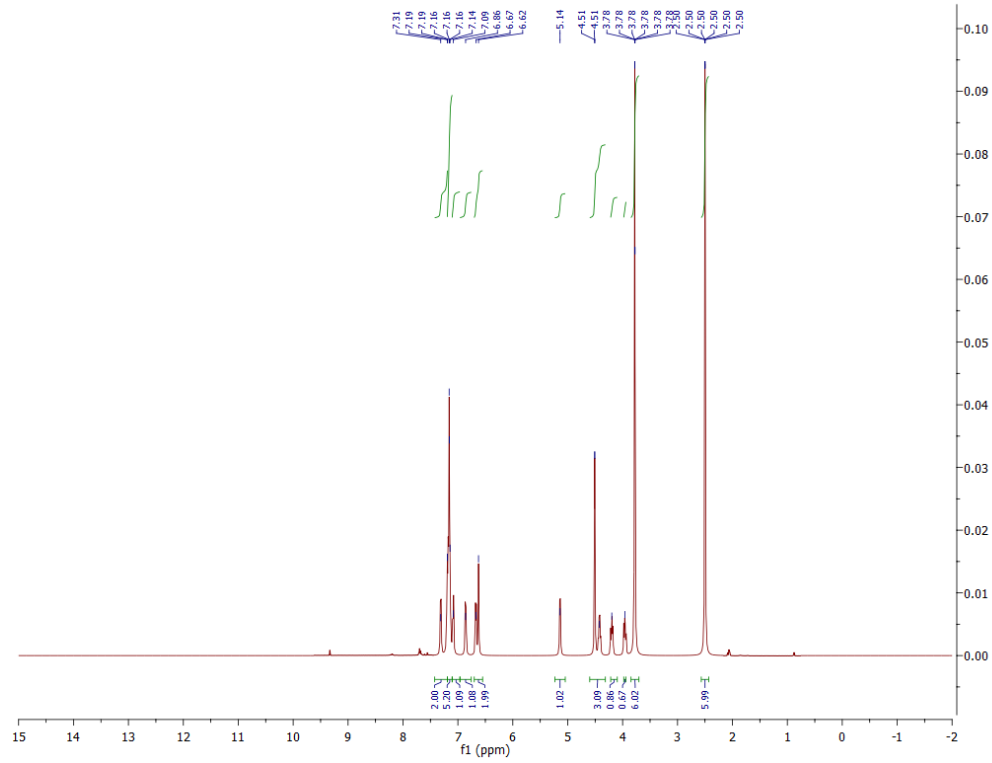
Слика ДМ260. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-E3-I**.



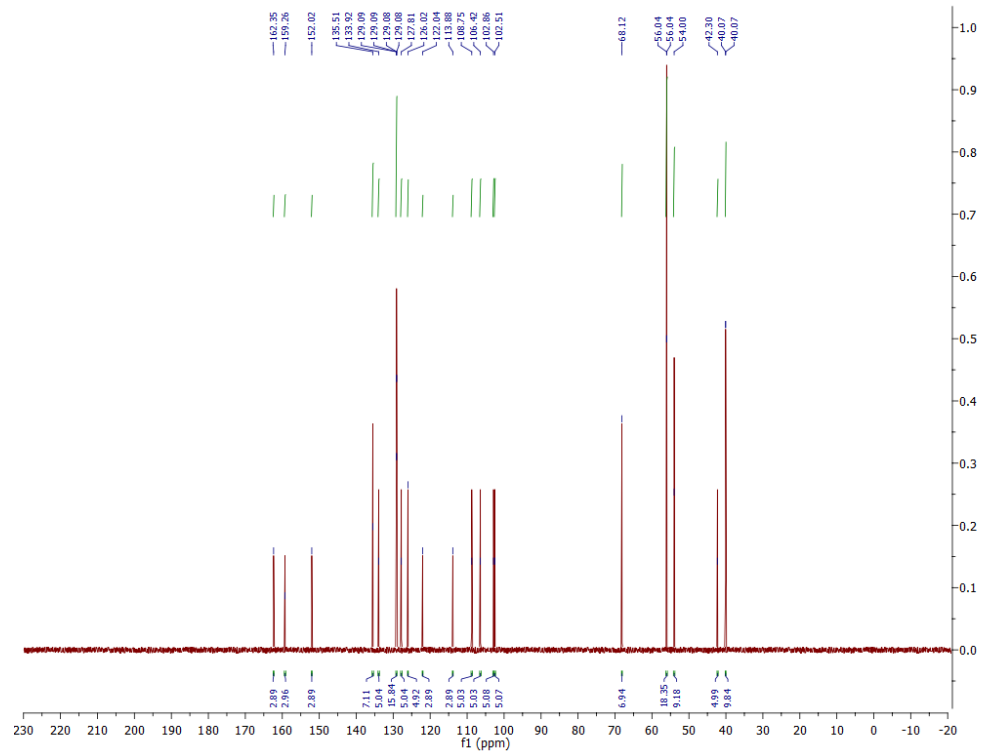
Слика ДМ261. ^{13}C NMR спектар једињења 3DQ-E3-I.



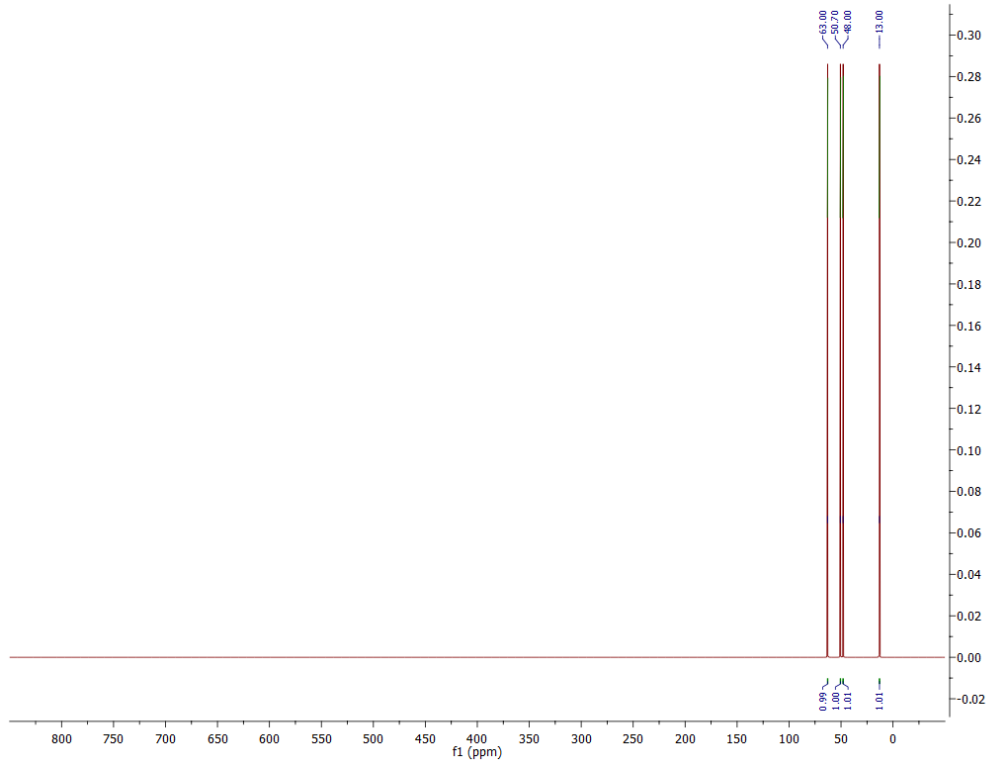
Слика ДМ262. ^{17}O NMR спектар једињења 3DQ-E3-I.



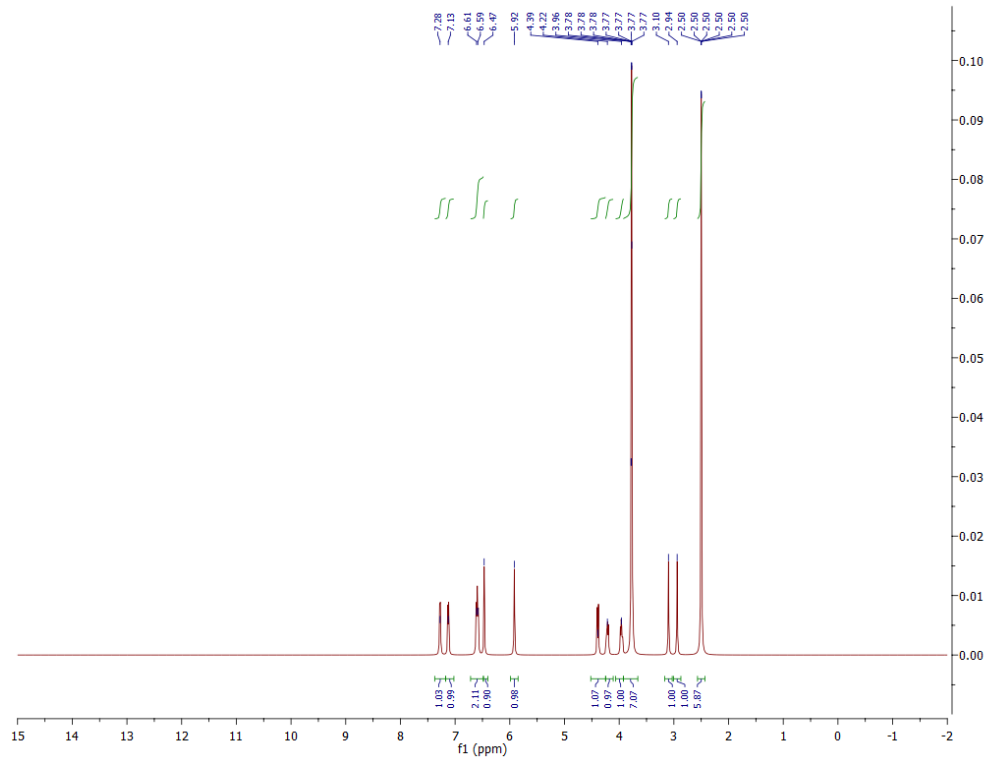
Слика ДМ263. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-E3-II**.



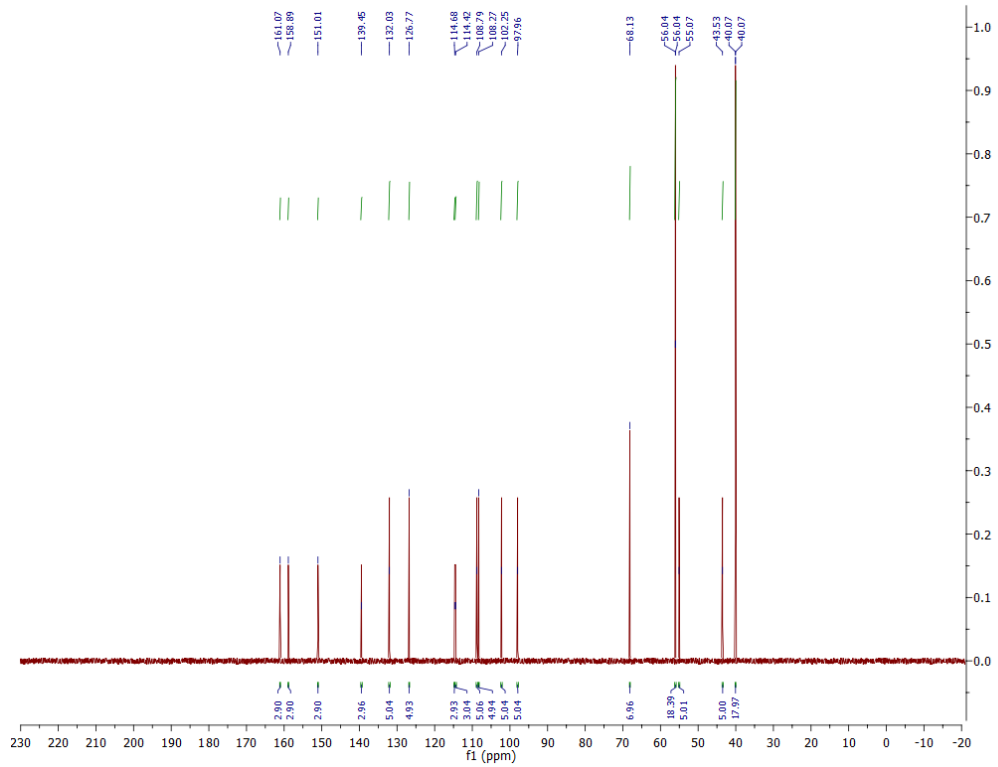
Слика ДМ264. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-E3-II**.



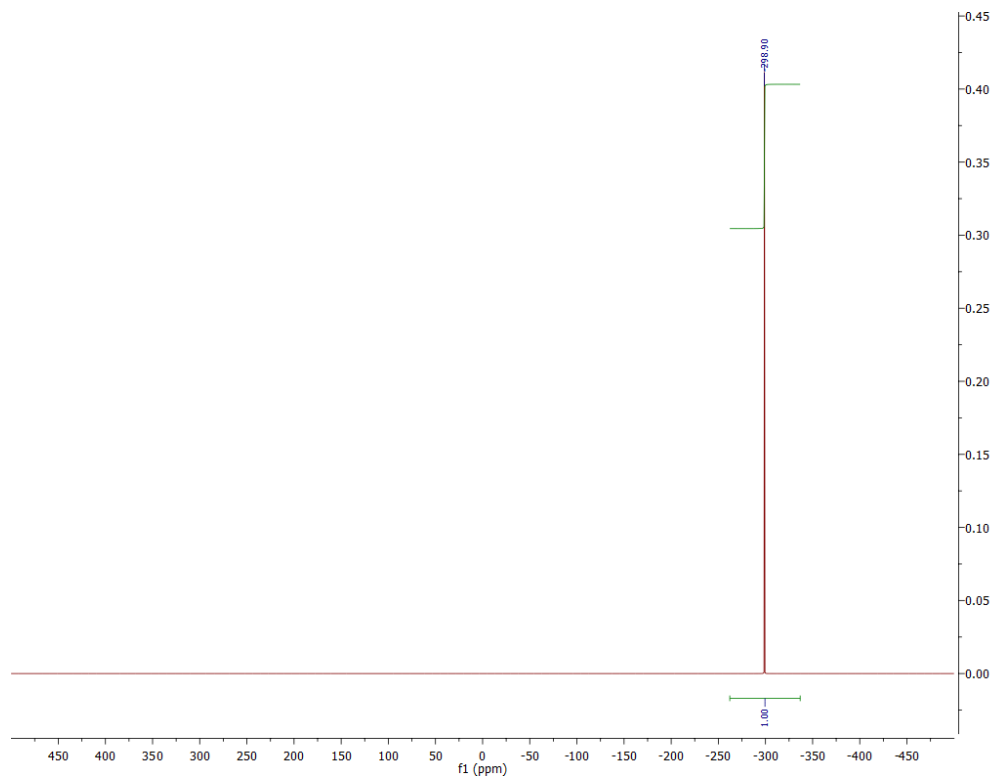
Слика ДМ265. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-E3-II**.



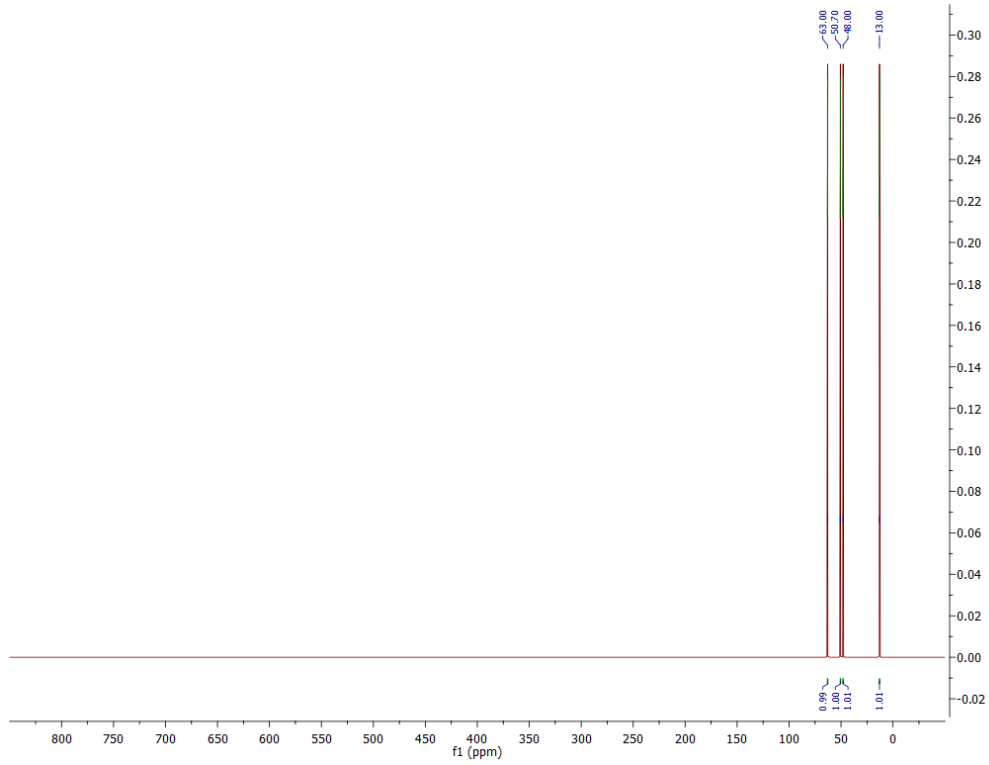
Слика ДМ266. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-E4**.



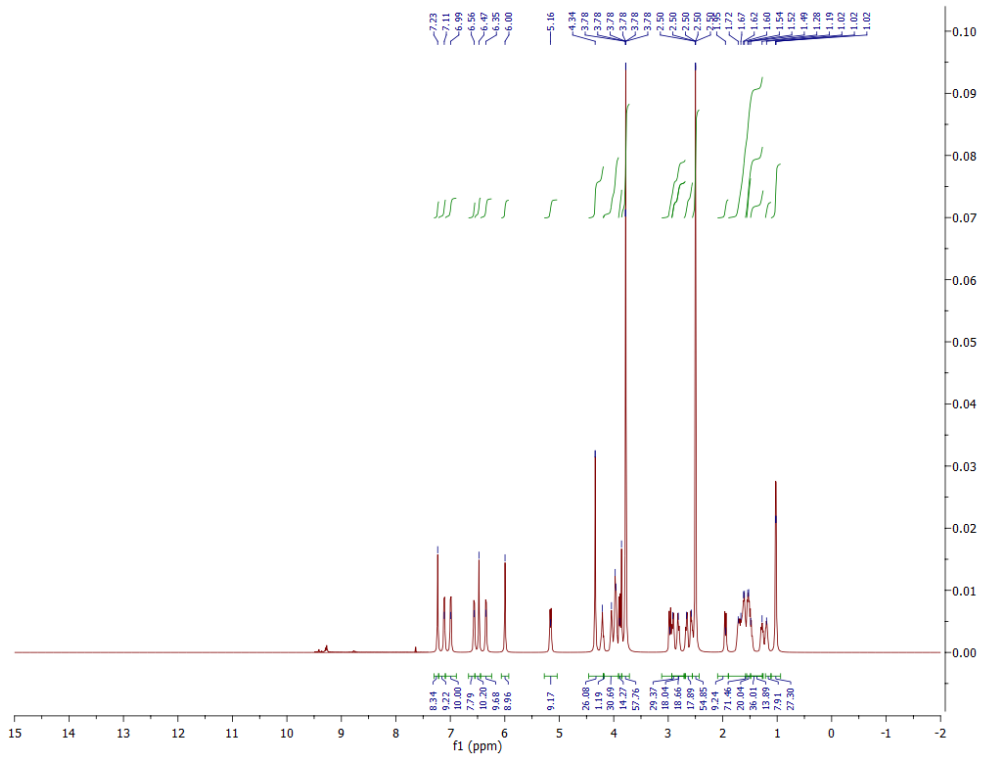
Слика ДМ267. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-E4**.



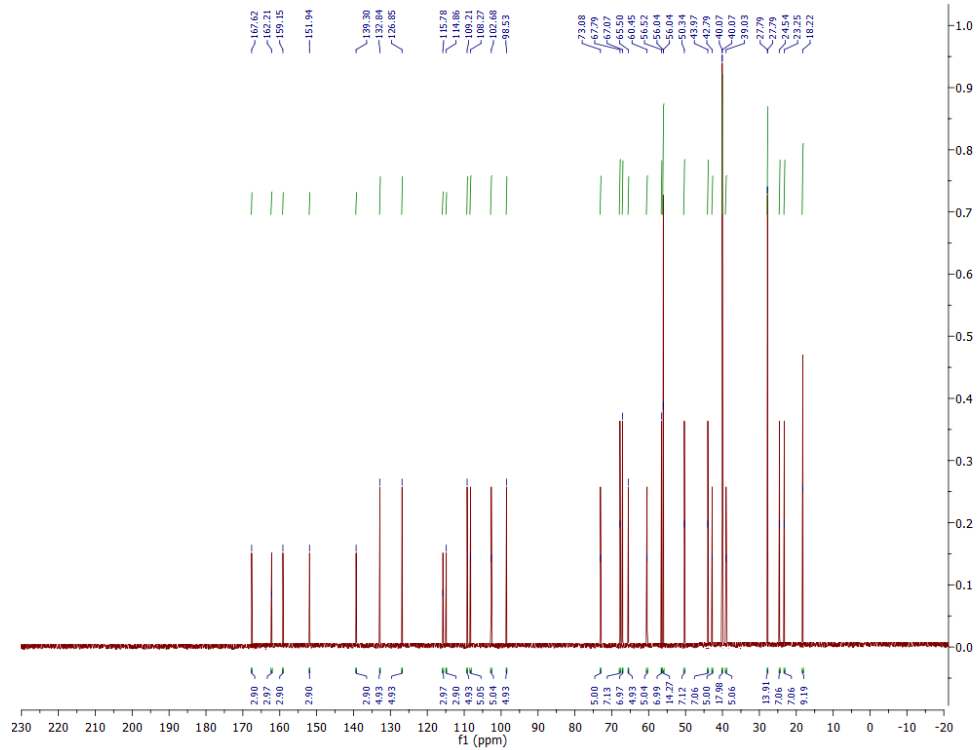
Слика ДМ268. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-E4**.



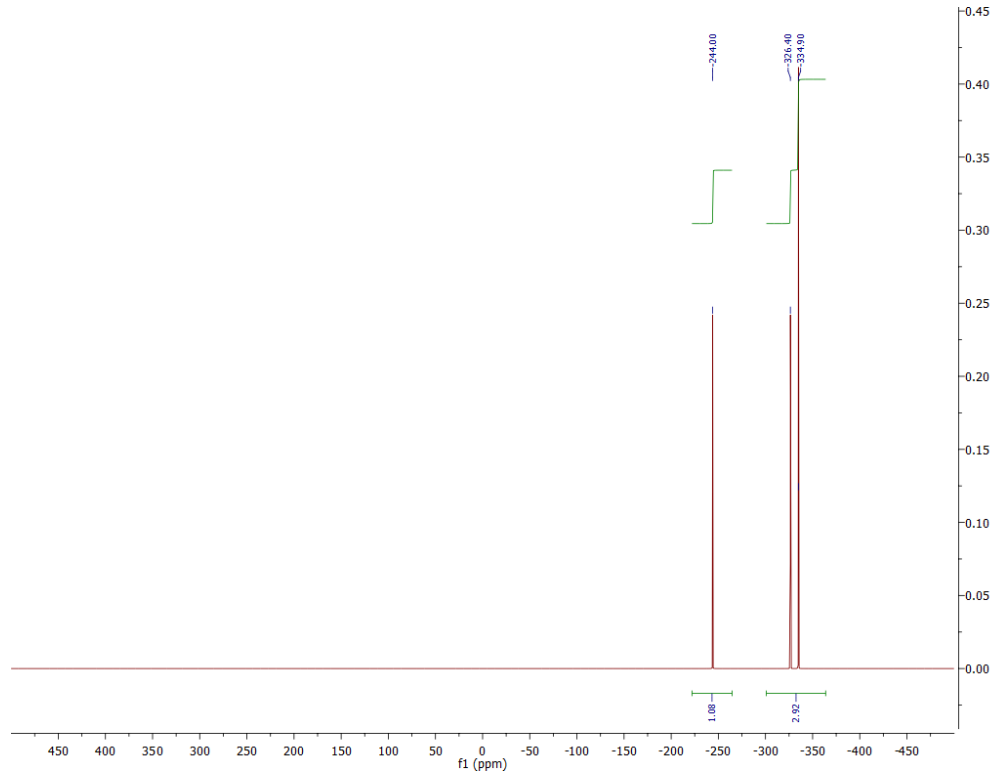
Слика ДМ269. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-E4**.



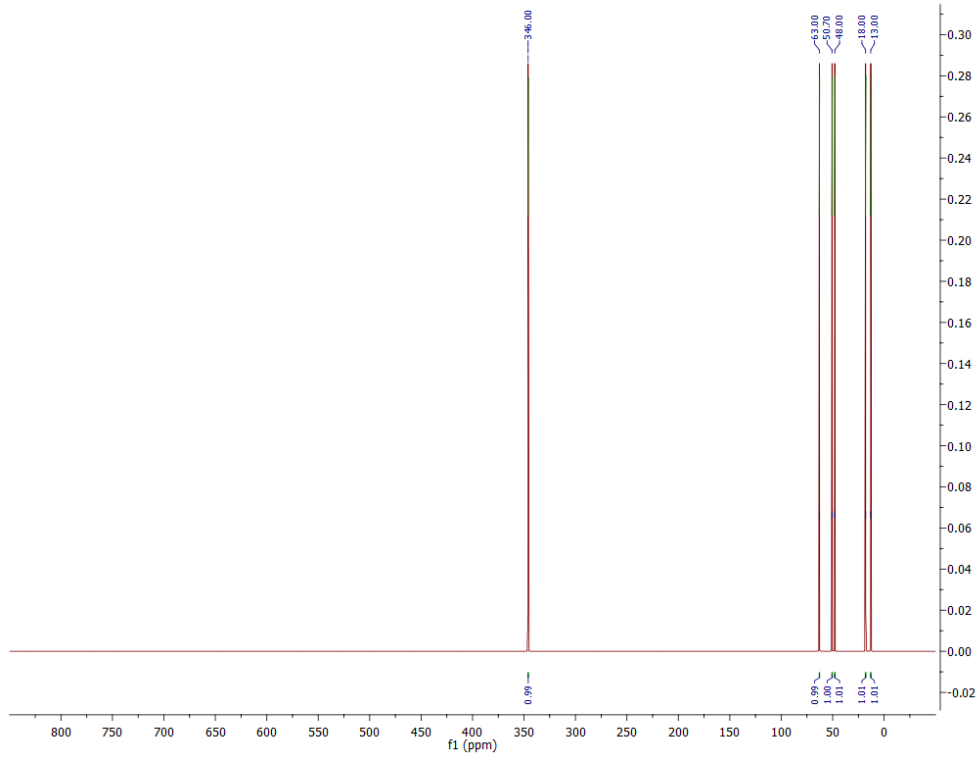
Слика ДМ270. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e**.



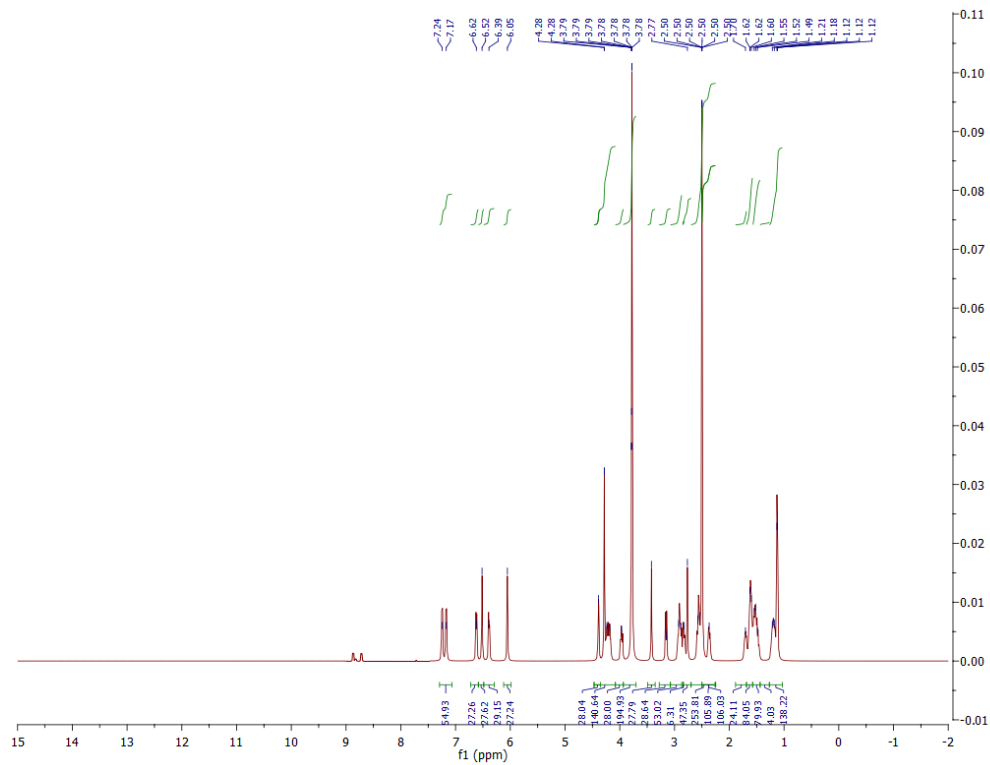
Слика ДМ271. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e**.



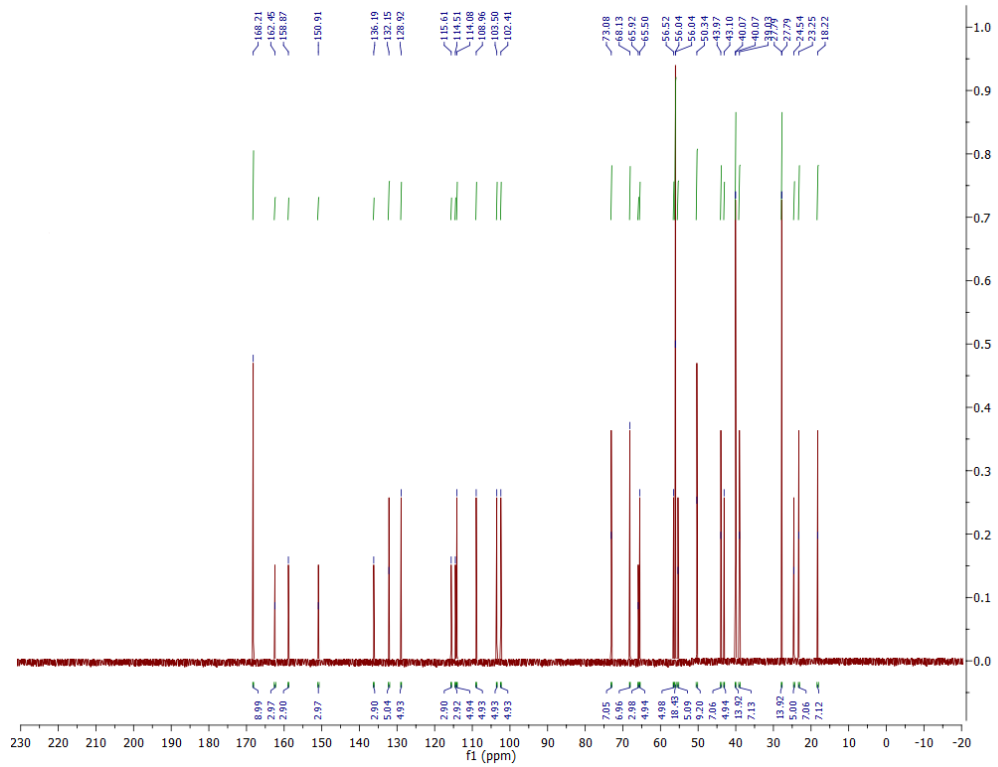
Слика ДМ272. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e**.



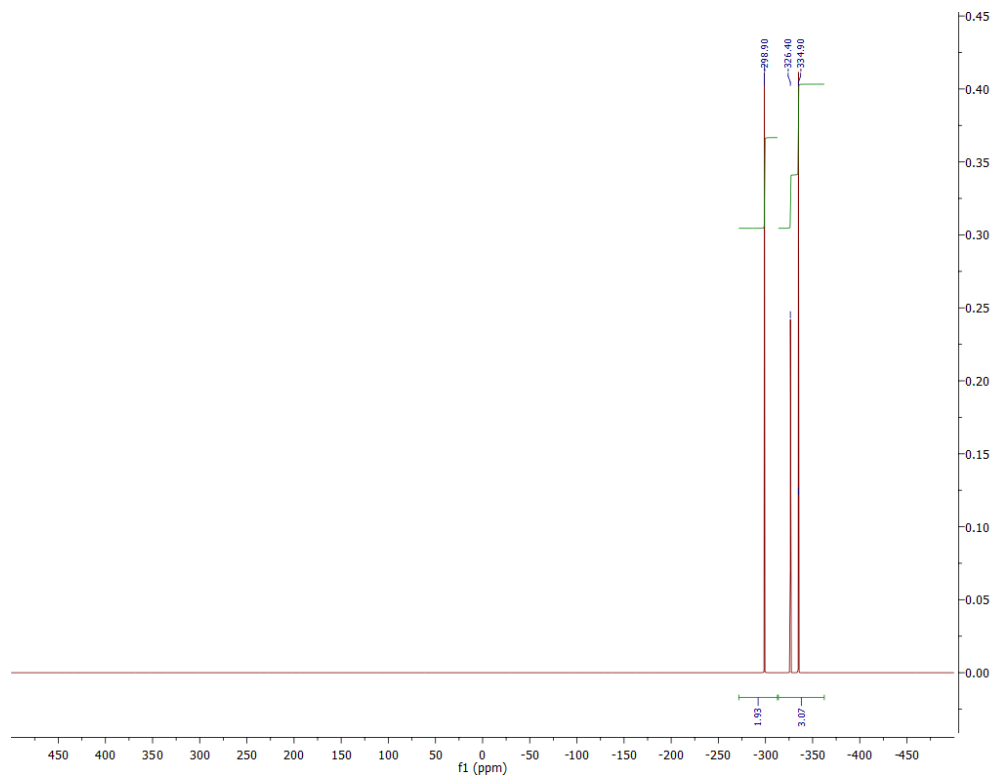
Слика ДМ273. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e**.



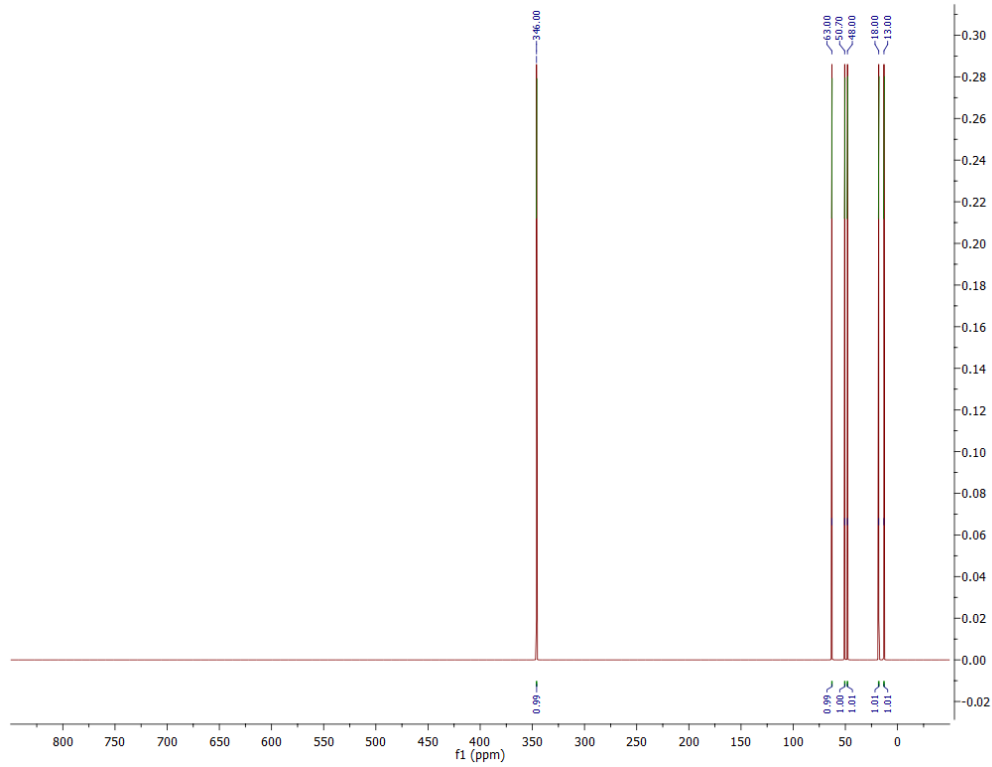
Слика ДМ274. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e***.



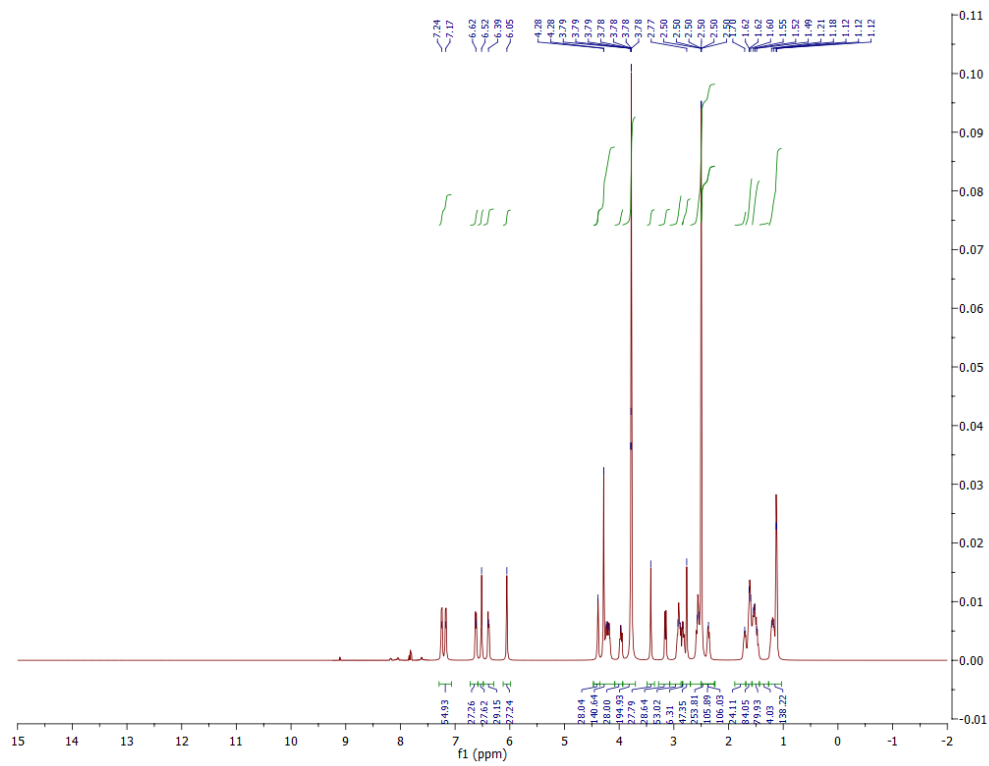
Слика ДМ275. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e***.



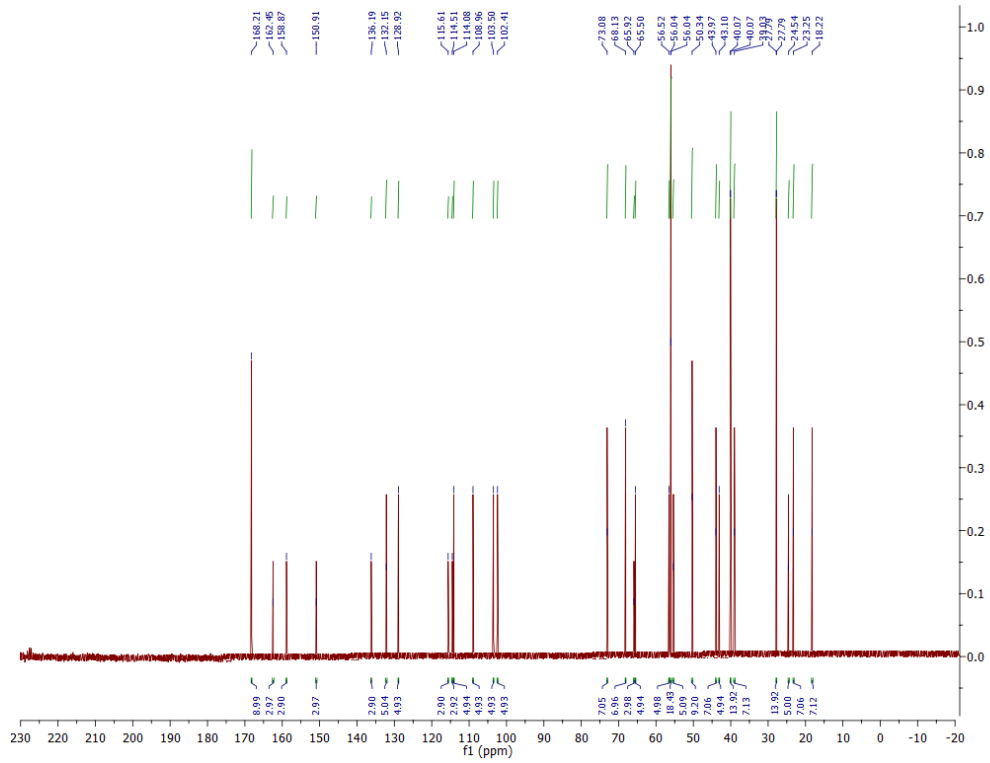
Слика ДМ276. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e***.



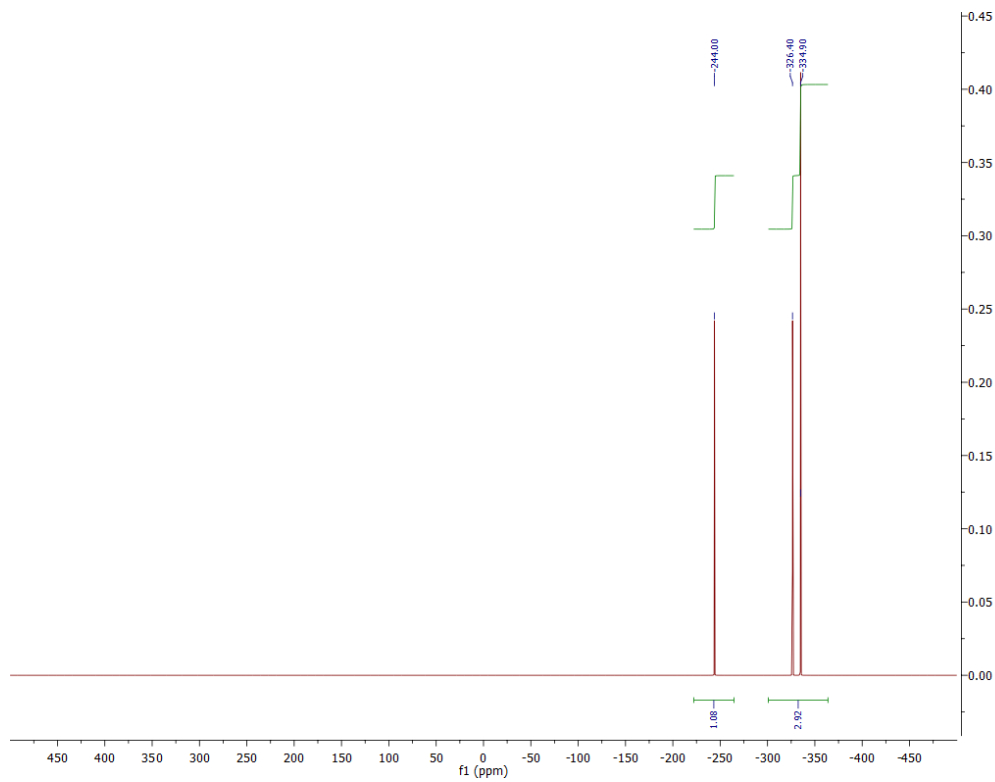
Слика ДМ277. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-Pro-1e***.



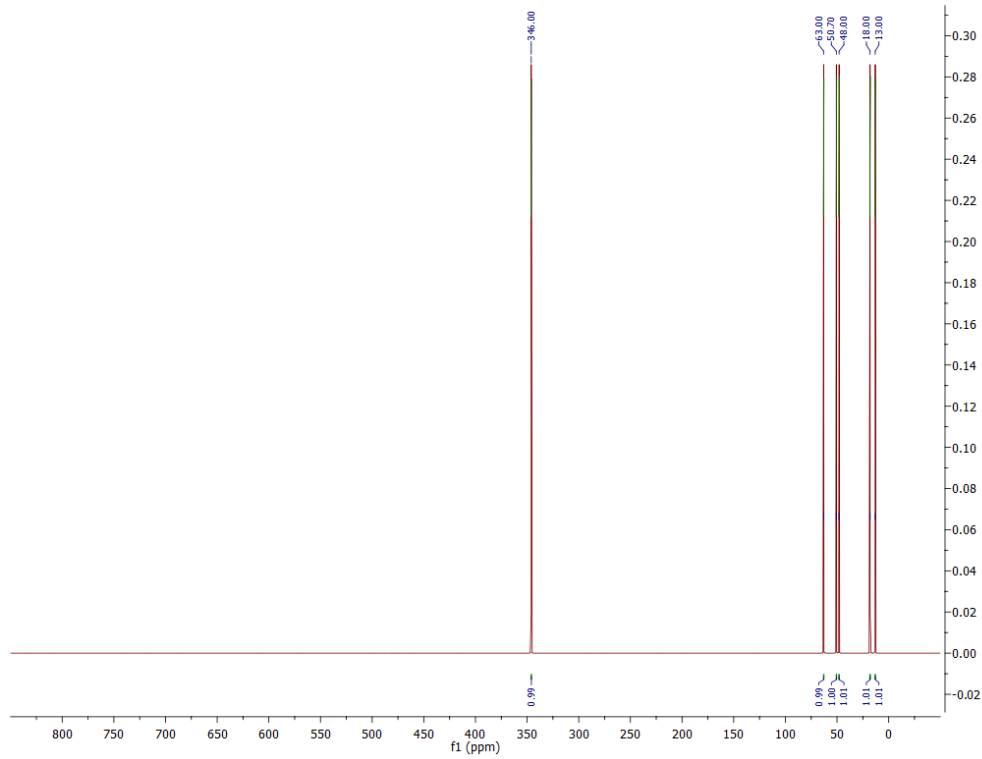
Слика ДМ278. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-1e**.



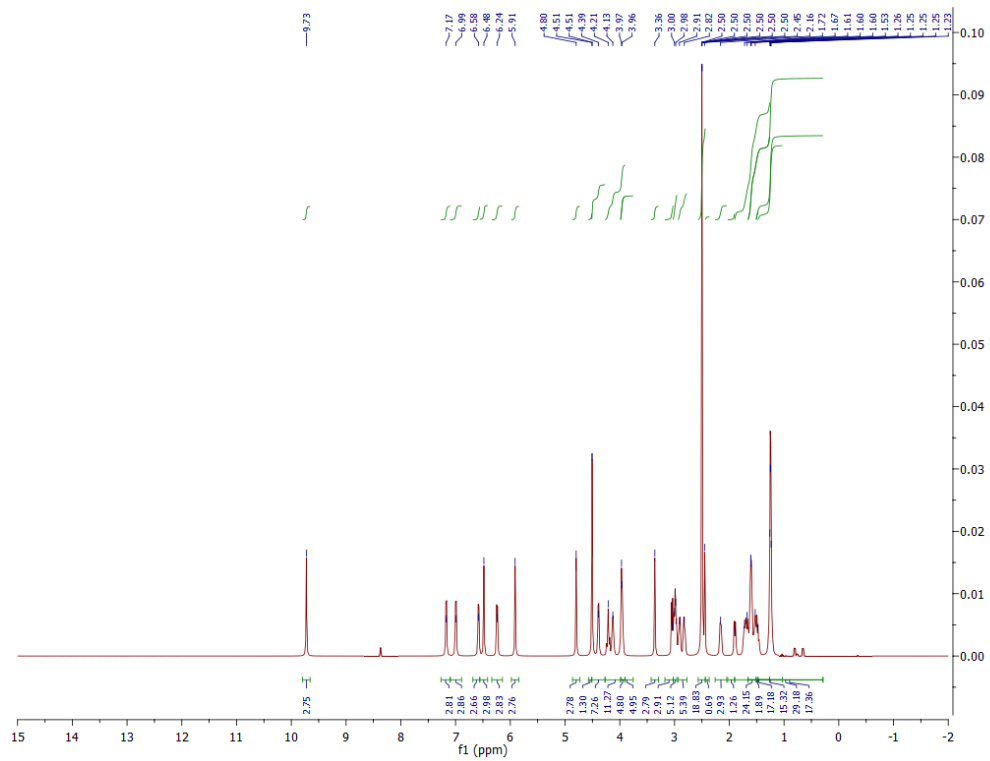
Слика ДМ279. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-1e**.



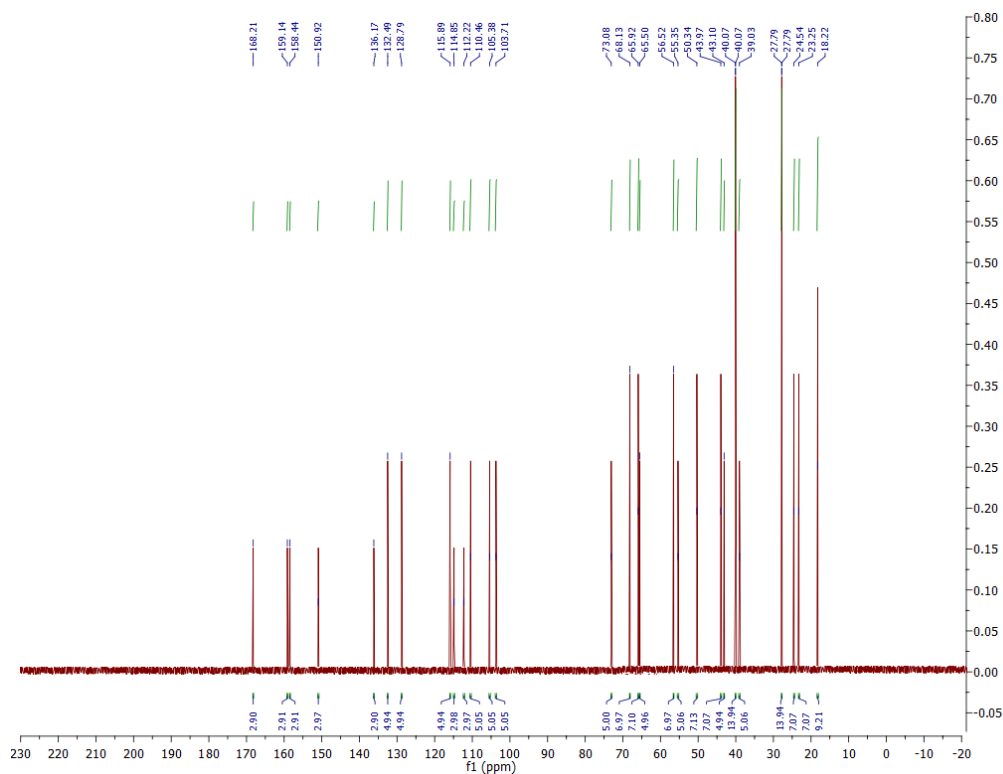
Слика ДМ280. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1e**.



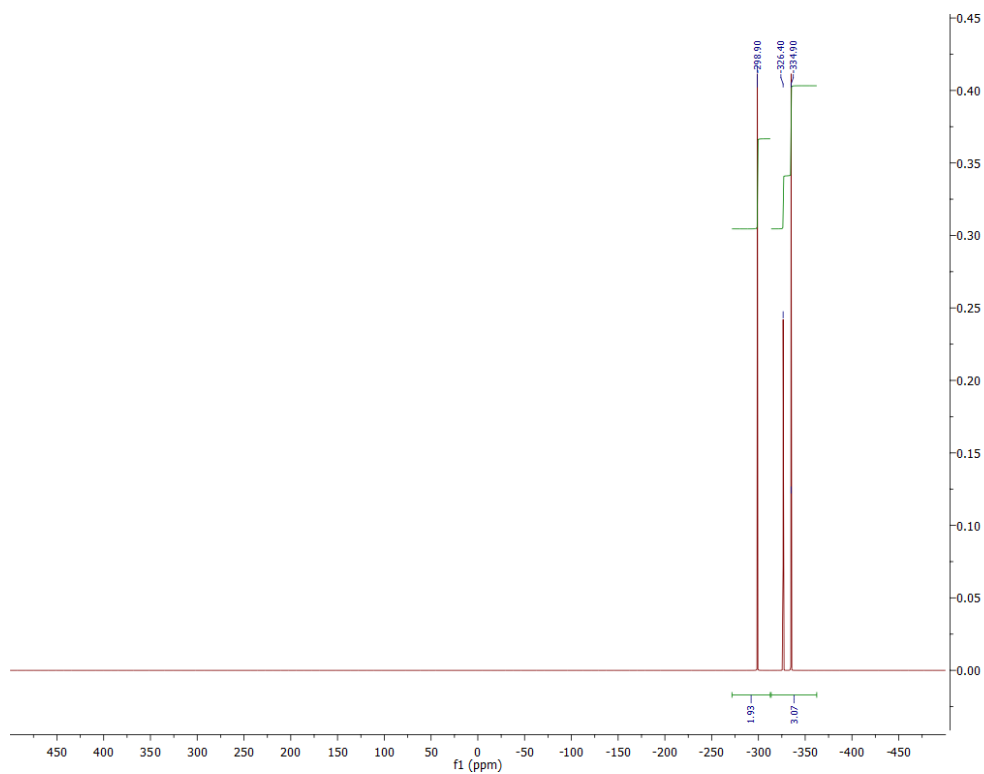
Слика ДМ281. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1e**.



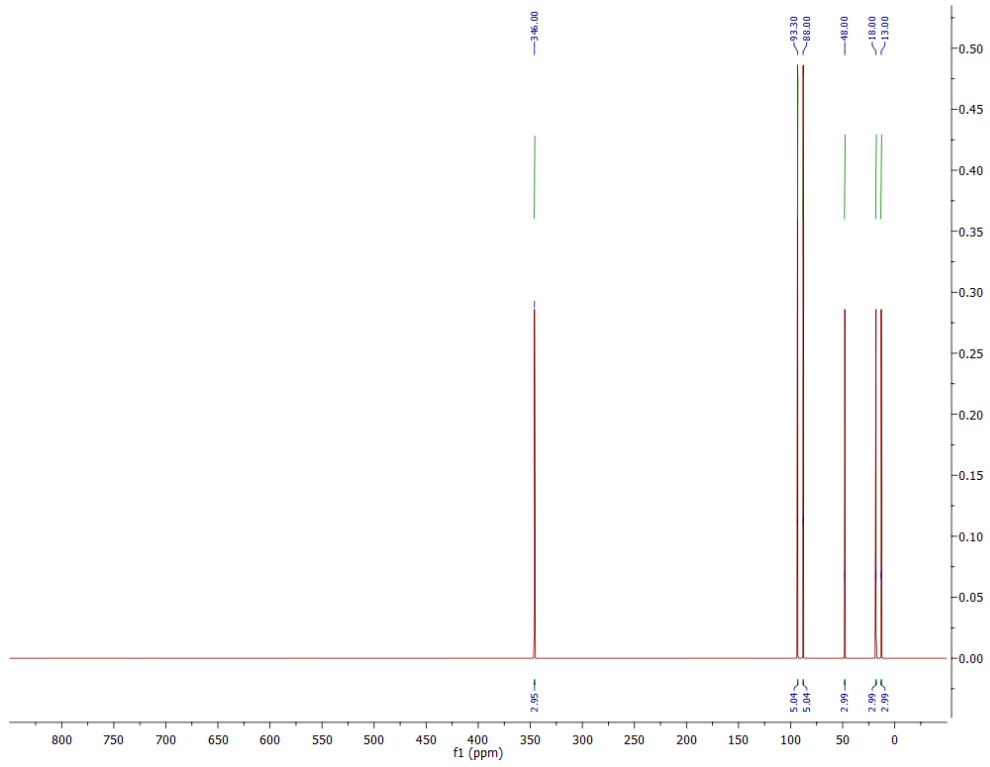
Слика ДМ282. ^1H NMR спектар једињења **3DQ-1e***.



Слика ДМ283. ^{13}C NMR спектар једињења **3DQ-1e***.



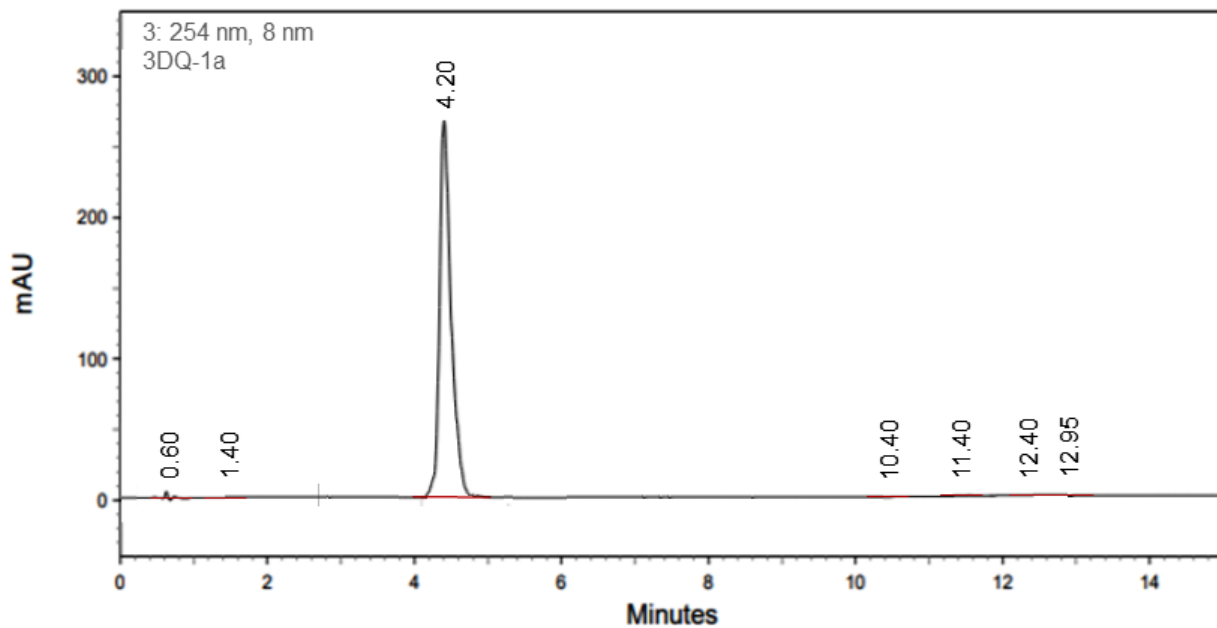
Слика ДМ284. ^{15}N NMR спектар једињења **3DQ-1e***.



Слика ДМ285. ^{17}O NMR спектар једињења **3DQ-1e***.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DQ-1a
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-1a
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/08:05:24



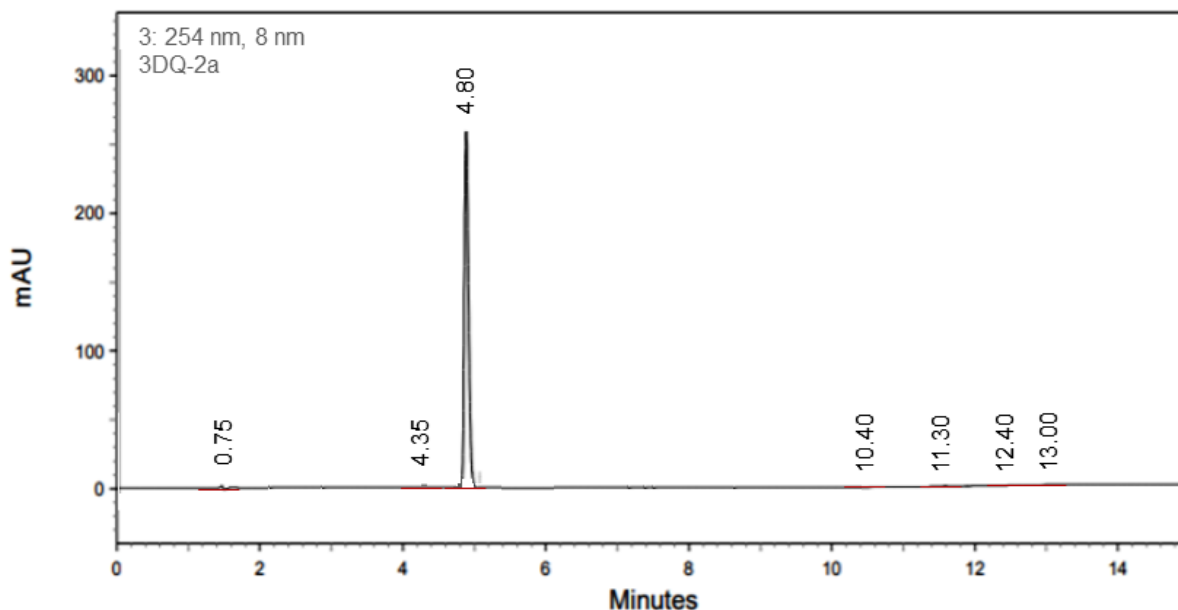
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
0.60	1927	5714	0.36
1.40	1721	5632	0.25
4.20	418435	1198723	98.44
10.40	1853	5563	0.23
11.40	1655	5324	0.18
12.40	1371	5164	0.35
13.95	1932	5393	0.19

Слика ДМ286. HPLC спектар једињења **3DQ-1a**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DQ-2a
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-2a
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/08:30:11



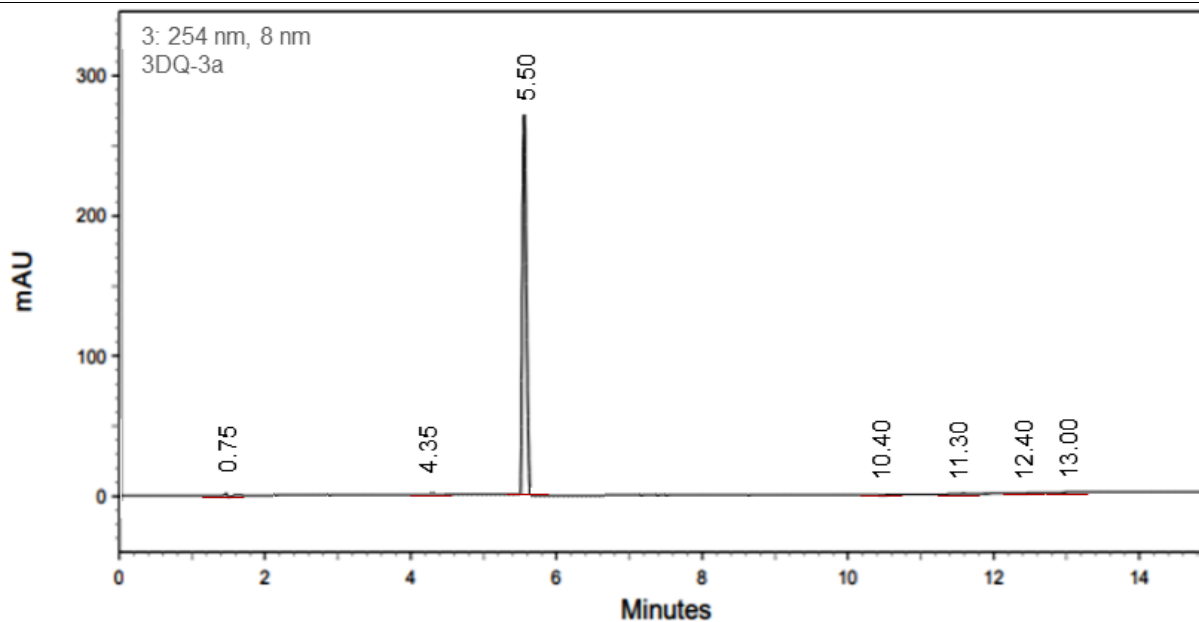
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
0.75	1763	5641	0.16
4.35	1715	5684	0.65
4.80	423615	1284512	98.56
10.40	1874	5524	0.20
11.30	1685	5476	0.15
12.40	1362	5122	0.13
13.00	1959	5418	0.15

Слика ДМ287. HPLC спектар једињења **3DQ-2a**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DQ-3a
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-3a
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/08:55:34



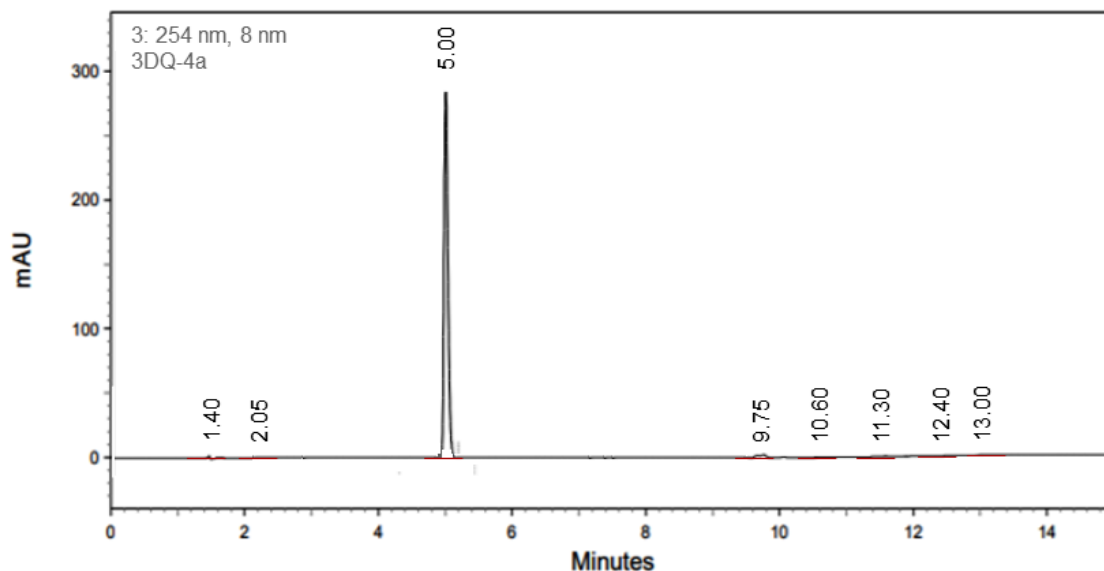
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
0.75	1325	4952	0.17
4.35	1426	5031	0.22
5.50	484625	1459625	98.87
10.40	1341	4481	0.16
11.30	1269	4758	0.18
12.40	1452	4892	0.25
13.00	1274	4825	0.15

Слика ДМ288. HPLC спектар једињења 3DQ-3a.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DQ-4a
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-4a
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/09:20:12



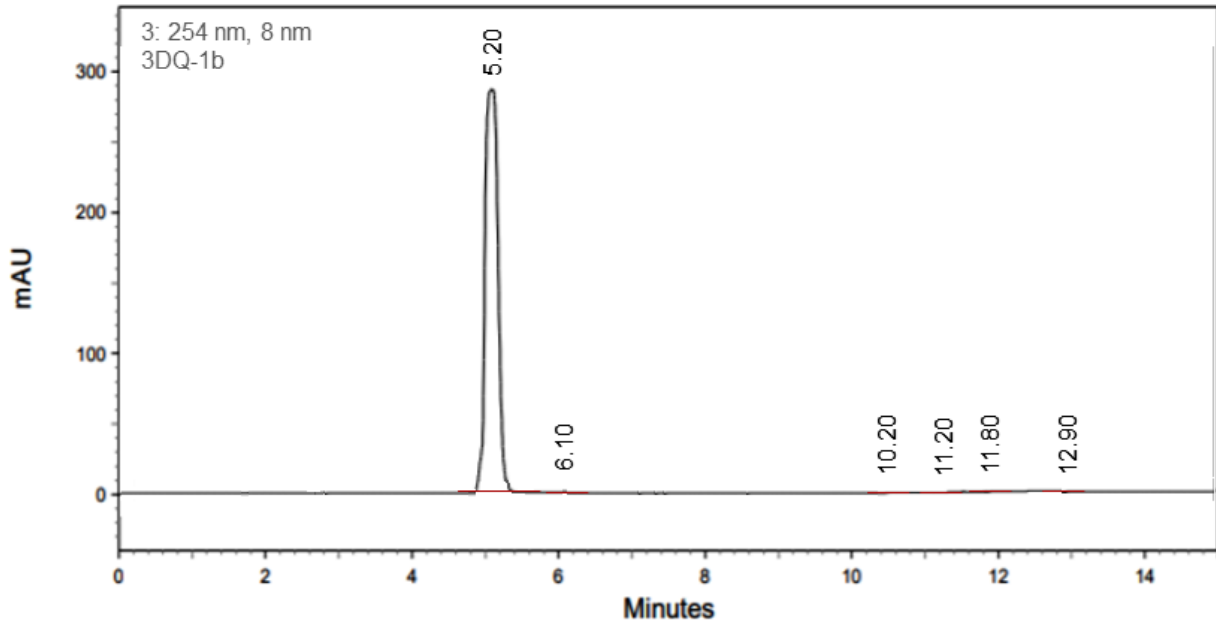
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.40	1763	5641	0.16
2.05	1763	5621	0.12
5.00	406891	1265484	97.89
9.75	2361	55481	1.21
10.60	1874	5526	0.19
11.30	1695	5481	0.14
12.40	1365	5126	0.12
13.00	1951	5491	0.17

Слика ДМ289. HPLC спектар једињења **3DQ-4a**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DQ-1b
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-1b
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/09:45:14



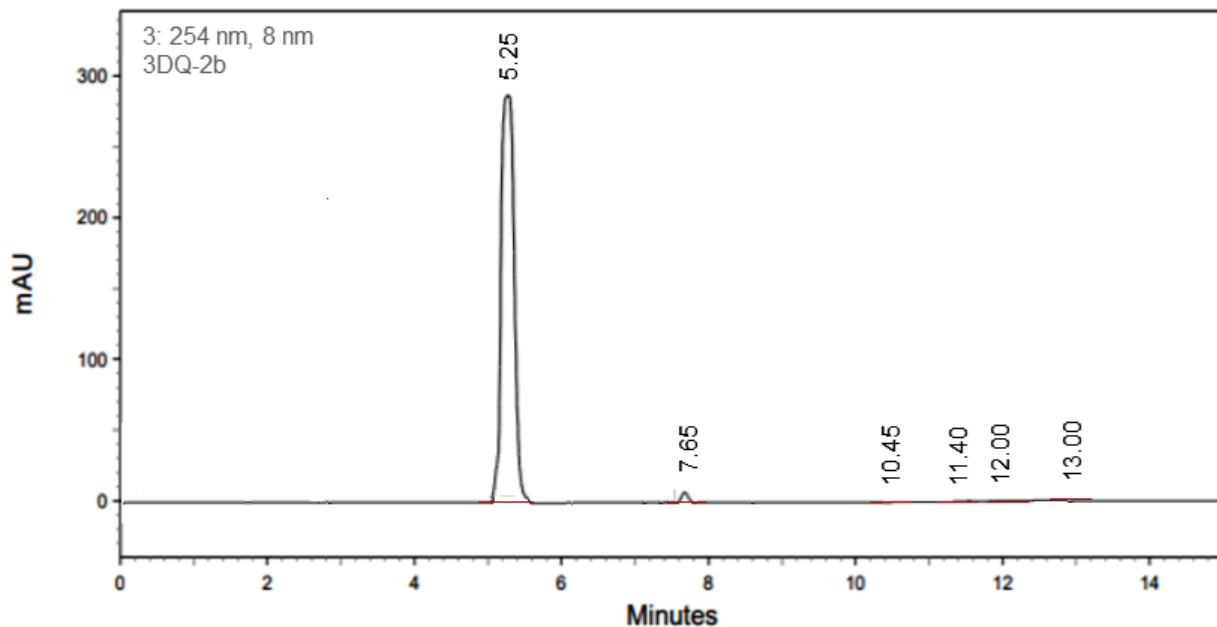
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
5.20	496521	1536215	99.00
6.10	1165	4956	0.18
10.20	1846	5162	0.21
11.20	1451	5562	0.15
11.80	1271	5148	0.25
12.90	1895	5524	0.21

Слика ДМ290. HPLC спектар једињења **3DQ-1b**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DQ-2b
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-2b
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/10:10:23



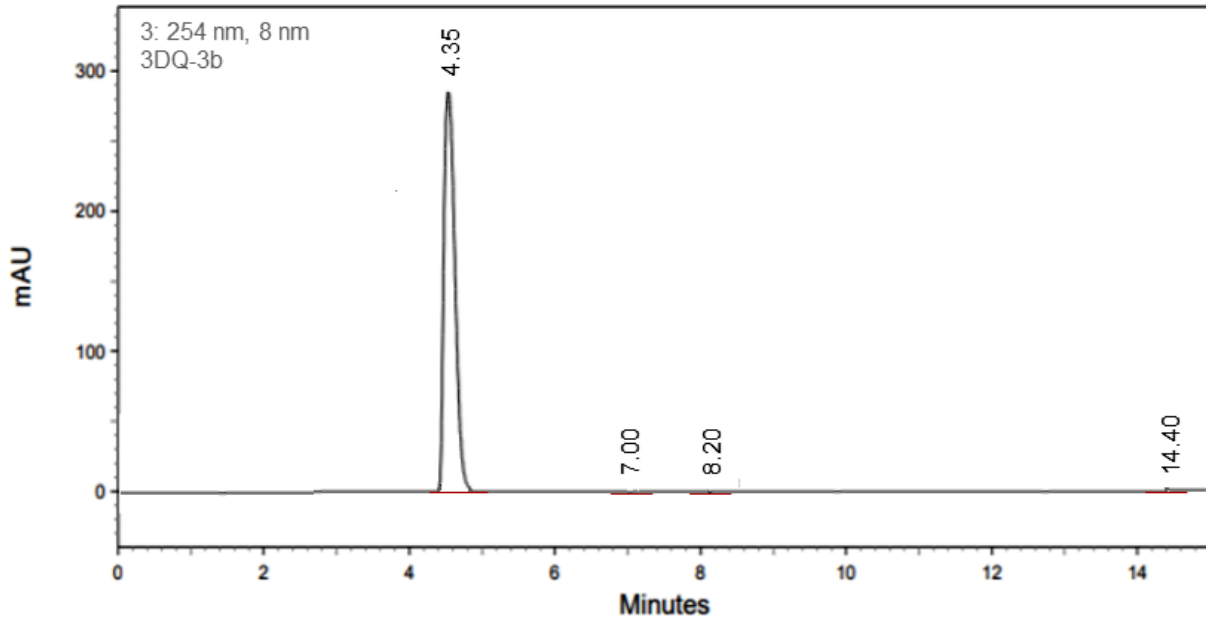
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
5.25	496452	1658215	97.81
7.65	2513	7595	1.34
10.45	1795	5521	0.22
11.40	1251	5159	0.17
12.00	1285	5418	0.21
13.00	1759	5632	0.25

Слика ДМ291. HPLC спектар једињења **3DQ-2b**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DQ-3b
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-3b
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/10:35:47



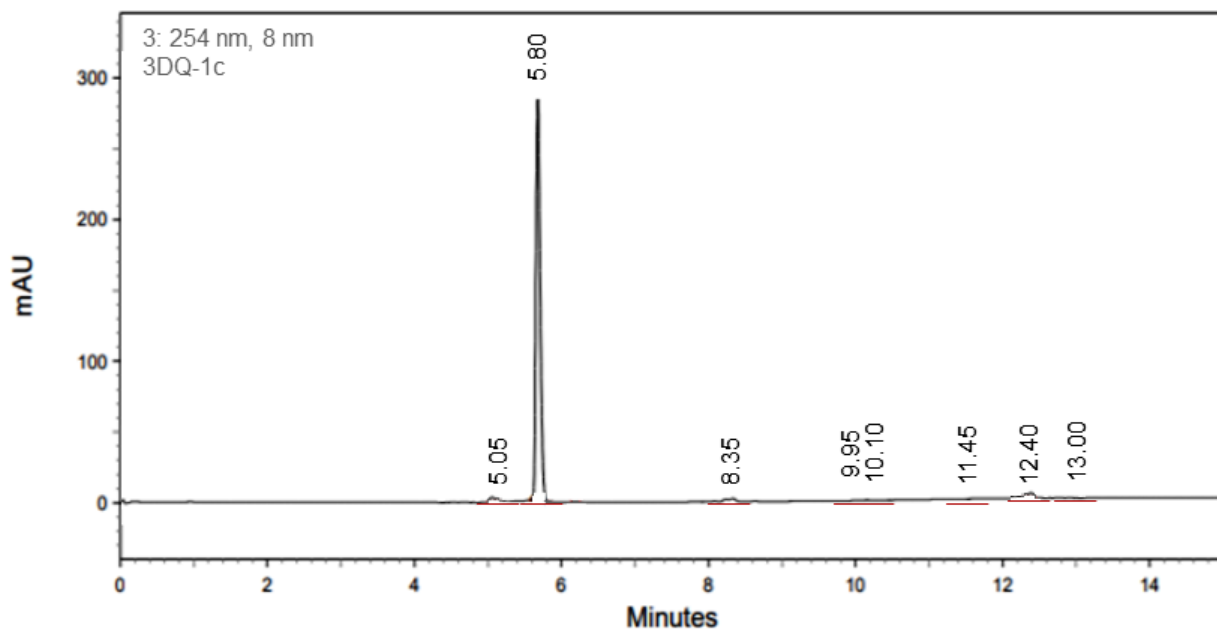
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
4.35	478562	1436851	99.48
7.00	1745	5236	0.16
8.20	1785	5184	0.12
14.40	1985	5269	0.24

Слика ДМ292. HPLC спектар једињења **3DQ-3b**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DQ-1c
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-1c
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/11:00:32



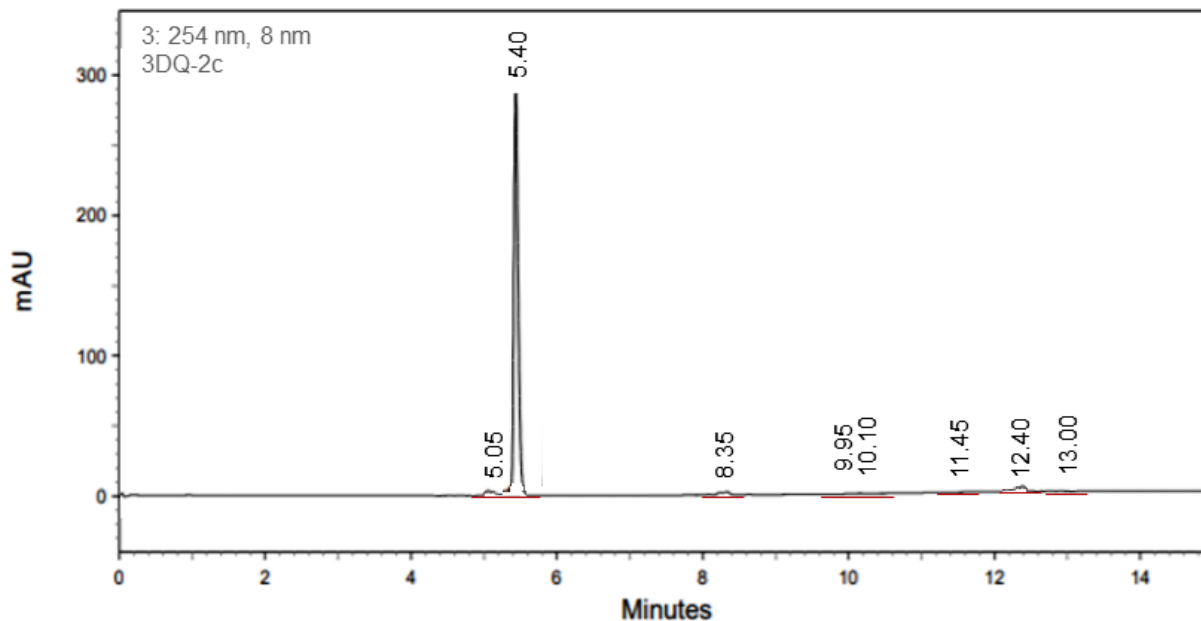
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
5.05	2425	7032	1.46
6.10	4784265	1489625	95.16
8.35	2365	6952	1.37
9.95	1631	5234	0.15
10.10	1324	4467	0.12
11.15	1464	4532	0.15
12.40	2651	7185	1.47
13.00	1524	4982	0.12

Слика ДМ293. HPLC спектар једињења **3DQ-1c**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DQ-2c
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-2c
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/11:25:32



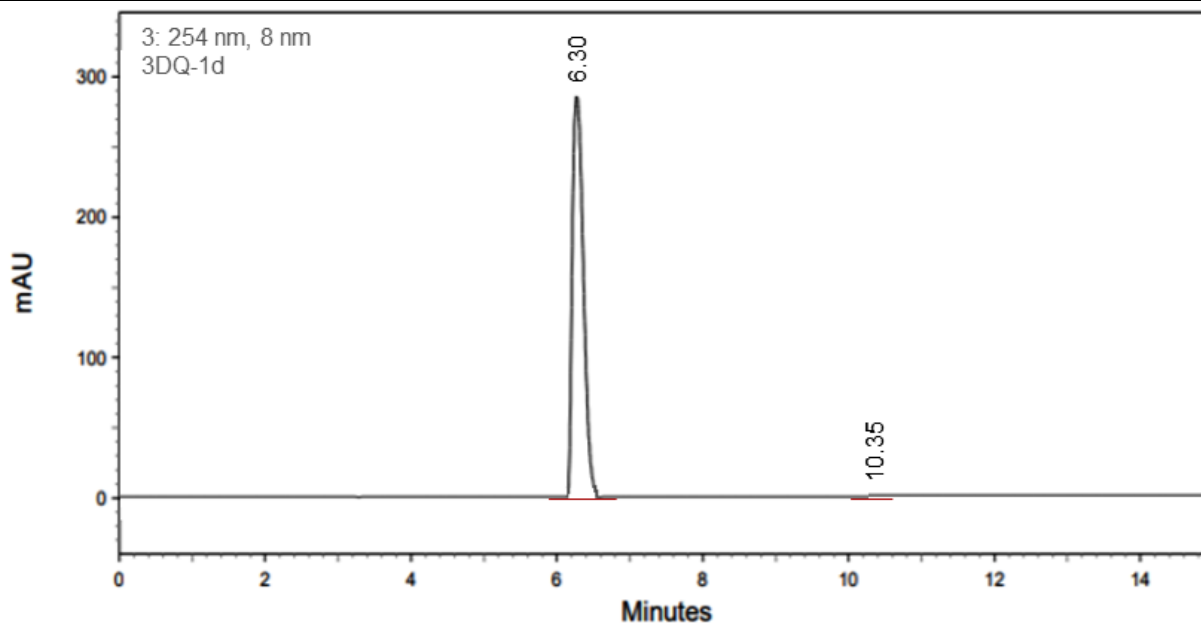
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
5.05	2422	7029	1.42
5.40	4784259	1489621	95.23
8.35	2361	6947	1.35
9.95	1629	5230	0.17
10.10	1321	4463	0.14
11.15	1467	4535	0.13
12.40	2647	7182	1.42
13.00	1523	4985	0.14

Слика ДМ294. HPLC спектар једињења 3DQ-2c.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DQ-1d
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-1d
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/11:50:41



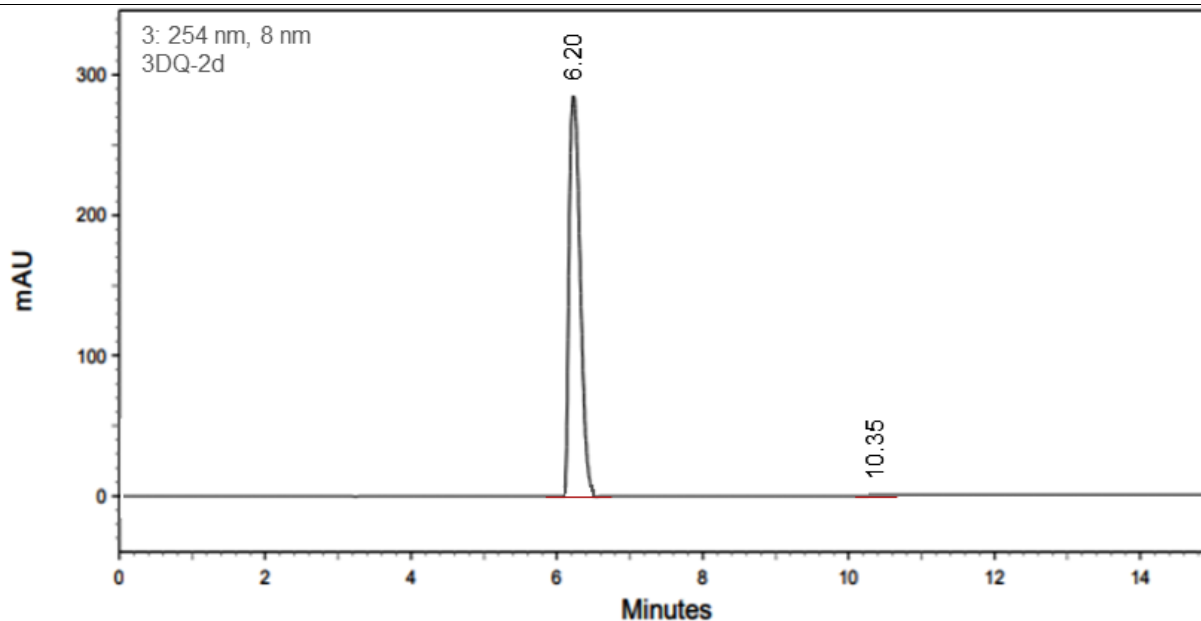
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
6.30	498521	1592535	99.67
10.35	1152	4369	0.23

Слика ДМ295. HPLC спектар једињења **3DQ-1d**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DQ-2d
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-2d
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/12:15:32



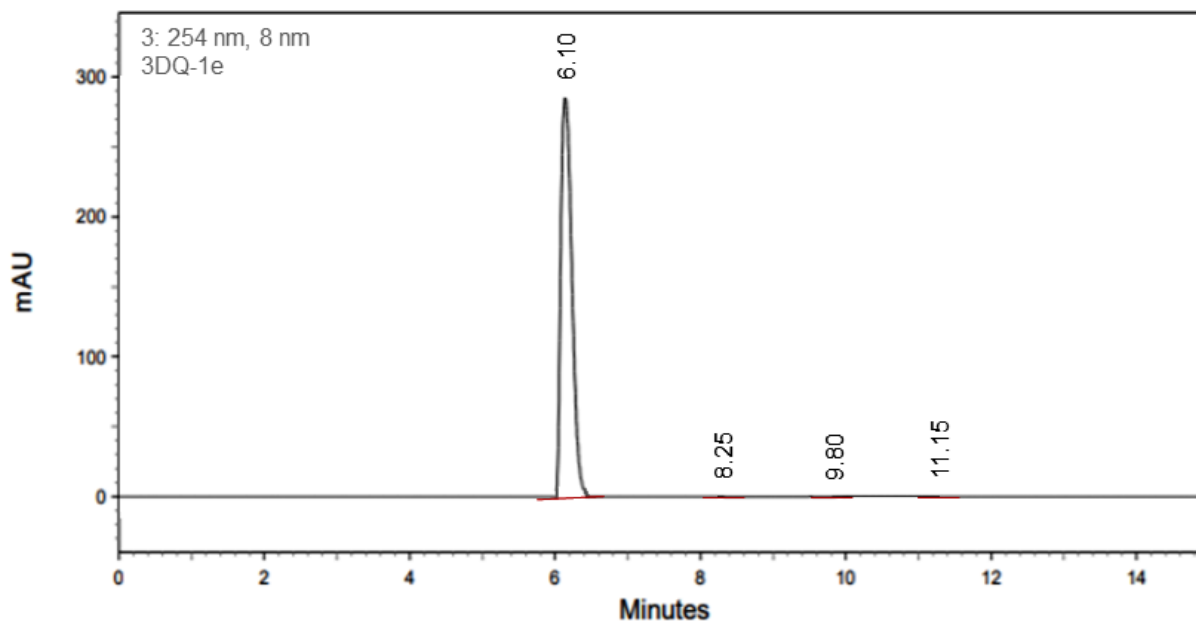
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
6.00	498562	1592581	99.65
10.35	1162	4366	0.25

Слика ДМ296. HPLC спектар једињења **3DQ-2d**.

HPLC REPORT

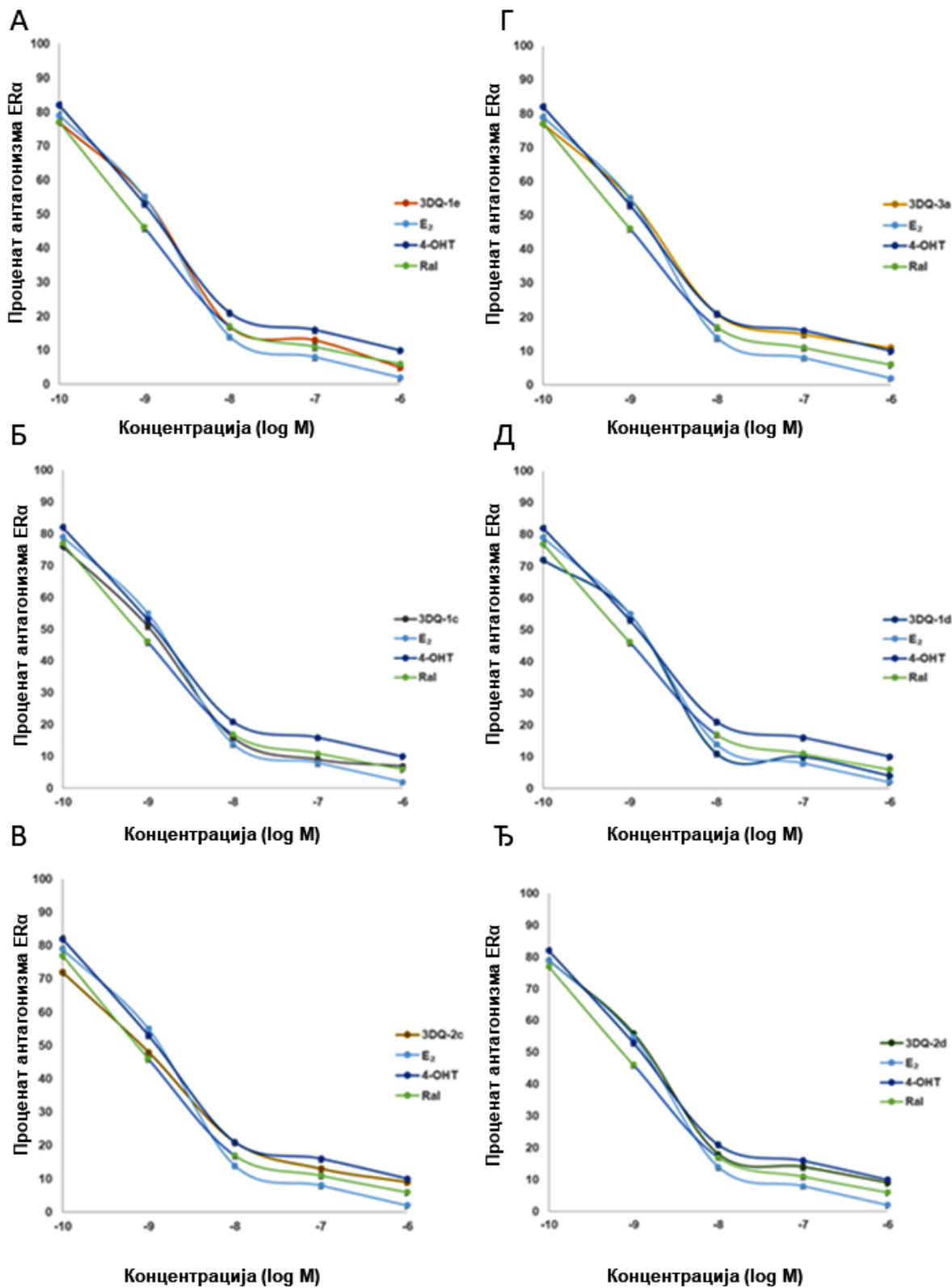
Compound ID : 3DQ-1e
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\August\3DQ-1e
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 8/30/2021/12:40:23



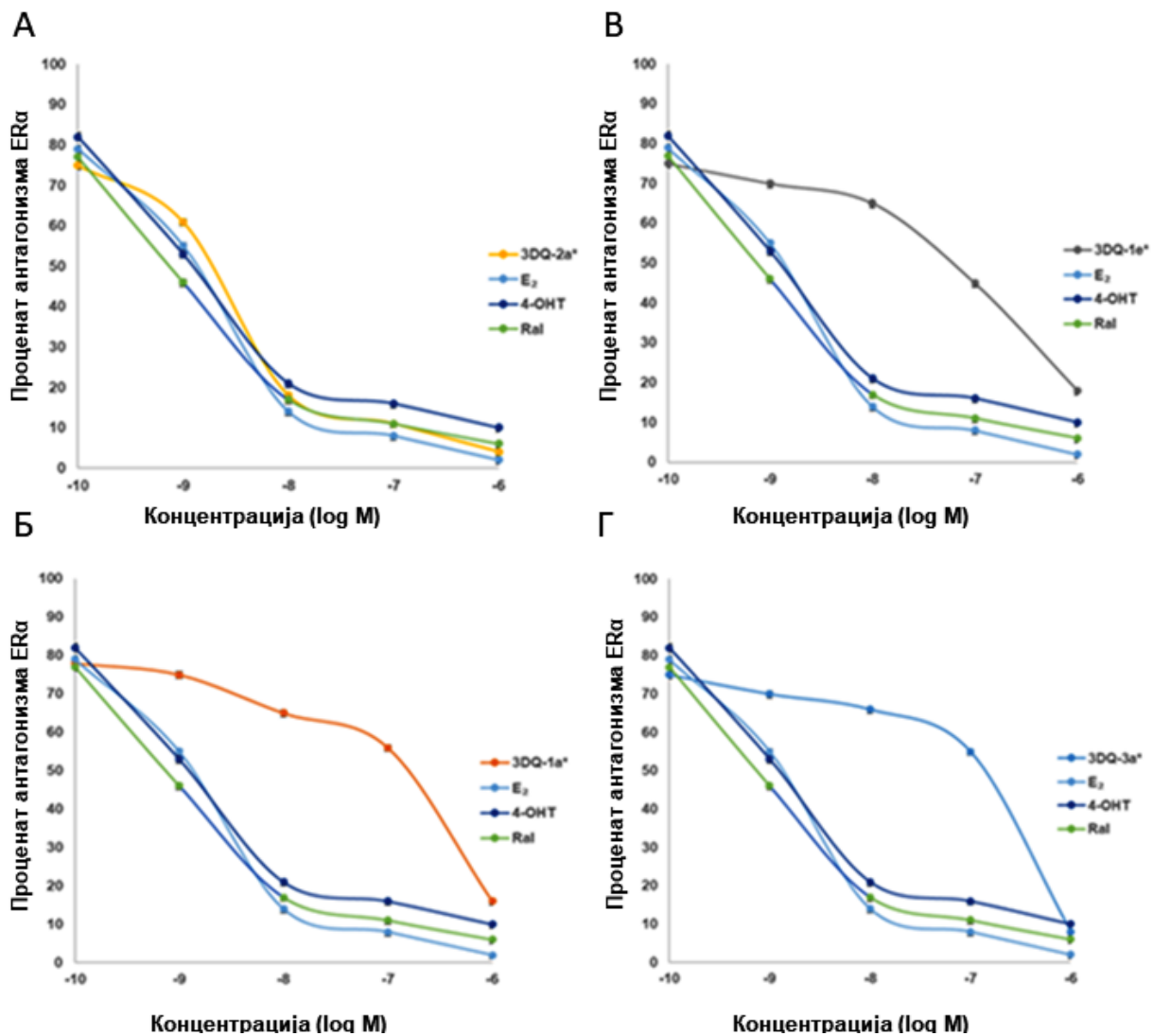
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
6.10	498525	1562841	99.51
8.25	1685	5185	0.14
9.80	1696	5111	0.18
11.15	1695	5185	0.17

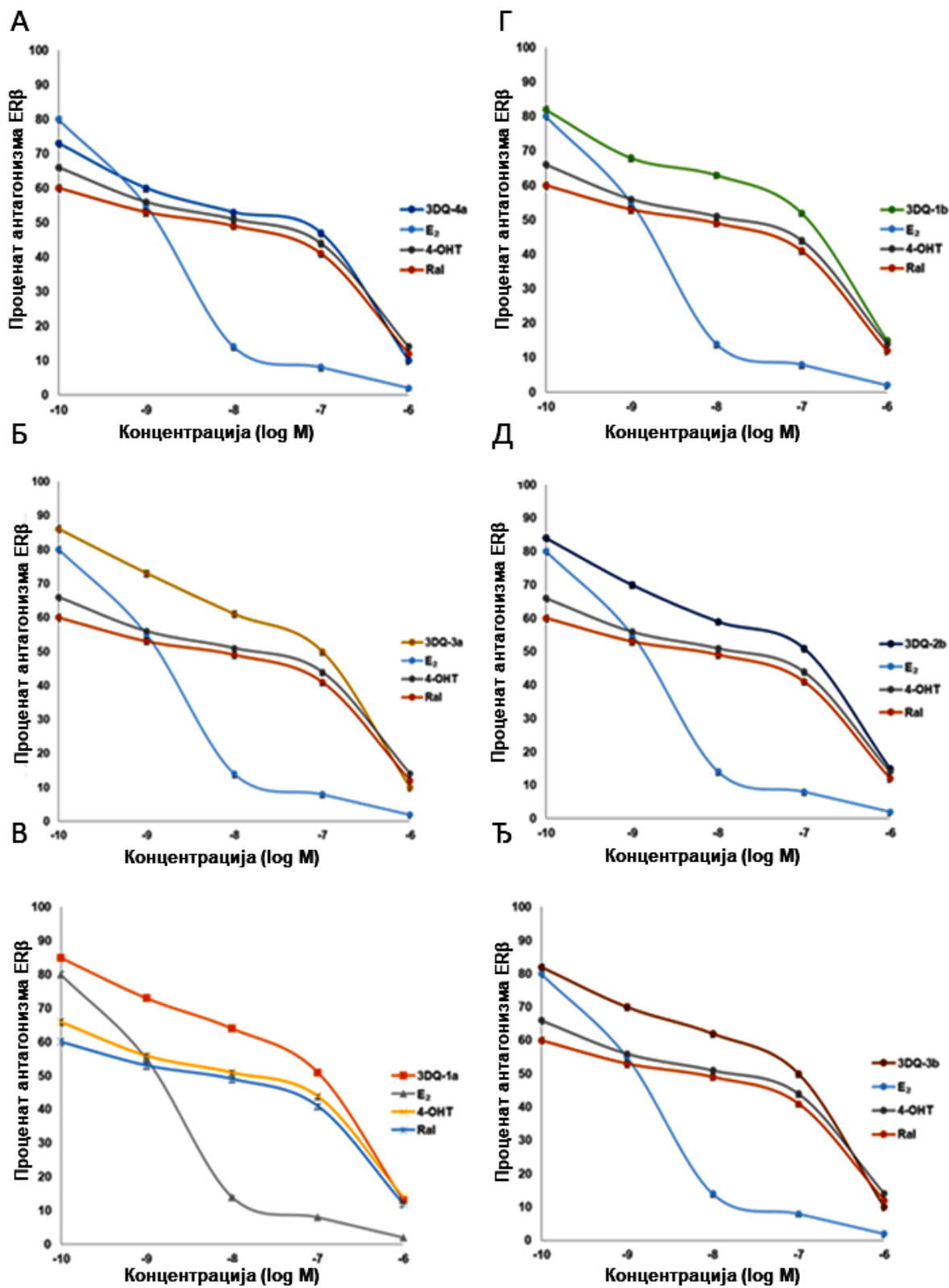
Слика ДМ297. HPLC спектар једињења **3DQ-1e**.



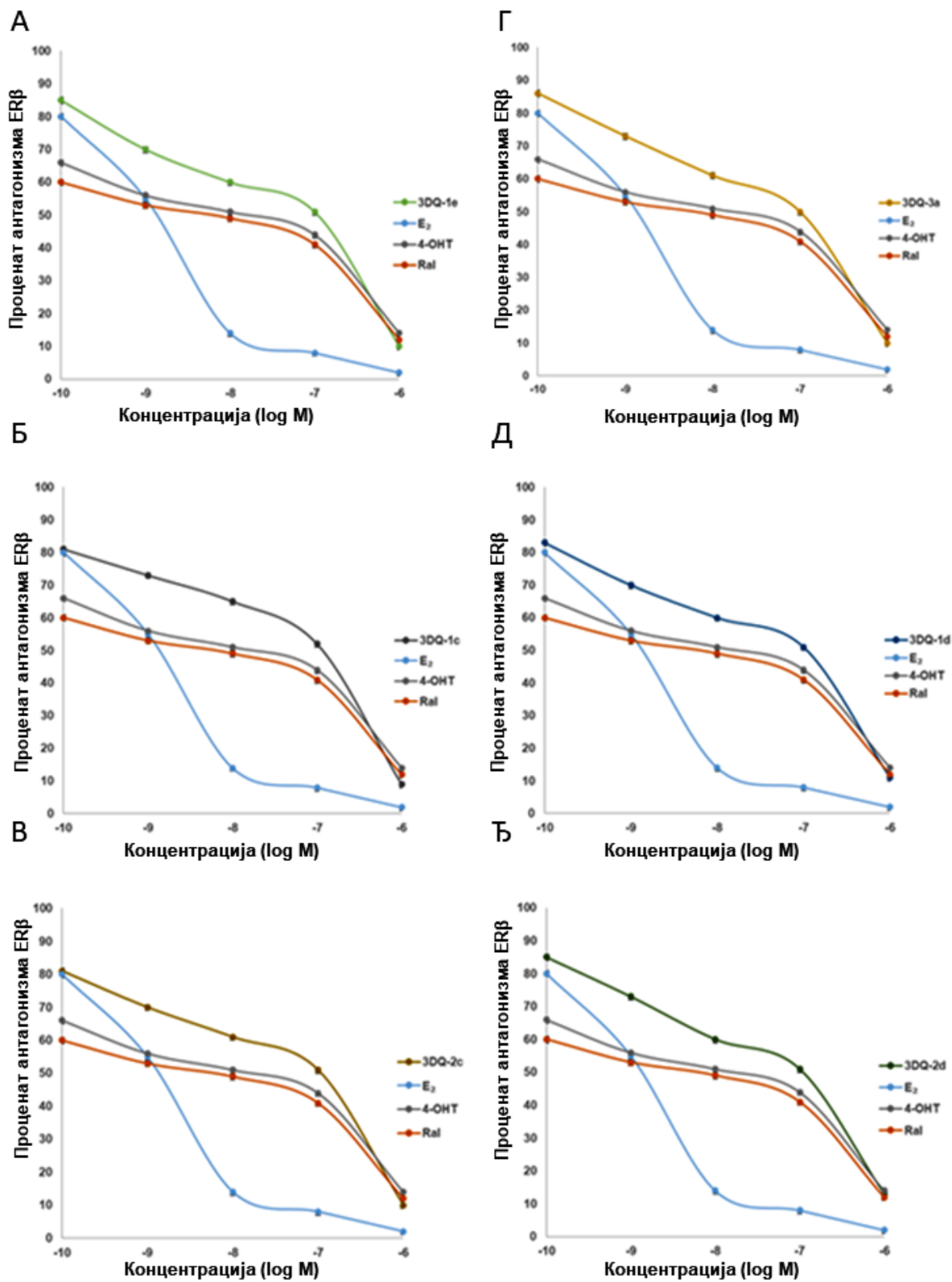
Слика ДМ298. Антагонизам естроген репептора α у присуству 3DQ-1e (А); 3DQ-1c (Б); 3DQ-2c (В); 3DQ-3a (Г); 3DQ-1d (Д); 3DQ-2d (Ђ).



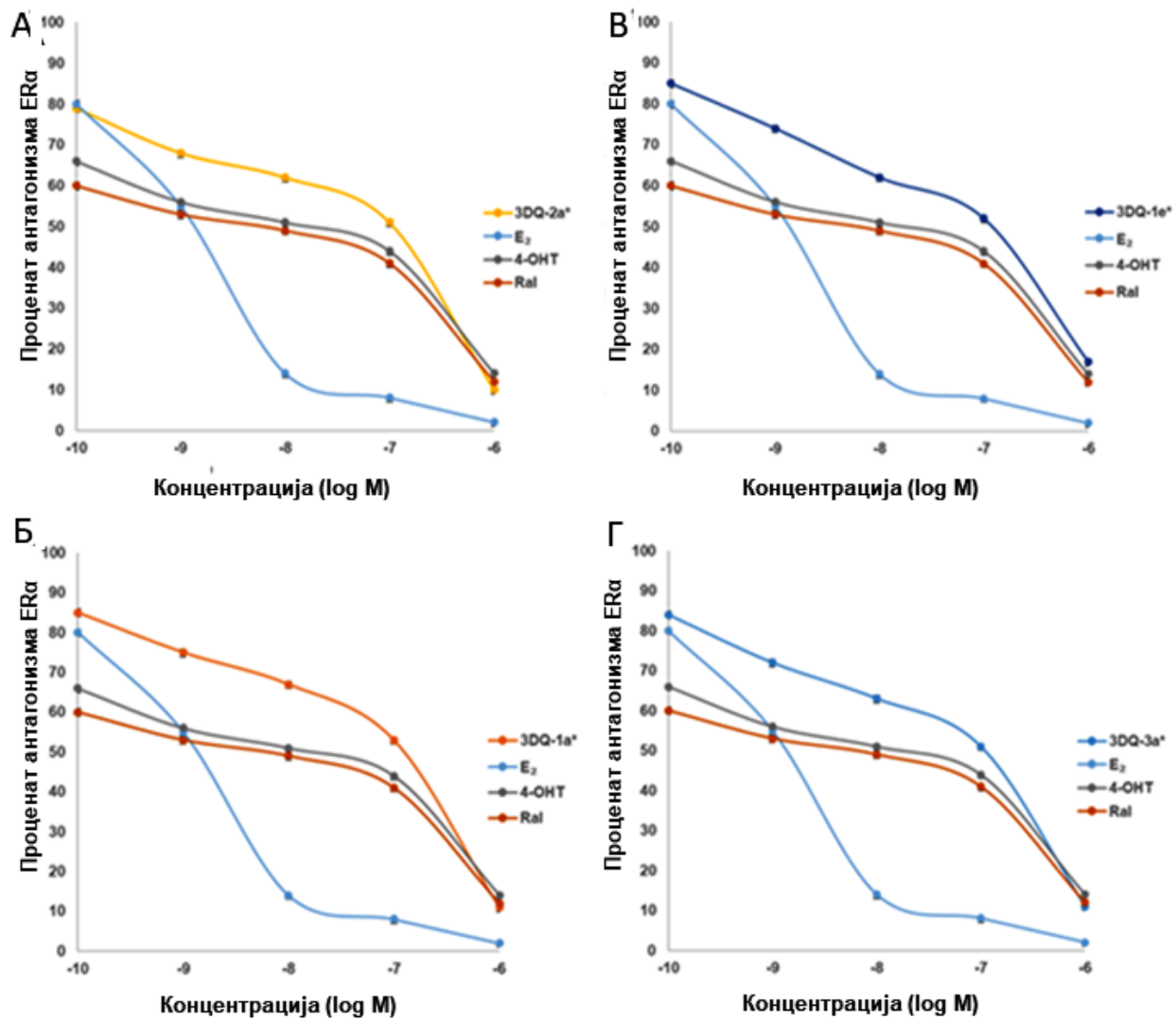
Слика ДМ299. Антагонизам естроген репептора α у присуству **3DQ-2a*** (А); **3DQ-1a*** (Б); **3DQ-1e*** (В); **3DQ-3a*** (Г).



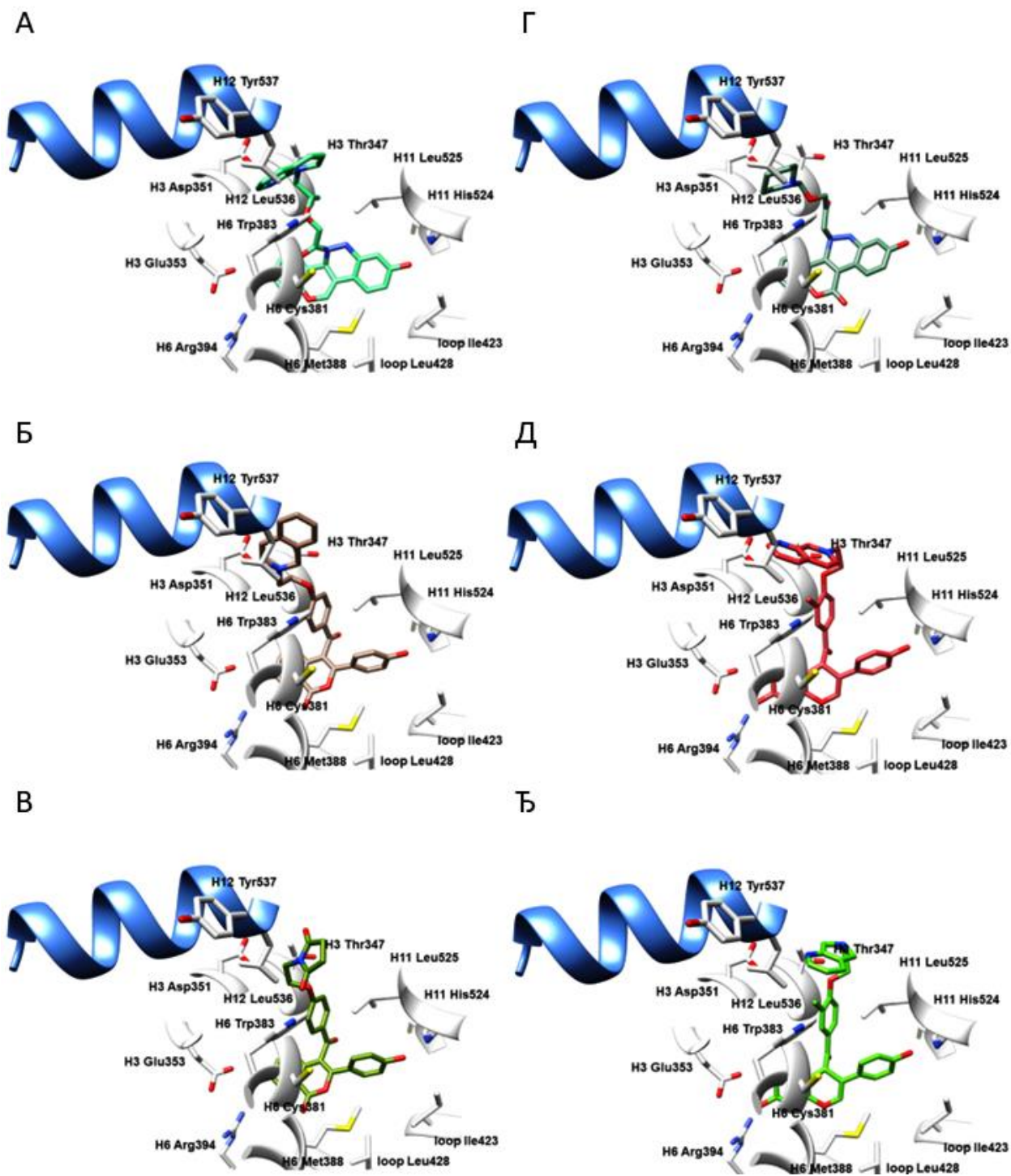
Слика ДМ300. Антагонизам естроген репептора β у присуству 3DQ-4а (А); 3DQ-2а (Б); 3DQ-1а (В); 3DQ-1б (Г); 3DQ-2б (Д); 3DQ-3б (Ѕ).



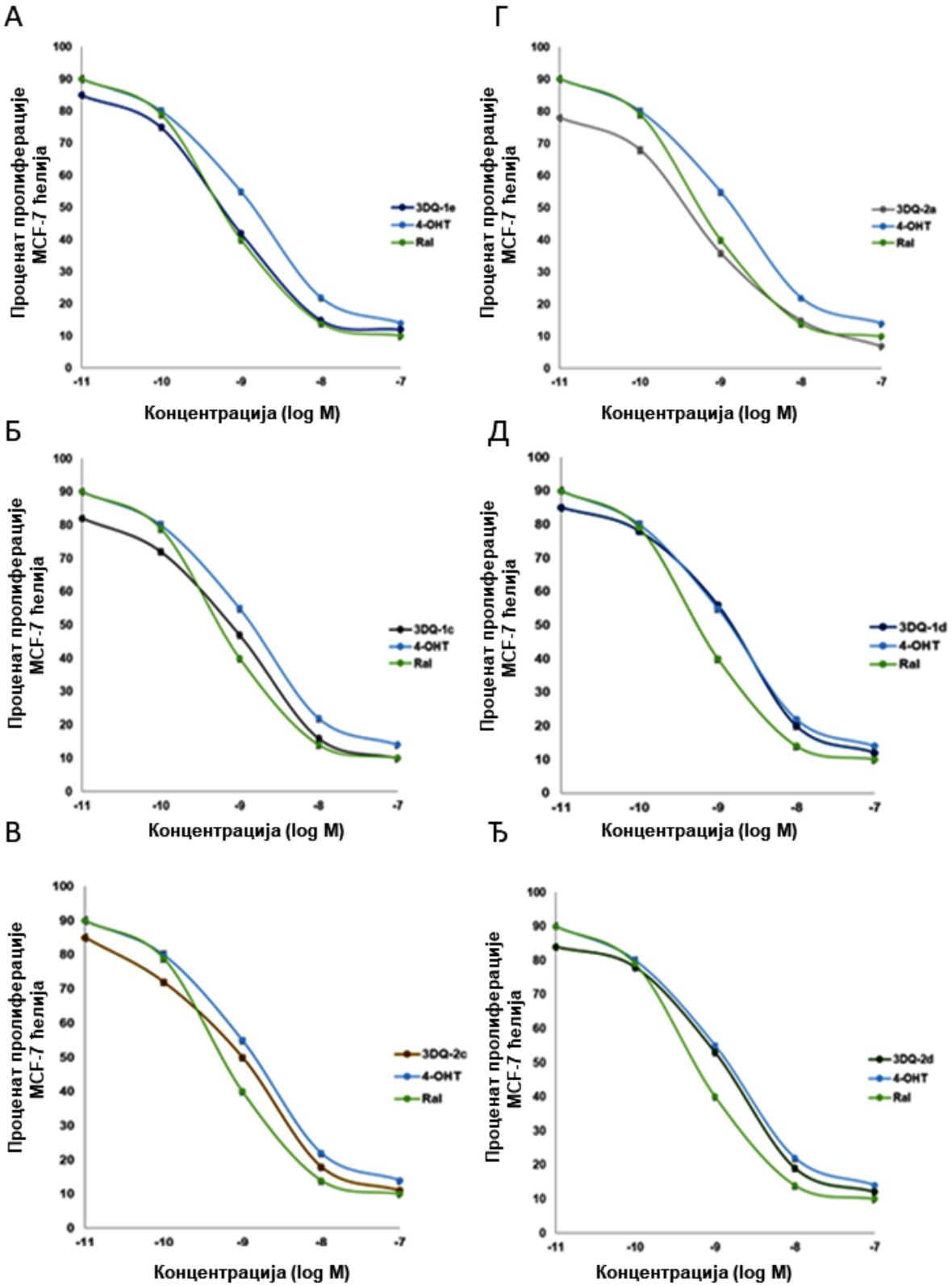
Слика ДМ301. Антагонизам естроген репептора β у присуству 3DQ-1e (А); 3DQ-1c (Б); 3DQ-2c (В); 3DQ-3a (Г); 3DQ-1d (Д); 3DQ-2d (Е).



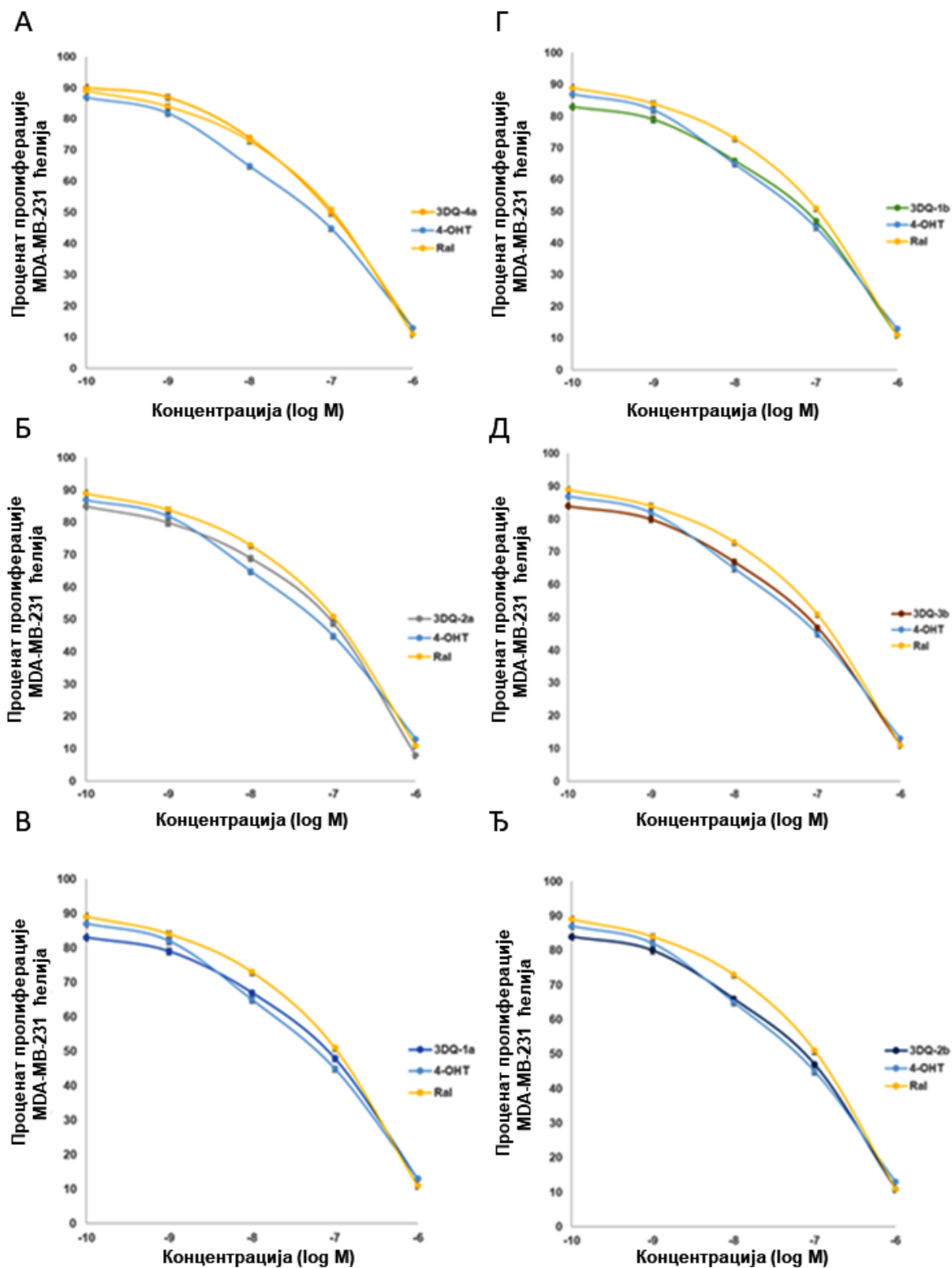
Слика ДМ302. Антагонизам естроген репептора β у присуству 3DQ-2a* (А); 3DQ-1a* (Б); 3DQ-1e* (В); 3DQ-3a* (Г) .



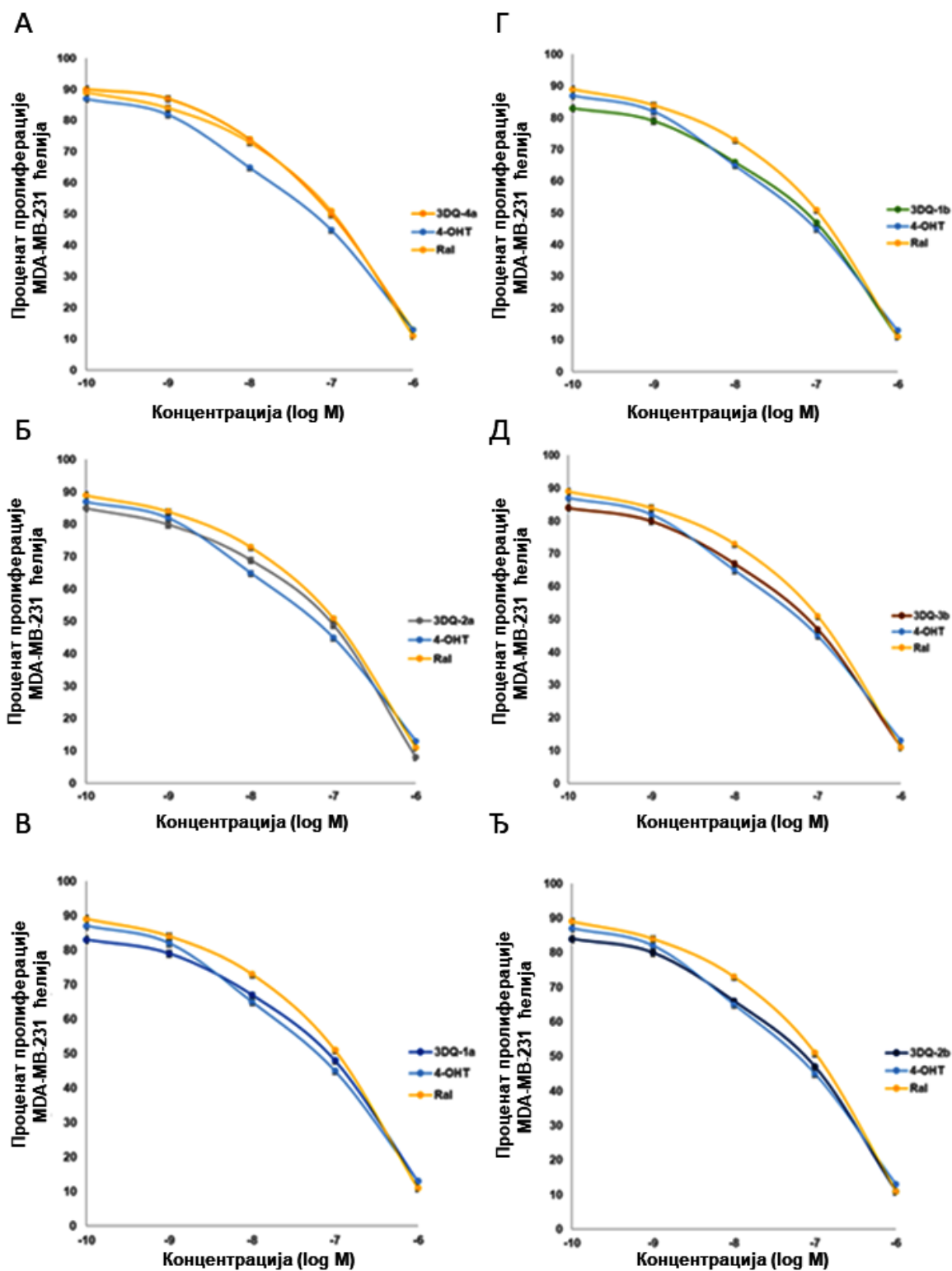
Слика ДМ303. Биоактивне конформације **3DQ-1e** (А); **3DQ-1c** (Б); **3DQ-2c** (В); **3DQ-3a** (Г); **3DQ-1d** (Д); **3DQ-2d** (Ђ) унутар активног центра ER α . Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



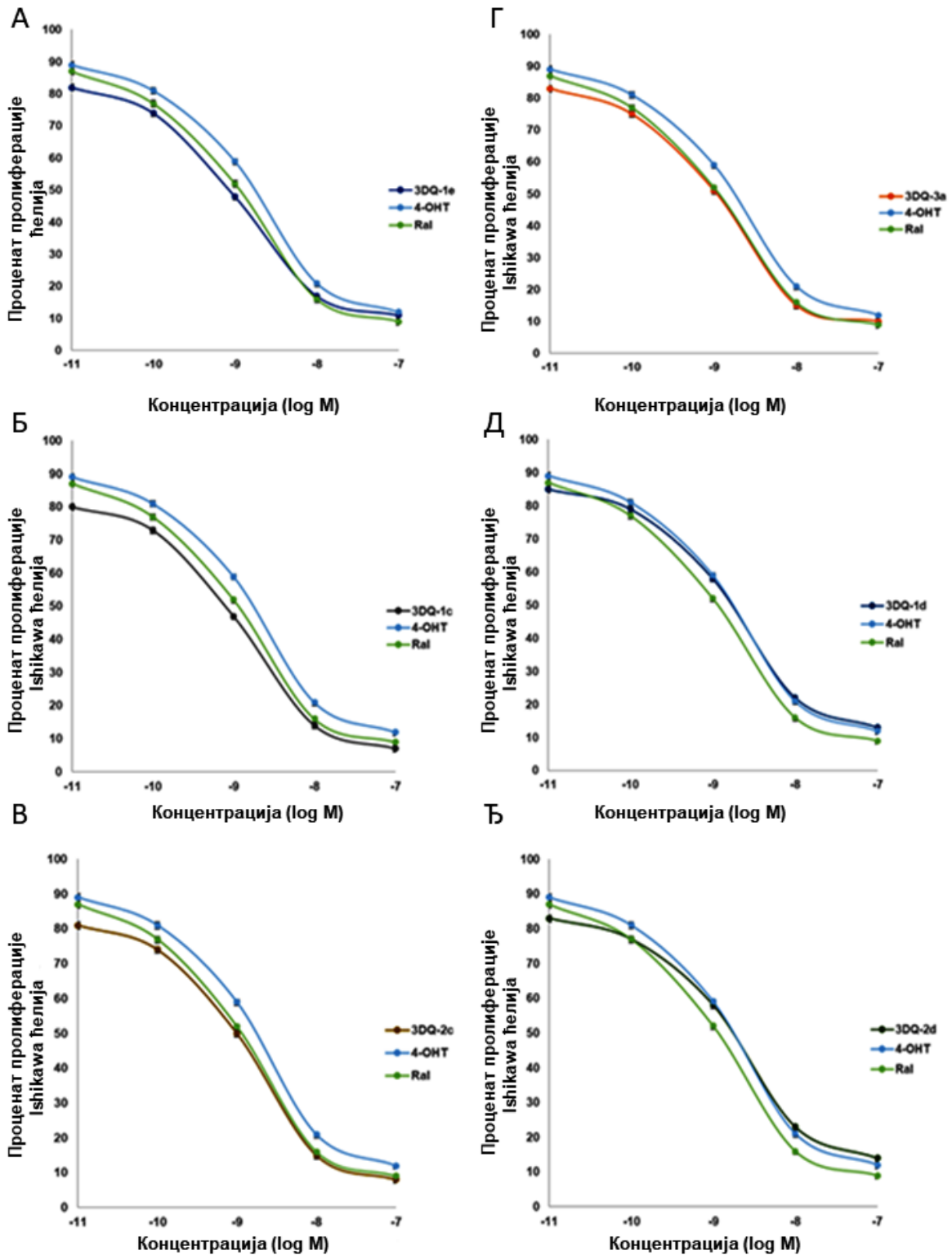
Слика ДМ304. Антипролиферативна активност **3DQ-1e** (А); **3DQ-1c** (Б); **3DQ-2c** (В); **3DQ-3a** (Г); **3DQ-1d** (Д); **3DQ-2d** (Ђ) против MCF-7 cell ћелијских линија.



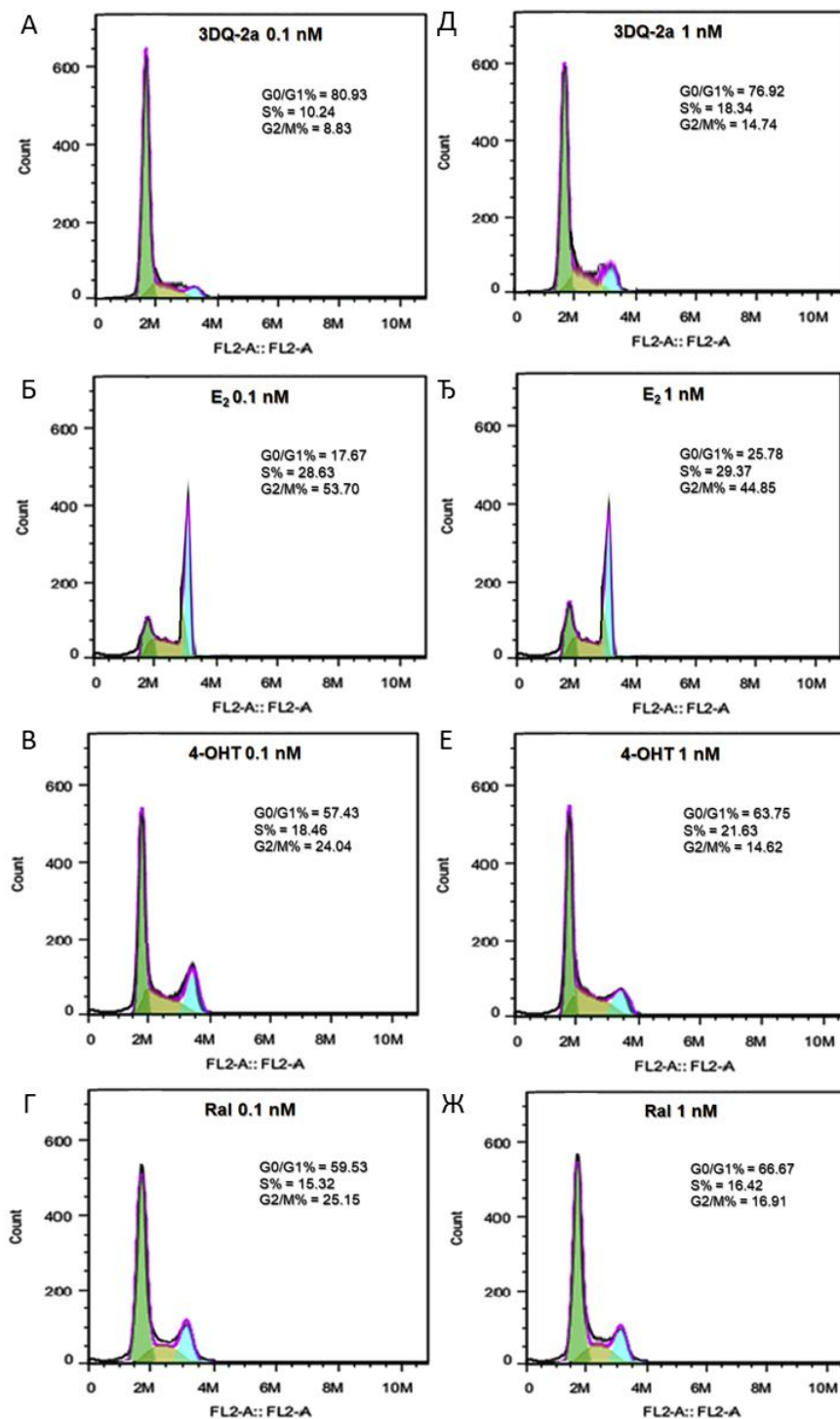
Слика ДМ305. Антипролиферативна активност **3DQ-4a** (А); **3DQ-2a** (Б); **3DQ-1a** (В); **3DQ-1b** (Г); **3DQ-2b** (Д); **3DQ-3b** (Ђ) против MDA-MB-231 ћелијских линија.



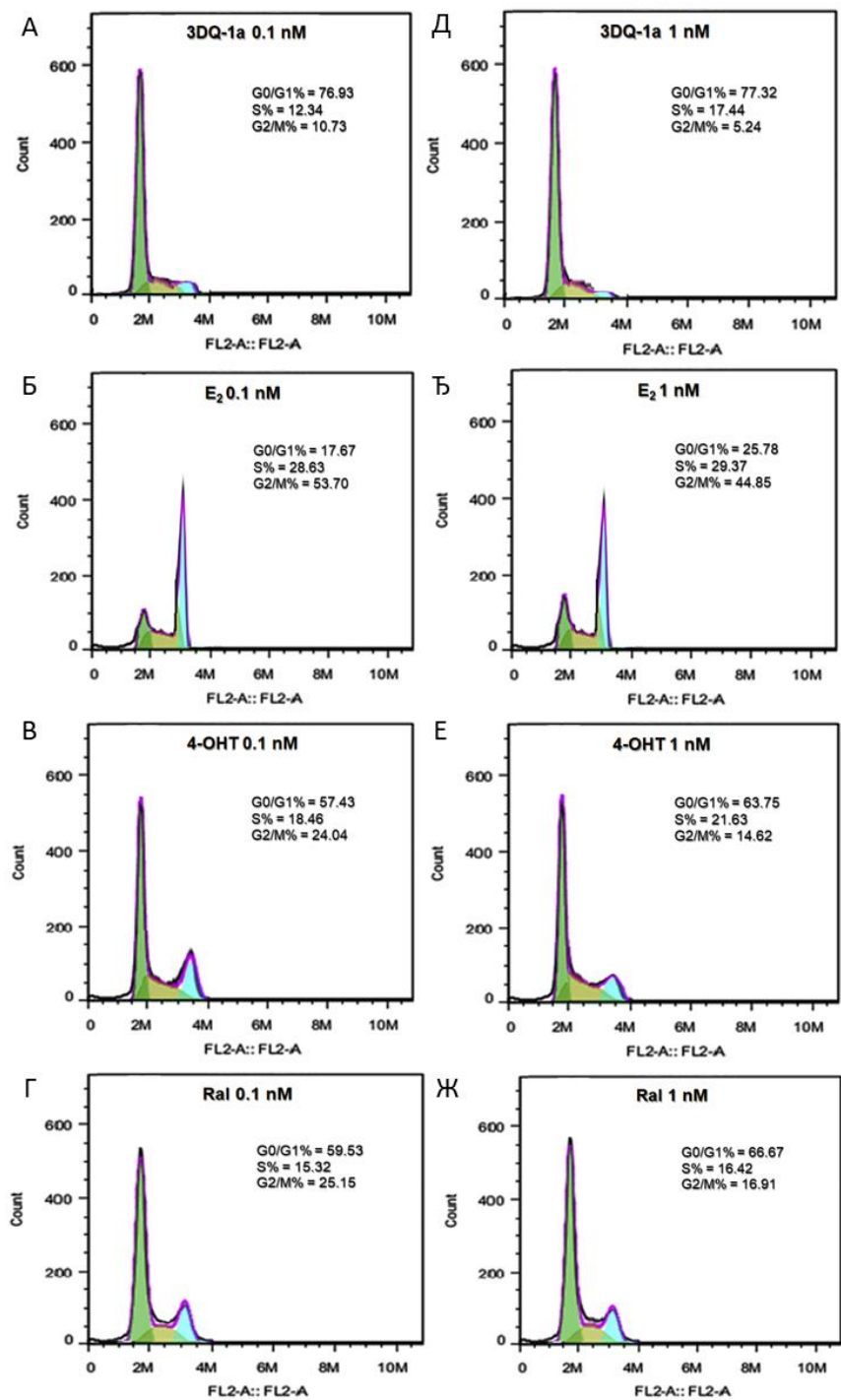
Слика ДМ306. Антипролиферативна активност 3DQ-1e (А); 3DQ-1c (Б); 3DQ-2c (В); 3DQ-3a (Г); 3DQ-1d (Д); 3DQ-2d (Ђ) против MDA-MB-231 ћелијских линија.



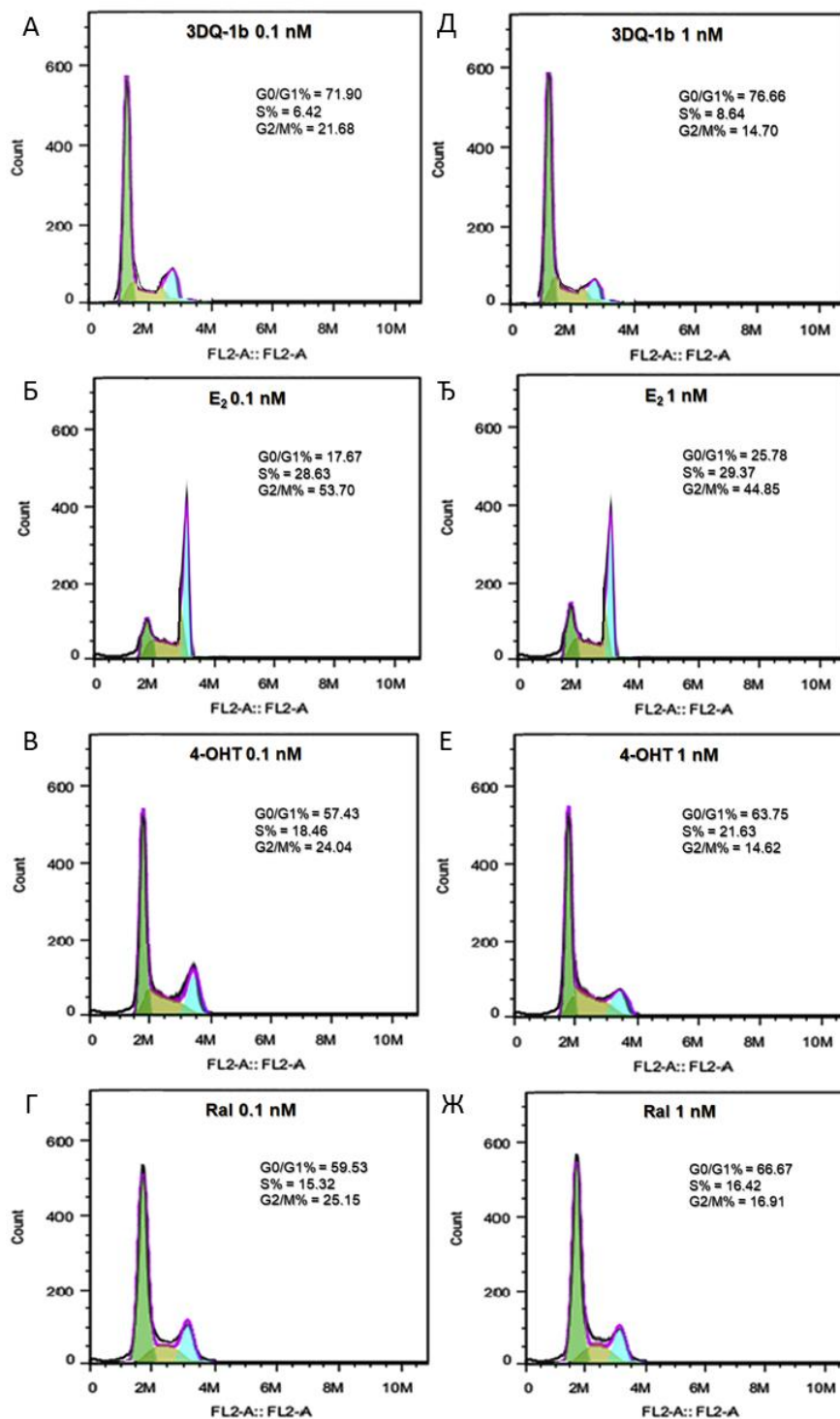
Слика ДМ307. Антипролиферативна активност **3DQ-1e** (А); **3DQ-1c** (Б); **3DQ-2c** (В); **3DQ-3a** (Г); **3DQ-1d** (Д); **3DQ-2d** (Ђ) против Ishikawa ћелијских линија.



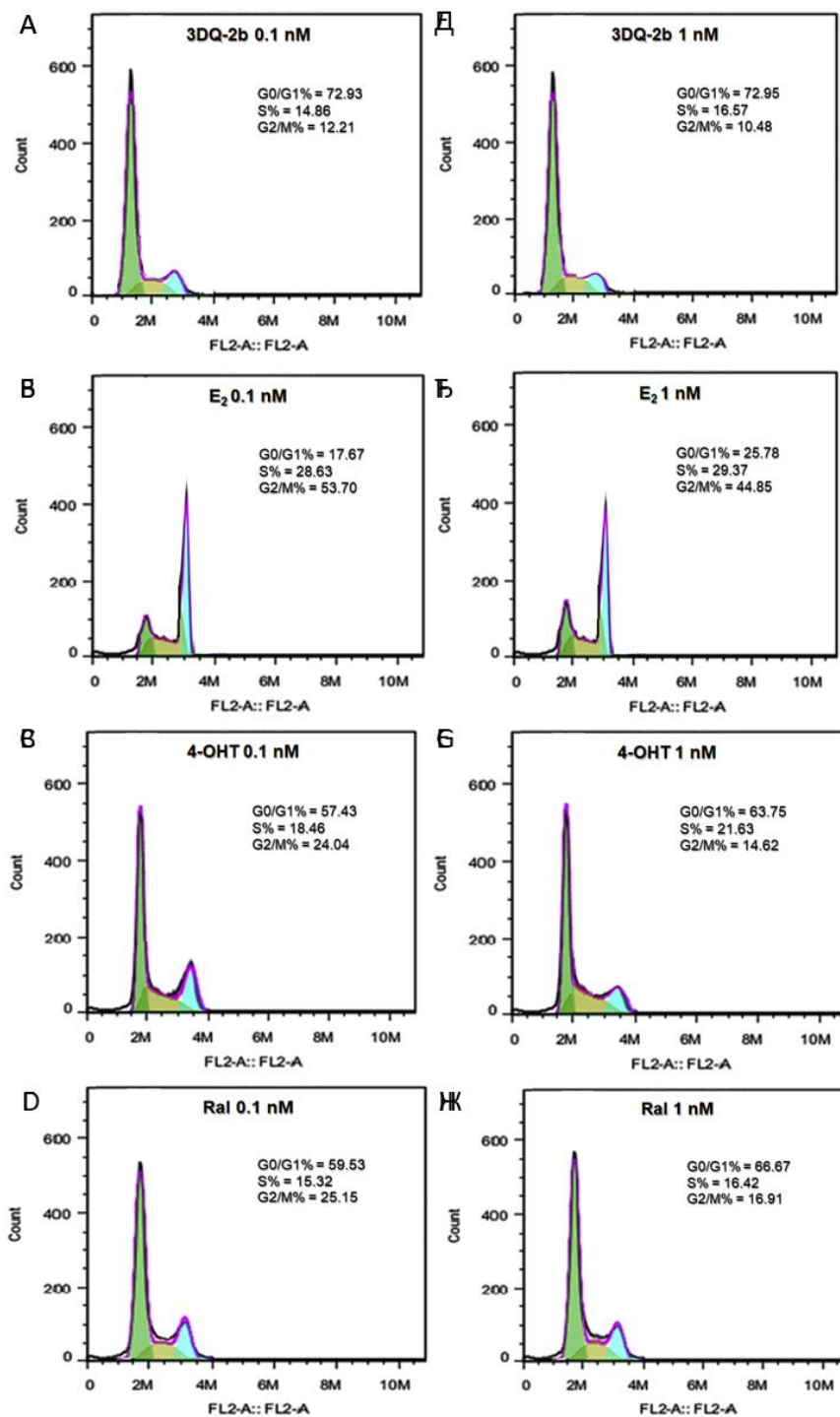
Слика ДМ308. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-2a** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-2a** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



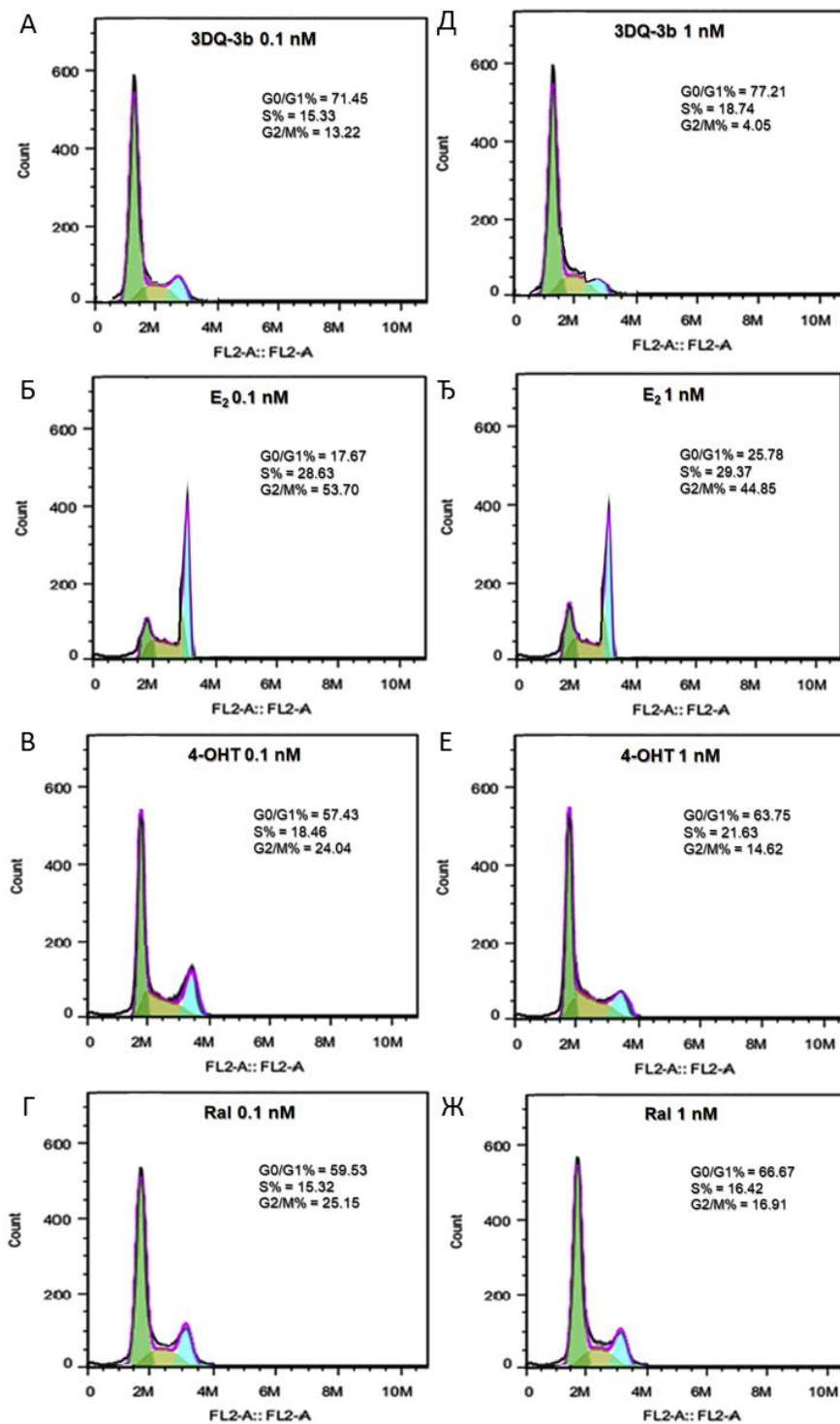
Слика ДМ309. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-1a** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-1a** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Е); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Ж); **Ral** у концентрацији од 1 nM (З).



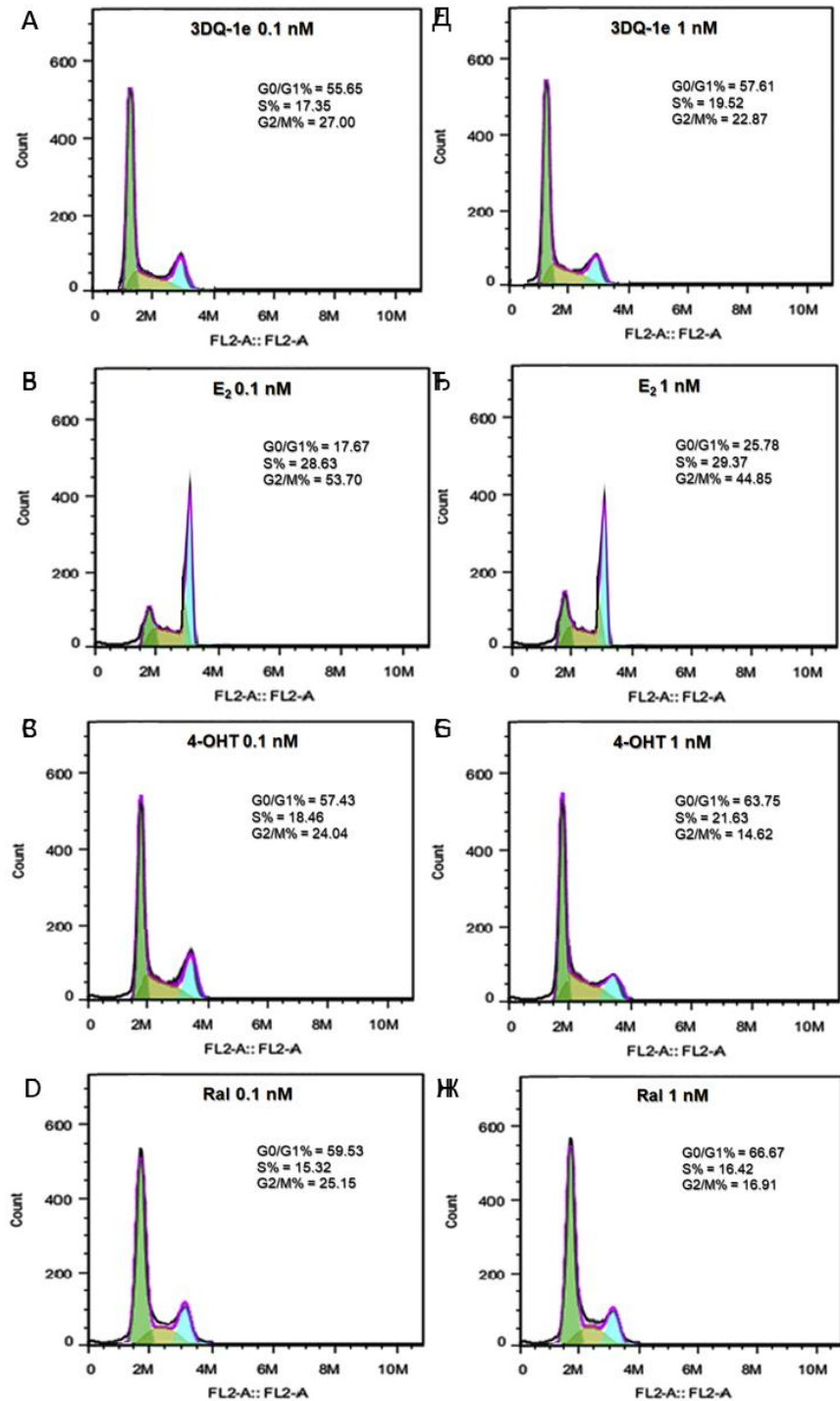
Слика ДМ310. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-1b** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-1b** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



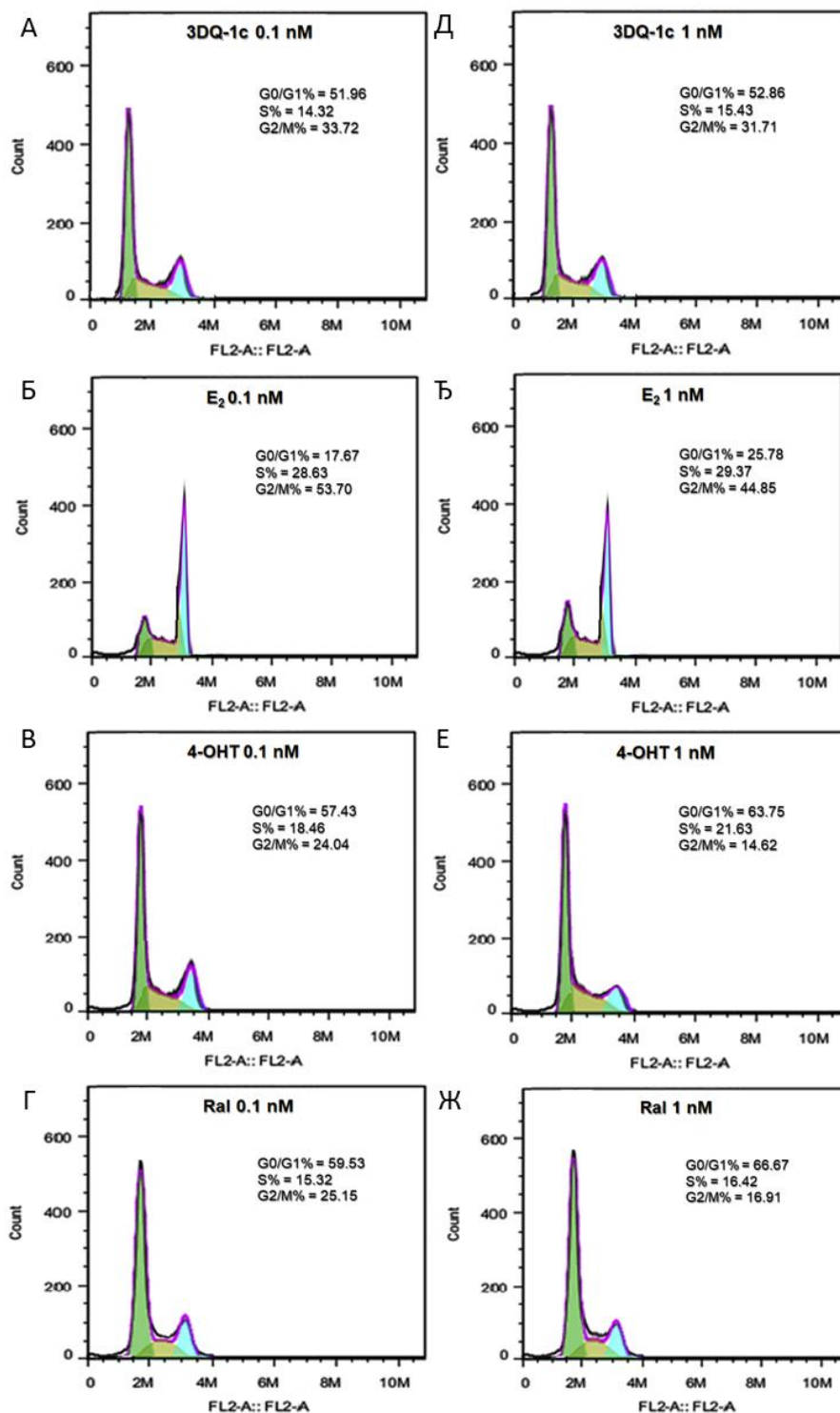
Слика ДМ311. Анализа ћелијског циклуса МСF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-2b** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-2b** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Е); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Ж); **Ral** у концентрацији од 1 nM (З).



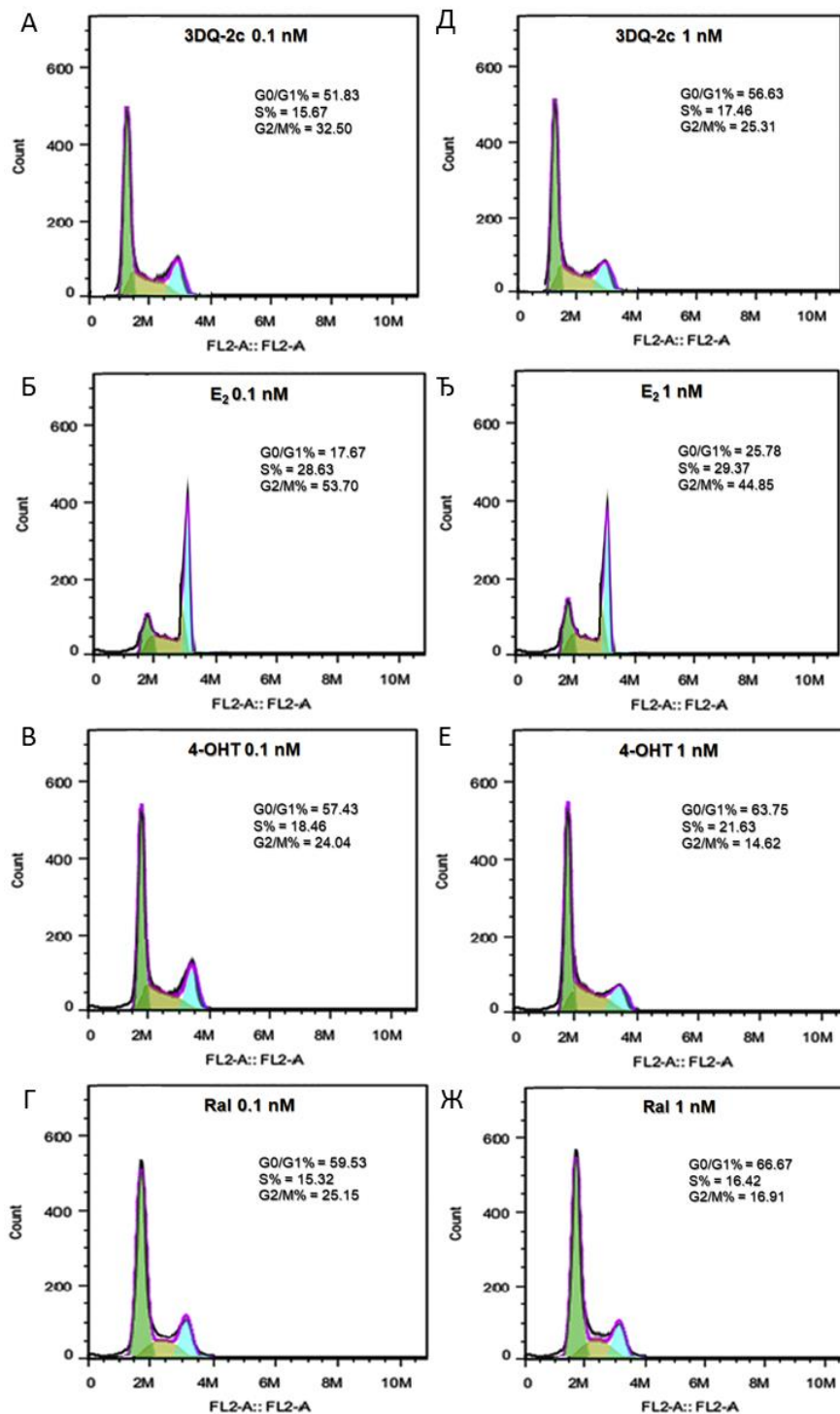
Слика ДМ312. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-3b** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (B); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-3b** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (E); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



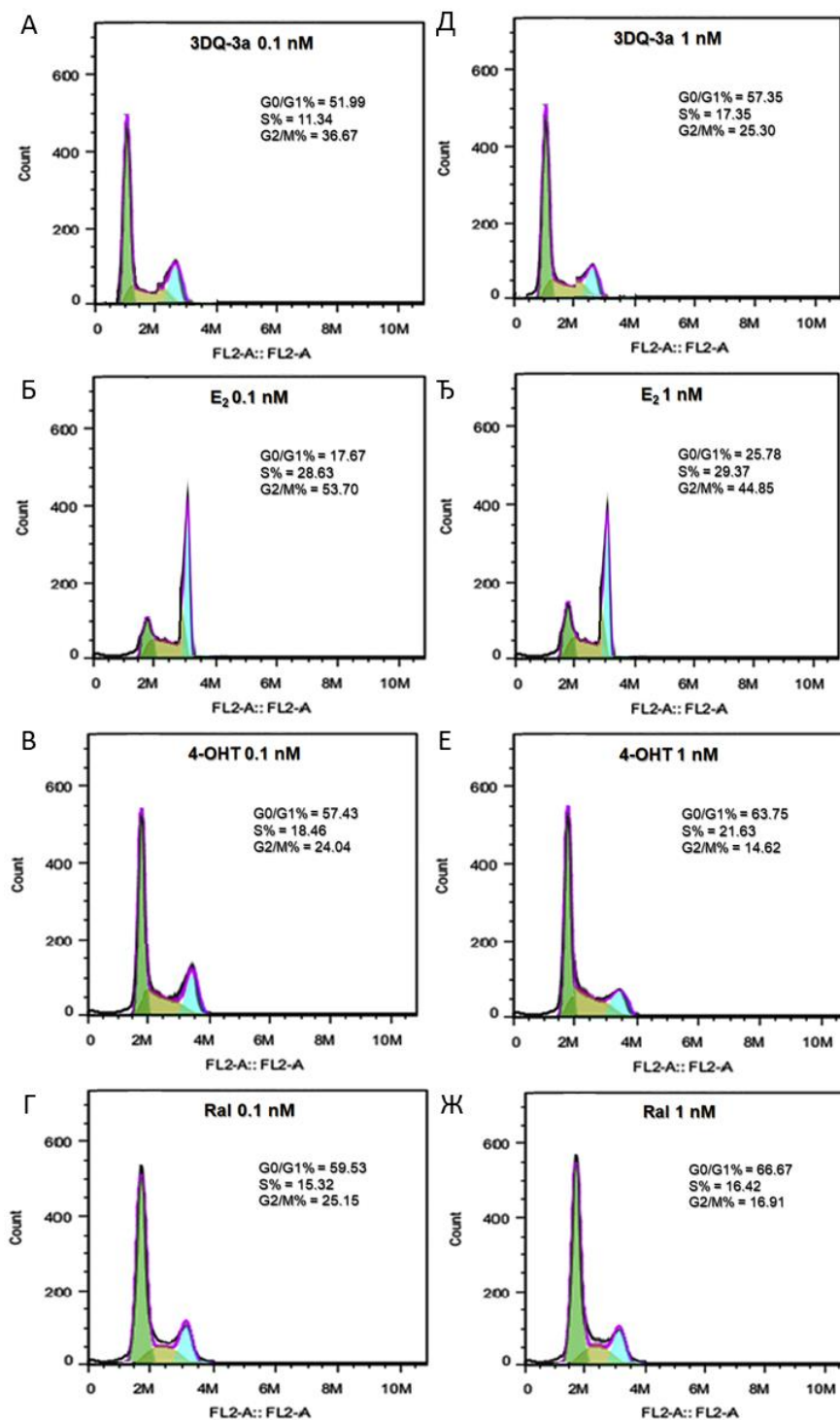
Слика ДМ313. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-1e** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-1e** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Е); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Ж); **Ral** у концентрацији од 1 nM (З).



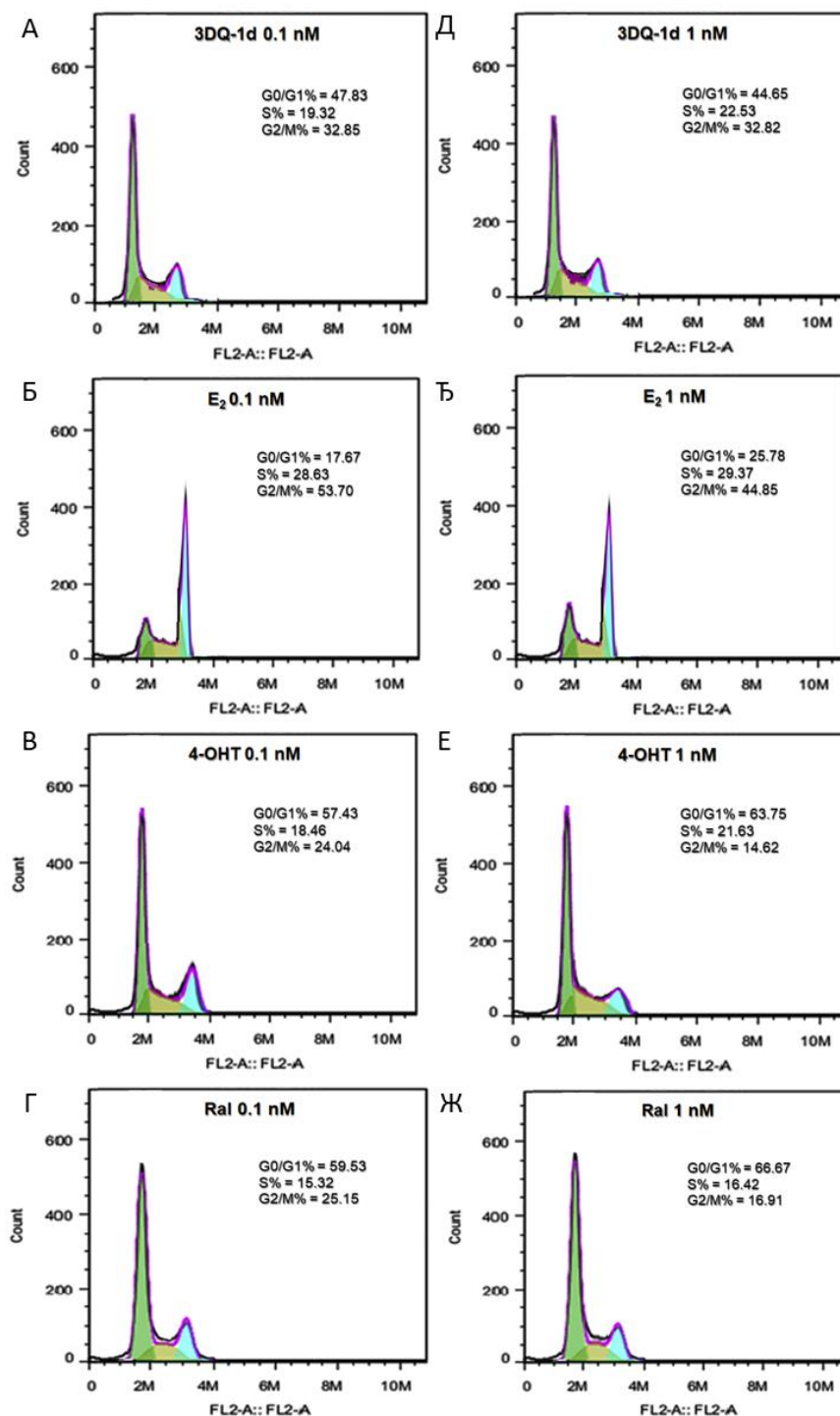
Слика ДМ314. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-1c** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-1c** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



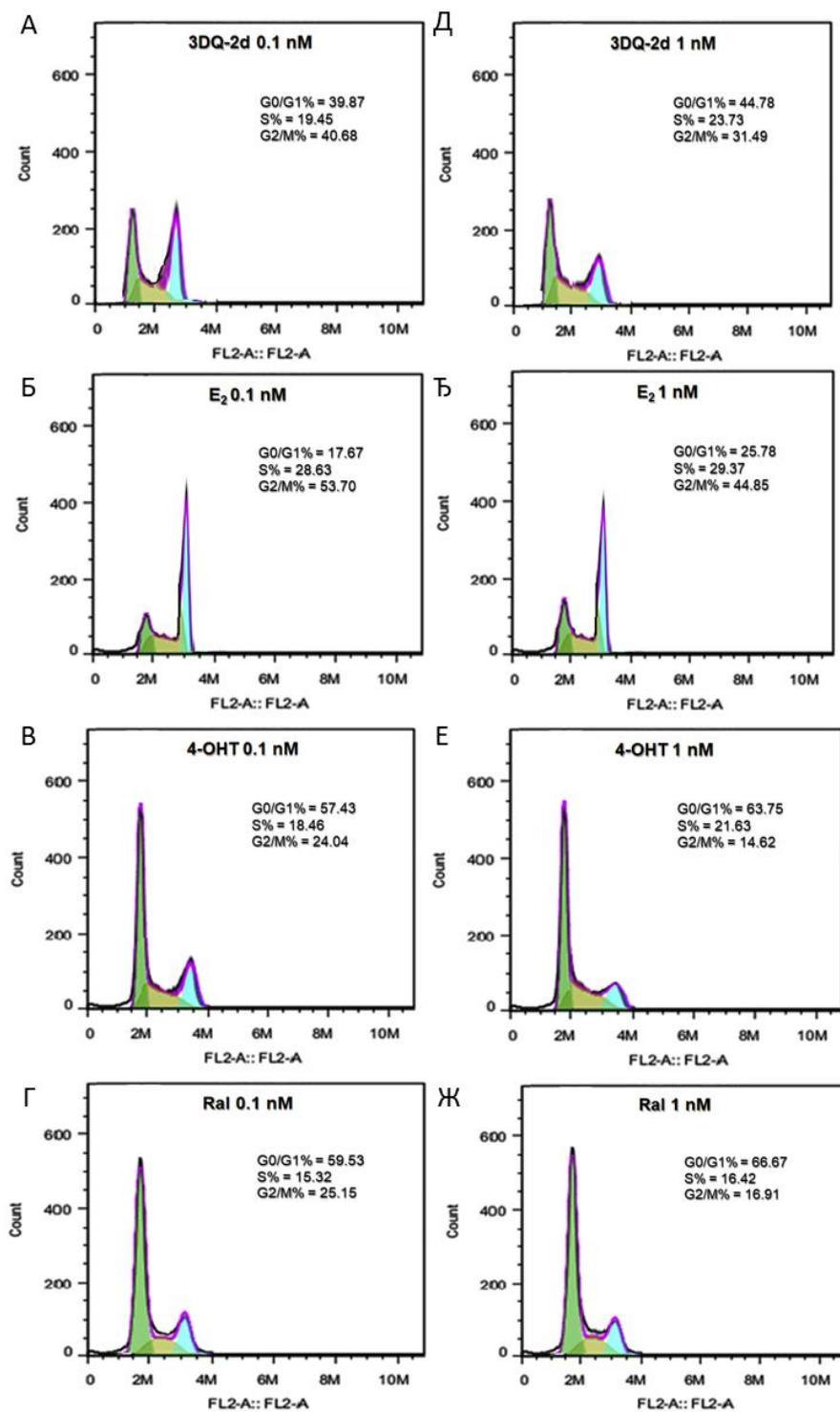
Слика ДМ315. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-2c** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-2c** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



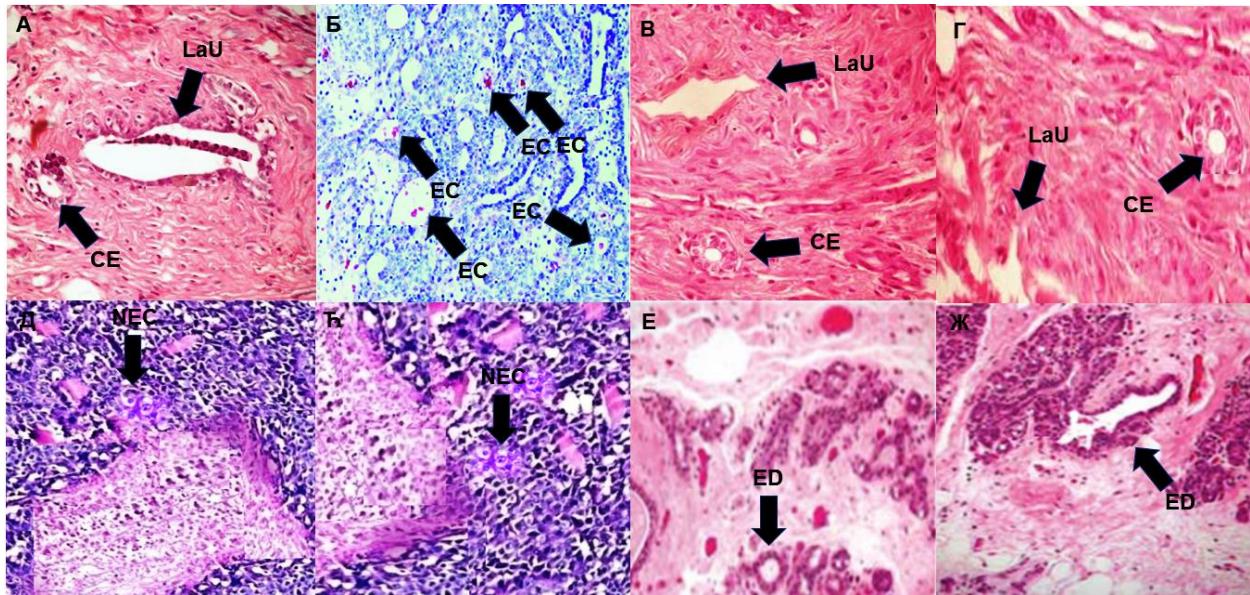
Слика ДМ316. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-3a** у концентрацији од 1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 10 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-3a** у концентрацији од 10 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



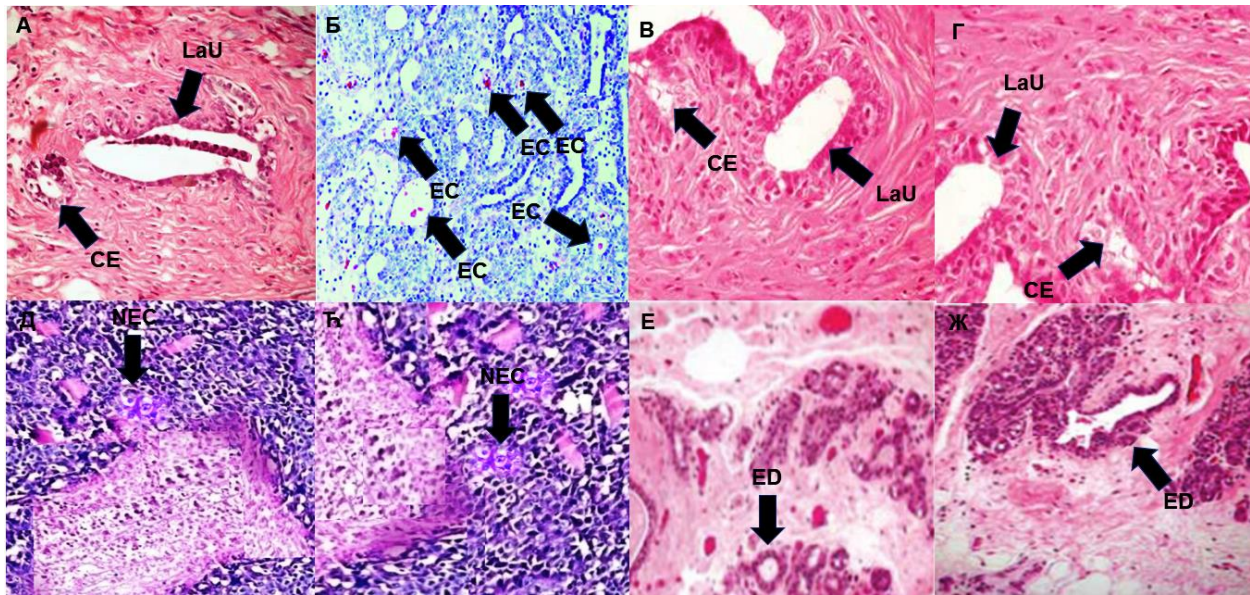
Слика ДМ317. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-1d** у концентрацији од 1 nM (A); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-1d** у концентрацији од 10 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



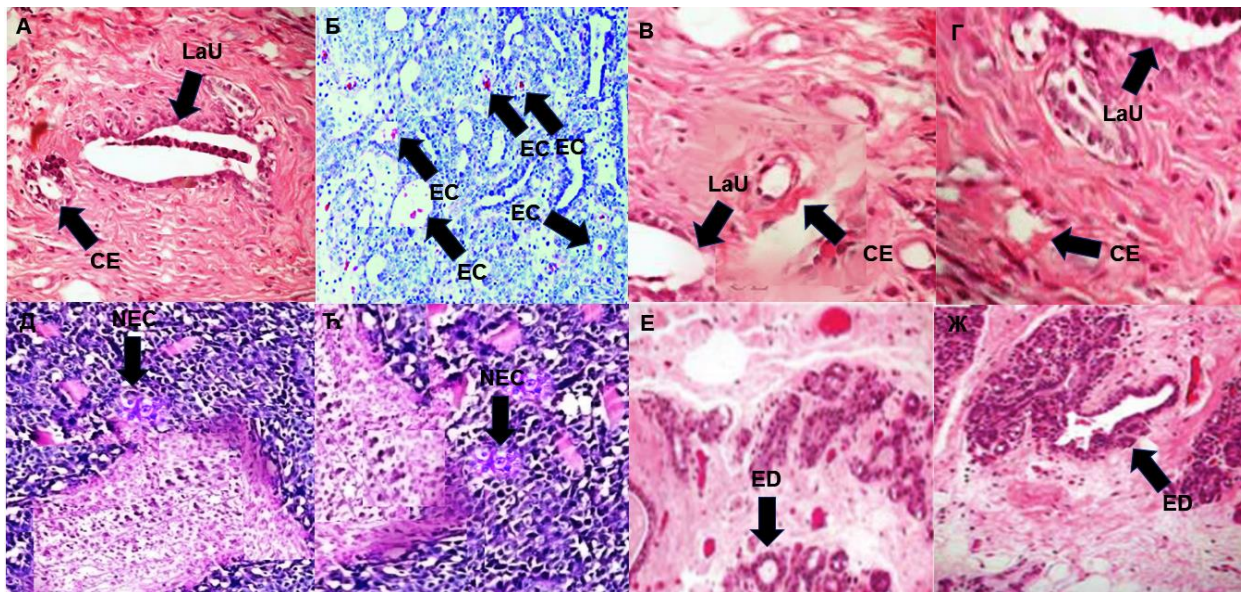
Слика ДМ318. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DQ-2d** у концентрацији од 1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DQ-2d** у концентрацији од 10 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



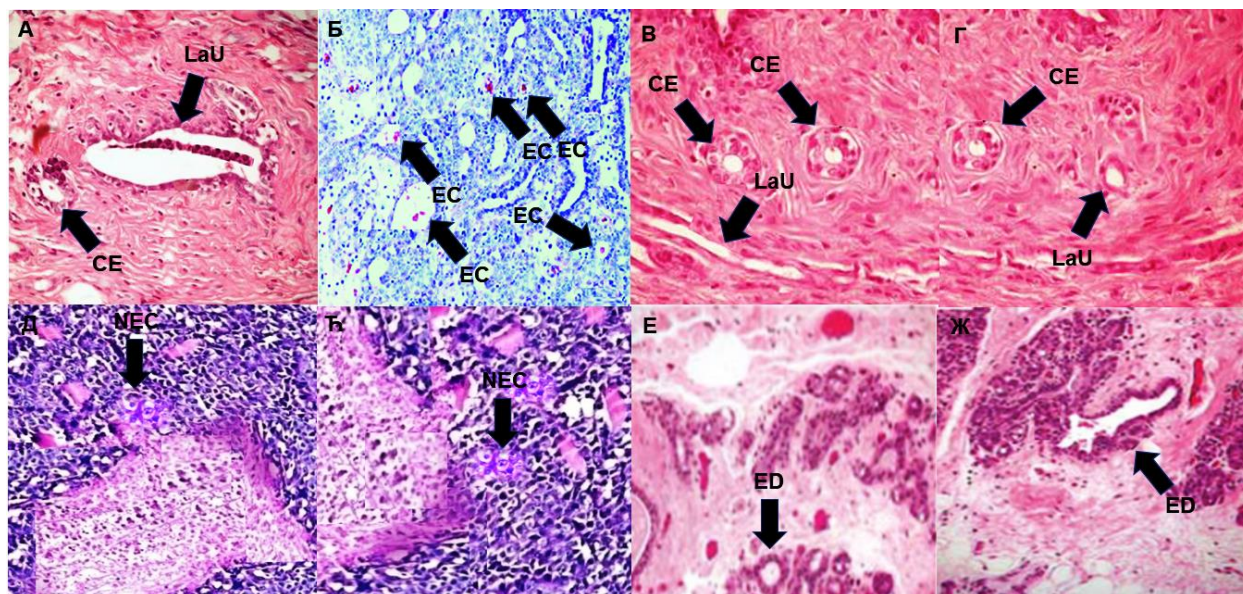
Слика ДМ319. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-2a** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-2a** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



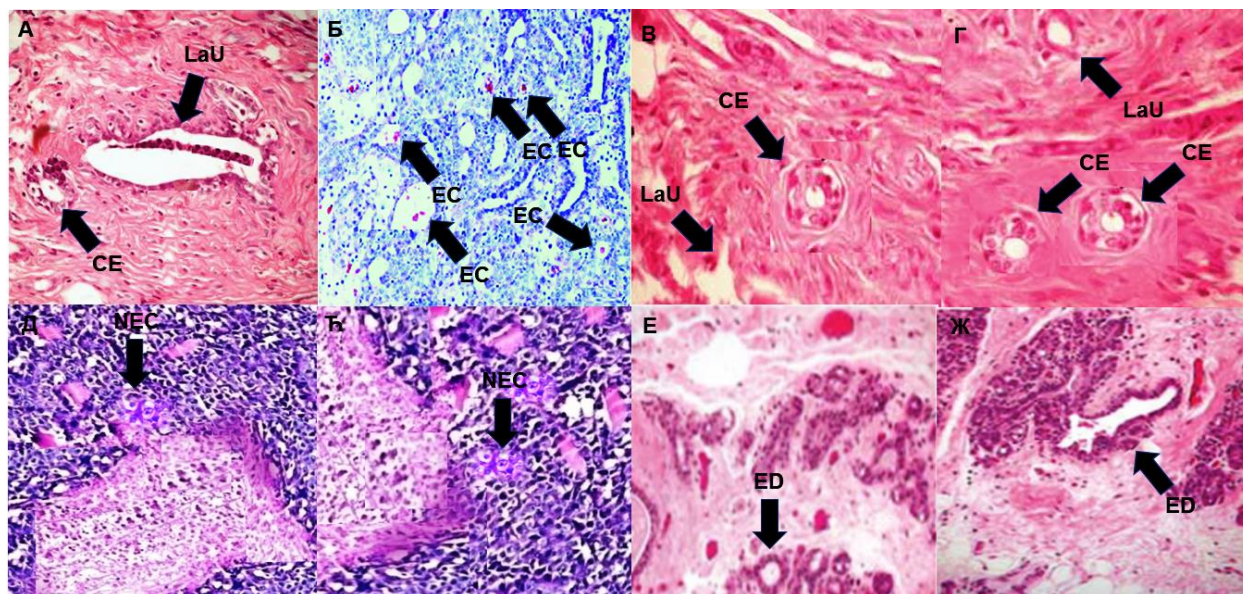
Слика ДМ320. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-1a** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-1a** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



Слика ДМ321. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-1b** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-1b** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



Слика ДМ322. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-2b** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-2b** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



Слика ДМ323. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-3b** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DQ-3b** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-OHT** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-OHT** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.

Табела ДМ1. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз биохемијске маркере серума.

Јед.	Доза (mg/kg)	AST ^a (U/L)	ALT ^b (A/L)	ALP ^b (A/L)	γ-GT ^Г (U/L)	ТВС ^д (μmol/L)
3DQ-1a	5	43,23±0,32 ^{h,†,‡,l}	46,41±0,85 ^{*,†}	97,32±0,45 ^{*,†}	11,42±0,21 [†]	14,15±0,54 ^{†,‡}
	50	46,47±0,36 ^{†,§,⊥}	49,31±0,47 ^{*,†,§}	104,43±0,46 ^{*,†,§}	12,46±0,35 [†]	15,37±0,39 ^{†,§,⊥}
3DQ-2a	5	46,43±0,12 [†]	44,56±0,12 [†]	97,46±0,32 ^{*,†}	15,52±0,32	13,43±0,26 ^{†,‡}
	50	48,35±0,26 ^{†,§,⊥}	47,47±0,25 ^{*,†,§}	117,46±0,74 ^{*,†,§,⊥}	16,35±0,46 [*]	14,72±0,46 ^{†,§,⊥}
3DQ-4a	5	48,32±0,43 [†]	43,54±0,32 ^{†,‡,l}	82,36±0,24 ^{†,‡,l}	9,36±0,35 [†]	14,54±0,26 ^{†,‡}
	50	51,43±0,25 [†]	45,57±0,21 ^{†,§}	85,67±0,35 ^{*,†,§,⊥}	10,64±0,74 ^{†,§}	17,32±0,36 ^{†,§}
3DQ-1b	5	55,32±0,24 [†]	50,31±0,32 ^{*,†}	110,32±0,42 ^{*,†,l}	11,71±0,53 [†]	15,89±0,46 ^{†,‡}
	50	58,42±0,34 ^{*,†}	56,36±0,88 ^{*,†}	121,53±0,48 ^{*,†,⊥}	12,44±0,32 [†]	16,46±0,47 ^{†,§}
3DQ-2b	5	46,32±0,46 [†]	50,31±0,63 ^{*,†}	111,24±0,35 ^{*,†,‡,l}	12,45±0,43 [†]	16,56±0,25 ^{†,‡}
	50	49,57±0,42 ^{†,§}	49,63±0,35 ^{*,†,§}	124,53±0,68 ^{*,†,⊥}	13,56±0,63	19,46±0,46 ^{*,†}
3DQ-3b	5	45,22±0,34 ^{†,‡,l}	51,54±0,23 ^{*,†}	109,34±0,35 ^{*,†,l}	11,36±0,21 [†]	17,31±0,56 [†]
	50	54,36±0,57 [†]	57,36±0,46 ^{*,†}	114,64±0,48 ^{*,†,§,⊥}	11,76±0,46 [†]	18,46±0,32 [†]
4-ОТН.^е	5	52,32±0,45	50,43±0,42 ^{*,†}	104,74±0,52 ^{*,†,l}	14,54±0,21	22,56±0,35 ^{*,†,l}
	50	57,43±0,73 ^{*,†}	58,46±0,42 ^{*,†}	128,35±0,42 ^{*,†,⊥,⊥}	16,47±0,35	24,57±0,36 [*]
Ral.^ж	5	52,32±0,45 [†]	49,45±0,31 ^{*,†}	97,43±0,65 ^{*,†}	9,43±0,43 [†]	17,53±0,75 [†]
	50	57,36±0,51 ^{*,†}	51,57±0,43 ^{*,†}	103,53±0,56 ^{*,†,§,l}	11,35±0,21 [†]	21,46±0,78 ^{*,†}
MNU^з	50	134,54±0,32 ^{*,§,l,⊥}	156,24±0,31 ^{*,‡,§,l}	224,54±0,24 ^{*,‡,§,l,⊥}	18,43±0,32 ^{*,l,⊥}	31,34±0,32 ^{*,‡,l,⊥}
Контрола^д		45,36±0,21 ^{†,‡,§,l,⊥}	39,43±0,35 ^{†,‡,§,l,⊥}	76,35±0,23 ^{†,‡,§,l,⊥}	10,46±0,35 ^{†,§}	13,25±0,54 ^{†,‡,§,⊥}

^aКаталитичка активност аспартат трансминазе; ^bКаталитичка активност аланин трансминазе; ^вКаталитичка активност алкалне фосфатазе; ^ГКаталитичка активност γ-глутамилтрансферазе; ^дУкупни садржај билирубина; ^hРезултати су представљени као средња вредност±стандардна девијација најмање три мерења; ^е**4-хидрокситамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОТН**); ^ж**Ралоксифен** (енг. **Raloxifene, Ral**); ^зметил нитрозоуреа; ^и0,9% NaCl. *p < 0,05 када се пореди са групом негативне контроле; †p < 0,05 када се пореди са MNU у концентрацији од 50 mg/kg; ‡p < 0,05 када се пореди са 4-ОТН у концентрацији од 5 mg/kg; §p < 0,05 када се пореди са 4-ОТН у концентрацији од 50 mg/kg; ⊥p < 0,05 када се пореди са Ral у концентрацији од 5 mg/kg; ⊥p < 0,05 када се пореди са Ral у концентрацији од 50 mg/kg.

Табела ДМ2. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз маркере оксидативног оштећења јетре.

Јед.	Доза (mg/kg)	TP ^a (g/L)	GSH ^b (mg/g)	CAT ^b (μ mol/mg)	SOD ^r (U/mg)	TBARS ^d (nmol/mg)
3DQ-1a	5	31,35 \pm 0,12 ^{b,†,‡,⊥}	8,12 \pm 0,32 [†]	14,21 \pm 0,57 [†]	6,53 \pm 0,23	0,63 \pm 0,04 ^{†,‡,⊥}
	50	34,42 \pm 0,57 ^{†,§,⊥}	8,35 \pm 0,35 [†]	15,35 \pm 0,36 [†]	8,47 \pm 0,56 [†]	0,76 \pm 0,32 ^{†,§,⊥}
3DQ-2a	5	32,76 \pm 0,03 ^{†,‡,⊥}	8,96 \pm 0,17 [†]	13,54 \pm 0,31 [†]	6,21 \pm 0,56	0,66 \pm 0,17 ^{†,‡,⊥}
	50	34,57 \pm 0,36 ^{†,§,⊥}	9,35 \pm 0,45 ^{†,§}	15,31 \pm 0,43 [†]	10,46 \pm 0,36 [†]	0,71 \pm 0,21 ^{†,‡,⊥}
3DQ-4a	5	38,32 \pm 0,19 ^{*,†}	8,15 \pm 0,67 [†]	15,46 \pm 0,62 [†]	5,32 \pm 0,18	0,73 \pm 0,13 ^{†,‡,⊥}
	50	44,57 \pm 0,36 [*]	8,74 \pm 0,35 [†]	16,32 \pm 0,43 [†]	9,46 \pm 0,36 [†]	0,81 \pm 0,32 ^{†,§,⊥}
3DQ-1b	5	33,45 \pm 0,21 ^{†,‡,⊥}	7,43 \pm 0,12	12,45 \pm 0,64 [†]	9,43 \pm 0,67	0,68 \pm 0,26 ^{†,‡,⊥}
	50	36,36 \pm 0,35 ^{†,§,⊥}	8,74 \pm 0,78 [†]	13,43 \pm 0,43 ^{†,§}	16,35 \pm 0,68 ^{*,†,§,⊥}	0,71 \pm 0,32 ^{†,§,⊥}
3DQ-2b	5	34,21 \pm 0,67 ^{†,‡,⊥}	7,77 \pm 0,25	13,91 \pm 0,74 [†]	10,32 \pm 0,85 [†]	0,62 \pm 0,09 ^{†,‡,⊥}
	50	35,42 \pm 0,74 ^{†,§,⊥}	8,42 \pm 0,46 [†]	17,45 \pm 0,36 [†]	16,46 \pm 0,42 ^{*,†,§,⊥}	0,78 \pm 0,35 ^{†,§,⊥}
3DQ-3b	5	32,65 \pm 0,67 ^{†,‡,⊥}	7,74 \pm 0,21	14,56 \pm 0,54 [†]	10,13 \pm 0,74 [†]	0,67 \pm 0,59 ^{†,‡,⊥}
	50	35,57 \pm 0,79 ^{†,§,⊥}	8,34 \pm 0,24 [†]	17,35 \pm 0,35 [†]	14,64 \pm 0,24 ^{†,§}	0,76 \pm 0,12 ^{†,§,⊥}
4-ОТН.^e	5	42,56 \pm 0,67 ^{*,†}	4,43 \pm 0,25 [*]	12,56 \pm 0,68 [†]	4,87 \pm 0,72	1,84 \pm 0,21 ^{*,†}
	50	46,35 \pm 0,25 [*]	3,12 \pm 0,56 [*]	19,46 \pm 0,56 ^{*,†,⊥}	6,46 \pm 0,34	2,63 \pm 0,32 ^{*,⊥}
Ral.^ж	5	41,67 \pm 0,21 ^{*,†}	6,56 \pm 0,21	9,73 \pm 0,12 [†]	5,89 \pm 0,56	1,31 \pm 0,56 [†]
	50	43,36 \pm 0,42 [*]	5,34 \pm 0,36	13,43 \pm 0,36 [†]	8,46 \pm 0,23 [†]	1,63 \pm 0,21 ^{†,§}
MNU^з	50	50,90 \pm 0,42 ^{*,⊥}	2,79 \pm 0,32 [*]	2,08 \pm 0,38 ^{*,‡,§,⊥}	1,32 \pm 0,14 [⊥]	2,31 \pm 0,72 ^{*,‡,⊥}
Контрола^и		30,25 \pm 0,17 ^{†,‡,§,⊥}	7,53 \pm 0,31 [†]	13,21 \pm 0,45 [†]	7,34 \pm 0,12	0,61 \pm 0,05 ^{†,‡,§,⊥}

^aУкупни садржај протеина; ^bКонцентрација редукованог глутатиона; ^rКаталитичка активност каталазе; ^rКаталитичка активност супероксид дисмутазе; Садржај реактивних супстанци тиобарбитурне киселине; ^бРезултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација најмање три мерења; ^e**4-хидрокси тамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОТН**); ^ж**Ралоксифен** (енг. **Raloxifene, Ral**); ^зметил нитрозоуреа; ^и0,9% NaCl. *p < 0,05 када се пореди са групом негативне контроле; †p < 0,05 када се пореди са MNU у концентрацији од 50 mg/kg; ‡p < 0,05 када се пореди са 4-ОТН у концентрацији од 5 mg/kg; §p < 0,05 када се пореди са 4-ОТН у концентрацији од 50 mg/kg; ⊥p < 0,05 када се пореди са Ral у концентрацији од 5 mg/kg; ⊥p < 0,05 када се пореди са Ral у концентрацији од 50 mg/kg.

Додатни материјал III

за ДОКТОРСКУ ДИСЕРТАЦИЈУ:

*Антагонисти естроген рецептора α : Рационални
дизајн нових супресаната рака дојке базиран на 3-D
QSAR, COMBINEr и 3-D фармакофорним
студијама*

Садржај

Табела ДМ1. PDB кодови и структуре лигананда естроген рецептора α доступних у Protein Data Bank октобра 2015. године.

Табела ДМ2. Листа проба које се користе за израчунавање MIF.

Табела ДМ3. Генерисање Ру-СоMFA модела стандардним подешавањима.

Табела ДМ4. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за C.3 пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Табела ДМ5. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за N.3 пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Табела ДМ6. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за O.3 пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Табела ДМ7. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за H пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Табела ДМ8. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за C.2 пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Табела ДМ9. Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за C.cat пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Табела ДМ10. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из H пробе на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

Табела ДМ11. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из H пробе на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ12. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pIC_{50} помоћу модела генерисаног из H пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ13. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pIC_{50} помоћу модела генерисаног из H пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ14. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу модела генерисаног из H пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ15. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу модела генерисаног из H пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табле ДМ16. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као $pRBA$ помоћу модела генерисаног из H пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ17. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као $rRVA$ помоћу модела генерисаног из Н пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ18. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене rIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из STE.HB поља на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

Табела ДМ19. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене rIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из STE.HB поља на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ20. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као rIC_{50} помоћу модела генерисаног из STE.HB поља на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ21. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као rIC_{50} помоћу модела генерисаног из STE.HB поља на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ22. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као rK_i помоћу модела генерисаног из STE.HB поља на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ23. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као rK_i помоћу модела генерисаног из STE.HB поља на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табле ДМ24. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као $rRVA$ помоћу модела генерисаног из STE.HB поља на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ25. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као $rRVA$ помоћу модела генерисаног из STE.HB поља на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ26. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз биохемијске маркере серума.

Табела ДМ27. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз маркере оксидативног оштећења јетре.

Слика ДМ1. Мапе стерних (позитивни зелени STE *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF, негативни жути *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF) и електростатичких (позитивни црвени ELE *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF, негативни плави ELE *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF) поља стварних доприноса (*AAC*) активности лиганда (**L_{AAC}**) добијени из модела Н пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Зелени и жути полихедрони указују на регионе где повећана и смањена волуминозност могу повећати активност. Црвени и плави полихедрони указују на регионе где наелектрисане функционалне групе могу повећати или смањити Црвени и плави

полихедрони указују на регионе где наелектактивност, респективно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ2. Мапе стерних (позитивни зелени STE *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF, негативни жути *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF) и електростатичких (позитивни црвени ELE *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF, негативни плави ELE *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF) поља стварних доприноса (*AAC*) активности лиганда (L_{ACC}) добијени из модела Н пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Зелени и жути полихедрони указују на регионе где повећана и смањена волуминозност могу повећати активност. Црвени и плави полихедрони указују на регионе где наелектрисане функционалне групе могу повећати или смањити Црвени и плави полихедрони указују на регионе где наелектактивност, респективно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ3. Мапе стерних (позитивни зелени STE *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF, негативни жути *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF) и електростатичких (позитивни црвени ELE *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF, негативни плави ELE *PLS*-коэффицијенти \times средња вредност MIF) поља стварних доприноса (*AAC*) активности лиганда (L_{ACC}) добијени из модела Н пробе за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Зелени и жути полихедрони указују на регионе где повећана и смањена волуминозност могу повећати активност. Црвени и плави полихедрони указују на регионе где наелектрисане функционалне групе могу повећати или смањити Црвени и плави полихедрони указују на регионе где наелектактивност, респективно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ4. Репрезентација позитивних и негативних доприноса аминокиселина (MRAACs) унутар Ру-ComBinE модела проистеклог из комбинације STE.НВ поља за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). STE и НВ MRAACs означени су обојеним транспарентним површинама преклопљеним преко структура аминокиселина.

Слика ДМ5. Репрезентација позитивних и негативних доприноса аминокиселина (MRAACs) унутар Ру-ComBinE модела проистеклог из комбинације STE.НВ поља за **1XP6** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). STE и НВ MRAACs означени су обојеним транспарентним површинама преклопљеним преко структура аминокиселина.

Слика ДМ6. Репрезентација позитивних и негативних доприноса аминокиселина (MRAACs) унутар Ру-ComBinE модела проистеклог из комбинације STE.НВ поља за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). STE и НВ MRAACs означени су обојеним транспарентним површинама преклопљеним преко структура аминокиселина.

Слика ДМ7. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганда ER α помоћу програма Smina: **1L2I** (А), ЕС тамно плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **5AK2** (Б), ЕС тамно плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **2IOG** (В), ЕС тамно зелена, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1X7R** (Г), ЕС љубичаста, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1UOM** (Д), ЕС љубичаста, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; и **1GWQ**

(Ћ) ЕС сива, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ8. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганада $ER\alpha$ помоћу програма Smina: **1XP6** (А), ЕС браон, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1SJ0** (Б), ЕС тамно плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **2R6Y** (В), ЕС светло плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1XP9** (Г), ЕС плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1YIM** (Д), ЕС љубичаста, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; и **1YIN** (Ћ) ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ9. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганада $ER\alpha$ помоћу програма Smina: **1XPC** (А), ЕС сива, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **2R6W** (Б), ЕС тамно црвена, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **2QA8** (В), ЕС наранџаста, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; и **1R5K** (Г) ЕС тамно зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ10. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганада $ER\alpha$ помоћу програма Smina: **2QA6** (А), ЕС светло плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1XQC** (Б), ЕС светло зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2B1Z** (В), ЕС светло розе, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; и **1X7E** (Г) ЕС жута, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ11. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганада $ER\alpha$ помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру $ER\alpha$, помоћу програмског пара Balloon/ShaEP: **1L2I** (А), ЕС тамно плава, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **5AK2** (Б), ЕС тамно плава, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **2IOG** (В), ЕС тамно зелена, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **1X7R** (Г), ЕС љубичаста, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **1UOM** (Д), ЕС љубичаста, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; и **1GWQ** (Ћ) ЕС сива, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ12. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганада $ER\alpha$ помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру $ER\alpha$, помоћу програмског пара Balloon/ShaEP: **1XP6** (А), ЕС браон, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCD зелена, RCCA црвена; **1SJ0** (Б), ЕС тамно плава, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **2R6Y** (В), ЕС светло плава, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **1XP9**

(Г), ЕС плава, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **1YIM** (Д), ЕС љубичаста, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; и **1YIN** (Ђ) ЕС љубичаста, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ13. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру ER α , помоћу програмског пара Balloon/ShaEP: **1XPC** (А), ЕС сива, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **2R6W** (Б), ЕС тамно црвена, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **2QA8** (В), ЕС наранџаста, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; и **1R5K** (Г) ЕС тамно зелена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ14. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру ER α , помоћу програмског пара Balloon/ShaEP: **2QA6** (А), ЕС светло плава, ECRA б светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1XQC** (Б), ЕС светло зелена, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **2B1Z** (В), ЕС светло розе, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; и **1X7E** (Г) ЕС жута, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ15. ¹H NMR спектар једињења **CBE-RR1**.

Слика ДМ16. ¹³C NMR спектар једињења **CBE-RR1**.

Слика ДМ17. ¹⁵N NMR спектар једињења **CBE-RR1**.

Слика ДМ18. ¹⁷O NMR спектар једињења **CBE-RR1**.

Слика ДМ19. ¹H NMR спектар једињења **CBE-RR2**.

Слика ДМ20. ¹³C NMR спектар једињења **CBE-RR2**.

Слика ДМ21. ¹⁵N NMR спектар једињења **CBE-RR2**.

Слика ДМ22. ¹⁷O NMR спектар једињења **CBE-RR2**.

Слика ДМ23. ¹H NMR спектар једињења **CBE-RR3**.

Слика ДМ24. ¹³C NMR спектар једињења **CBE-RR3**.

Слика ДМ25. ¹⁵N NMR спектар једињења **CBE-RR3**.

Слика ДМ26. ¹⁷O NMR спектар једињења **CBE-RR3**.

Слика ДМ27. ¹H NMR спектар једињења **CBE-RR4**.

Слика ДМ28. ¹³C NMR спектар једињења **CBE-RR4**.

Слика ДМ29. ¹⁵N NMR спектар једињења **CBE-RR4**.

Слика ДМ30. ¹⁷O NMR спектар једињења **CBE-RR4**.

Слика ДМ31. ¹H NMR спектар једињења **CBE-RR5**.

Слика ДМ32. ¹³C NMR спектар једињења **CBE-RR5**.

Слика ДМ33. ¹⁵N NMR спектар једињења **CBE-RR5**.

Слика ДМ34. ¹⁷O NMR спектар једињења **CBE-RR5**.

Слика ДМ35. ¹H NMR спектар једињења **CBE-RR6**.

Слика ДМ36. ¹³C NMR спектар једињења **CBE-RR6**.

Слика ДМ83. ^1H NMR спектар једињења **Pro-CBE-6**.
Слика ДМ84. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-CBE-6**.
Слика ДМ85. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-CBE-6**.
Слика ДМ86. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-CBE-6**.
Слика ДМ87. ^1H NMR спектар једињења **CBE-1**.
Слика ДМ88. ^{13}C NMR спектар једињења **CBE-1**.
Слика ДМ89. ^{15}N NMR спектар једињења **CBE-1**.
Слика ДМ90. ^{17}O NMR спектар једињења **CBE-1**.
Слика ДМ91. ^1H NMR спектар једињења **CBE-2**.
Слика ДМ92. ^{13}C NMR спектар једињења **CBE-2**.
Слика ДМ93. ^{15}N NMR спектар једињења **CBE-2**.
Слика ДМ94. ^{17}O NMR спектар једињења **CBE-2**.
Слика ДМ95. ^1H NMR спектар једињења **CBE-3**.
Слика ДМ96. ^{13}C NMR спектар једињења **CBE-3**.
Слика ДМ97. ^{15}N NMR спектар једињења **CBE-3**.
Слика ДМ98. ^{17}O NMR спектар једињења **CBE-3**.
Слика ДМ99. ^1H NMR спектар једињења **CBE-4**.
Слика ДМ100. ^{13}C NMR спектар једињења **CBE-4**.
Слика ДМ101. ^{15}N NMR спектар једињења **CBE-4**.
Слика ДМ102. ^{17}O NMR спектар једињења **CBE-4**.
Слика ДМ103. ^1H NMR спектар једињења **CBE-5**.
Слика ДМ104. ^{13}C NMR спектар једињења **CBE-5**.
Слика ДМ105. ^{15}N NMR спектар једињења **CBE-5**.
Слика ДМ106. ^{17}O NMR спектар једињења **CBE-5**.
Слика ДМ107. ^1H NMR спектар једињења **CBE-6**.
Слика ДМ108. ^{13}C NMR спектар једињења **CBE-6**.
Слика ДМ109. ^{15}N NMR спектар једињења **CBE-6**.
Слика ДМ110. ^{17}O NMR спектар једињења **CBE-6**.
Слика ДМ111. HPLC спектар једињења **CBE-1**.
Слика ДМ112. HPLC спектар једињења **CBE-2**.
Слика ДМ113. HPLC спектар једињења **CBE-3**.
Слика ДМ114. HPLC спектар једињења **CBE-4**.
Слика ДМ115. HPLC спектар једињења **CBE-5**.
Слика ДМ116. HPLC спектар једињења **CBE-6**.
Слика ДМ117. Антагонизам естроген репептора β у присуству **CBE-4** (А); **CBE-5** (Б); **CBE-3** (В); **CBE-1** (Г); **CBE-2** (Д); **CBE-6** (Ђ).
Слика ДМ118. Антипролиферативна активност **CBE-4** (А); **CBE-5** (Б); **CBE-3** (В); **CBE-1** (Г); **CBE-2** (Д); **CBE-6** (Ђ) против MDA-MB-231 ћелијских линија.
Слика ДМ119. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **CBE-4** у концентрацији од 0,1 nM (А); E_2 у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **CBE-4** у концентрацији од 1 nM (Д); E_2 у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).
Слика ДМ120. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **CBE-5** у концентрацији од 0,1 nM (А); E_2 у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (С); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Д); **CBE-5** у концентрацији од 1 nM (Е); E_2 у

концентрацији од 1 nM (F); **4-ОHT** у концентрацији од 1 nM (G); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Слика ДМ121. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **СВЕ-3** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-ОHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **СВЕ-3** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Слика ДМ122. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **СВЕ-1** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-ОHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **СВЕ-1** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Слика ДМ123. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **СВЕ-2** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-ОHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **СВЕ-2** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

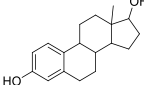
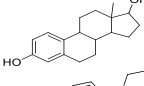
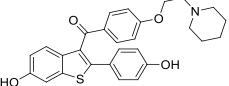
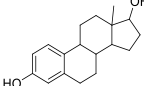
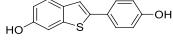
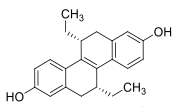
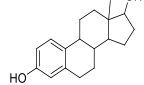
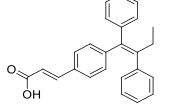
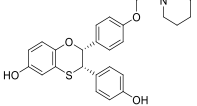
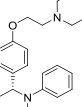
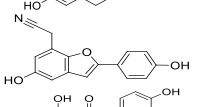
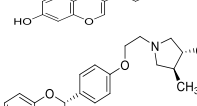
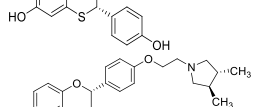
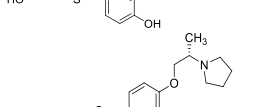
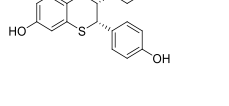
Слика ДМ124. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **СВЕ-6** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-ОHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **СВЕ-6** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

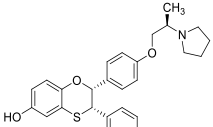
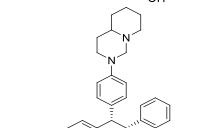
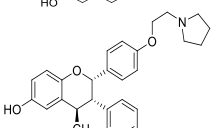
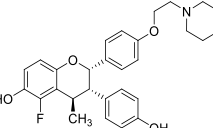
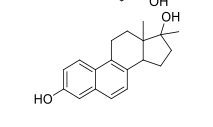
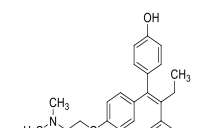
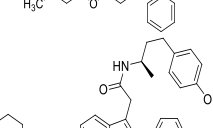
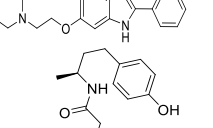
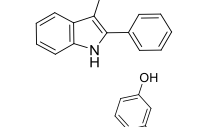
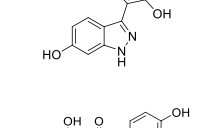
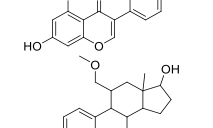
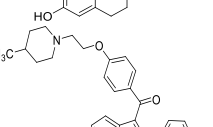
Слика ДМ125. Фотографије исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуларне јединице (LaU) и кубоидалне епителне ћелије (CE) (А); Фотографија исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителних ћелија (EC) (Б); Фотографија исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-5** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуларне јединице (LaU) и кубоидалне епителне ћелије (CE) (В); Фотографија исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-5** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуларне јединице (LaU) и кубоидалне епителне ћелије (CE) (Г); Фотографија исечка дојке пацова третираног са **4-ОHT** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотографија исечка дојке пацова третираног са **4-ОHT** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотографија исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотографија исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.

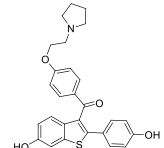
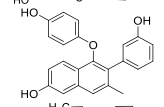
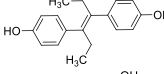
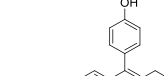
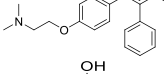
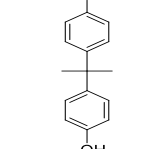
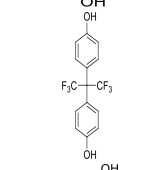
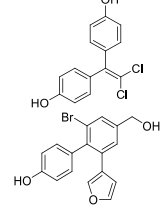
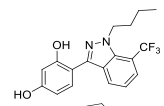
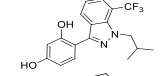
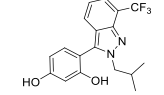
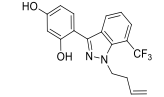
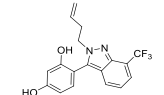
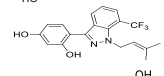
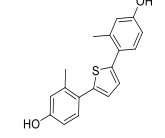
Слика ДМ126. Фотографија исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуларне јединице (LaU) и кубоидалне епителне ћелије (CE) (А); Фотографија исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителних ћелија (EC) (Б); Фотографија исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-3** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуларне јединице (LaU) и кубоидалне епителне ћелије (CE) (В); Фотографија исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-3** у

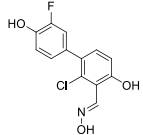
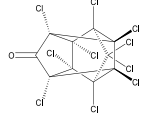
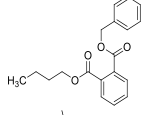
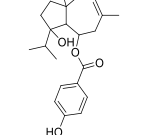
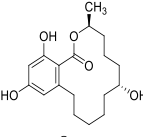
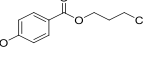
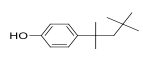
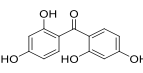
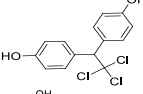
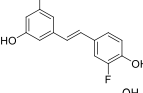
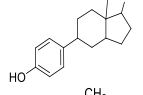
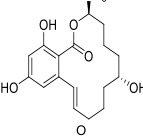
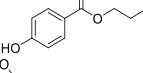
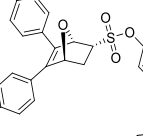
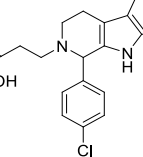
Слика ДМ129. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-6** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-6** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.

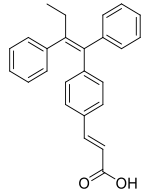
Табела ДМ1. PDB кодови и структуре лиганда естроген рецептора α доступних у Protein Data Bank октобра 2015. године.

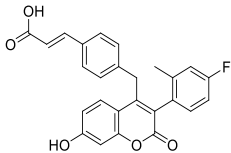
PDB	Структура лиганда	pI_{C50}	pK_i	Мутација	Реф.
1A52		9,24	9,79	Не постоји	318
1ERE		9,24	9,79	Не постоји	73
1ERR		9,52	10,50	Не постоји	73
1G50		8,72	6,27	Не постоји	319
1GWQ		5,85	НД ^a	Не постоји	75
1L2I		8,50	8,50	Не постоји	85
1QKU		8,72	6,27	Не постоји	320
1R5K		7,40	НД	Не постоји	74
1SJ0		9,09	НД	Не постоји	76
1UOM		7,70	НД	Не постоји	86
1X7E		5,90	НД	Не постоји	77
1X7R		8,01	НД	Не постоји	78
1XP1		9,30	НД	Не постоји	79
1XP6		9,30	НД	Не постоји	79
1XP9		8,80	НД	Не постоји	79

1XPC		8,70	НД	Не постоји	79
1XQC		7,20	НД	Не постоји	80
1YIM		8,80	НД	Не постоји	81
1YIN		8,80	НД	Не постоји	81
2B1Z		7,10	НД	C381S C417S	87
2BJ4		8,60	10,40	Не постоји	87
2IOG		8,09	НД	Не постоји	83
2IOK		9,00	НД	Не постоји	83
2QA6		7,30	НД	Y537S	88
2QA8		8,01	6,40	Y537Ser	88
2QGT					88
2R6W		8,60	9,40	C381S C417S	89

2R6Y		8,9	9,50	C381S C417S	89
3DT3		НД	НД	Не постоји	84
3ERD		9,48	НД	Не постоји	84
3ERT		НД	9,60	Не постоји	84
3UU7		НД	8,79	Y537S	90
3UUA		НД	8,79	Y537S	90
3UUC		НД	5,70	Не постоји	90
4DMA		НД	5,60	Не постоји	90
4IU1		НД	НД	Не постоји	322
4IV2		НД	НД	Не постоји	322
4IV4		НД	НД	Не постоји	322
4IVY		НД	НД	Не постоји	322
4IW6		НД	НД	Не постоји	322
4IW8		НД	НД	Не постоји	322
4IWC		НД	НД	Не постоји	322

4IWF		НД	НД	Не постоји	322
4MG5		НД	НД	Y537S	322
4MG6		НД	6,00	Y537S	92
4MG7		НД	НД	Y537S	92
4MG8		НД	10,00	Y537S	92
4MG9		НД	6,00	Y537S	92
4MGA		НД	6,00	Y537S	92
4MGC		НД	7,00	Y537S	92
4MGD		НД	6,00	Y537S	92
4PPP		НД	НД	Не постоји	323
4PPS		НД	НД	Не постоји	323
4TUZ		НД	10,00	Y537S	324
4TV1		НД	НД	Y537S	93
4ZN9		НД	9,60	Y537S	94
5AAU		4.86	НД	Не постоји	321

5AAV		9,17	НД	Не постоји	321
-------------	---	------	----	------------	-----

5AK2		8,40	10,00	C381S C417S	75
-------------	---	------	-------	----------------	----

^aНије доступно.

Табела ДМ2. Листа проба које се користе за израчунавање MIF.

Пробни атом	Опис	Физичко-хемијске карактеристике
C.3	sp^3 хибридизовани атом угљеника	стерне и електростатичке интеракције
N.3	sp^3 хибридизовани атом азота	стерне и електростатичке интеракције
O.3	sp^3 хибридизовани атом кисеоника	стерне и електростатичке интеракције
H	водоник	стерне и електростатичке интеракције
C.2	sp^2 хибридизовани атом угљеника	стерне и електростатичке интеракције
C.cat	карбокатјон (C^+) који се користи унутар гуанидо функционалне групе <chem>oupr</chem>	стерне и електростатичке интеракције

Табела ДМ3. Генерисање Ру-СоМФА модела стандардним подешавањима.

Проба	ОР ^а	ЕР ^б	$r^{2в}$	$q^{2д}$	$r^{2ђ}$	$q^{2е}$	Мин. $\delta^ж$	$\epsilon^з$	CutOff ^и
			ВОТН (РС ^г) ЛОО	ВОТН (РС) ЛОО	ВОТН (РС) ЛСО	ВОТН (РС) ЛСО			
С.3	2	5	0,976 (4)	0,382 (4)	0,563 (4)	0,214 (4)	2	8	30
Н.3	2	5	0,956 (4)	0,154 (4)	0,564 (4)	0,034 (4)	2	8	30
О.3	2	5	0,957 (4)	0,163 (4)	0,541 (4)	0,073 (4)	2	8	30
Н	2	5	0,949 (4)	-0,006 (4)	0,542 (4)	-0,032 (4)	2	8	30
С.2	2	5	0,976 (4)	0,382 (4)	0,543 (4)	0,132 (4)	2	8	30
С.cat	2	5	0,976 (4)	0,382 (4)	0,321 (4)	0,143 (4)	2	8	30

^аОптимално растојање између тачака просторне решетке. ^бЕкстензија просторне решетке. ^вКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем. ^гОптималан број главних компоненти/латентних варијабли. ^дКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем. ^ђКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем. ^еКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем. ^жОптимална вредности стандардне девијације (енг. minimum sigma). ^зОптимална вредност диелектричне констане (енг. dielectric constant). ^иОптималне вредности максималних и минималних CutOff.

Табела ДМ4, Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за С.3 пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Проба	OP ^a	EP ^b	r^{2b}	q^{2d}	r^{2h}	q^{2e}	Мин, δ^k	ϵ^3	CutOff ^ч
			BOTH	BOTH	BOTH	BOTH			
			(PC ^r) LOO	(PC) LOO	(PC) LSO	(PC) LSO			
C.3	3,5	7	0,998 (8)	0,653 (8)	0,743 (8)	0,342 (8)	0,7	44	21
C.3	1,4	8	0,981 (4)	0,201 (4)	0,542 (4)	0,112 (4)	0,7	48	14
C.3	1	10	0,985 (4)	0,308 (4)	0,653 (4)	0,226 (4)	0,9	75	10
C.3	2,1	10	0,970 (4)	0,199 (4)	0,764 (4)	0,043 (4)	0,7	67	9
C.3	2,1	3	0,975 (4)	0,255 (4)	0,752 (4)	0,145 (4)	0,2	18	22
C.3	1,4	7	0,969 (4)	0,281 (4)	0,585 (4)	0,212 (4)	0,7	69	3
C.3	3	10	0,995 (6)	0,150 (6)	0,912 (6)	0,116 (6)	1	37	19
C.3	1,9	2	0,954 (4)	0,360 (4)	0,932 (4)	0,321 (4)	0,9	2	26
C.3	3,2	3	0,911 (3)	0,221 (3)	0,911 (3)	0,221 (3)	0,2	62	27
C.3	2,4	5	0,976 (4)	0,326 (4)	0,921 (4)	0,287 (4)	1	30	12
C.3	1,9	5	0,979 (4)	0,369 (4)	0,979 (4)	0,332 (4)	0,9	61	16
C.3	1,6	9	0,973 (4)	0,298 (4)	0,918 (4)	0,222 (4)	0,3	58	29
C.3	2	3	0,980 (4)	0,450 (4)	0,922 (4)	0,412 (4)	0,6	21	23
C.3	2,2	3	0,961 (4)	0,200 (4)	0,911 (4)	0,131 (4)	0,4	18	6
C.3	2,6	5	0,962 (4)	0,034 (4)	0,902 (4)	0,004 (4)	0,8	24	14
C.3	1,3	7	0,985 (4)	0,215 (4)	0,912 (4)	0,221 (4)	0,2	75	17
C.3	3,3	7	0,050 (1)	-0,188 (1)	0,022 (1)	-0,243 (1)	0,3	64	23
C.3	2,4	6	0,980 (4)	0,394 (4)	0,912 (4)	0,231 (4)	0,1	53	13
C.3	2,9	3	0,935	0,151	0,921	0,111	0,1	60	28

C.3	1,8	7	(4) 0,969	(4) 0,219	(4) 0,906	(4) 0,166	0,7	12	6
C.3	1,9	2	(4) 0,96	(4) 0,415	(4) 0,897	(4) 0,314	1	15	17
C.3	1,7	10	(4) 0,987	(4) 0,121	(4) 0,922	(4) 0,092	0,5	34	13
C.3	1,7	3	(4) 0,977	(4) 0,318	(4) 0,913	(4) 0,241	0,7	21	28
C.3	1,4	3	(4) 0,976	(4) 0,278	(4) 0,912	(4) 0,211	0,4	36	19
C.3	3,4	3	(4) 0,129	(4) -0,283	(4) 0,121	(4) -0,214	0,7	35	30
C.3	2,6	3	(1) 0,953	(1) 0,375	(1) 0,891	(1) 0,284	0,7	76	30
C.3	2,3	2	(4) 0,965	(4) 0,314	(4) 0,902	(4) 0,238	0,1	29	26
C.3	2,2	4	(4) 0,972	(4) 0,279	(4) 0,908	(4) 0,211	0,8	18	28
C.3	1,6	5	(4) 0,964	(4) 0,198	(4) 0,901	(4) 0,150	0,6	16	4
C.3	2,1	8	(4) 0,983	(4) 0,439	(4) 0,919	(4) 0,333	0,3	39	3
C.3	2,8	3	(5) 0,931	(5) 0,16	(5) 0,870	(5) 0,121	0,3	21	22
C.3	1,7	8	(4) 0,96	(4) 0,37	(4) 0,897	(4) 0,280	0,7	0	21
C.3	2,7	3	(4) 0,955	(4) 0,297	(4) 0,893	(4) 0,225	0,6	78	9
C.3	1,1	6	(4) 0,972	(4) 0,234	(4) 0,908	(4) 0,177	0,6	56	2
C.3	1,5	4	(4) 0,976	(4) 0,226	(4) 0,912	(4) 0,171	1	34	29
C.3	1,6	2	(4) 0,991	(4) 0,323	(4) 0,926	(4) 0,245	0,4	78	8
C.3	2	8	(5) 0,956	(5) 0,144	(5) 0,893	(5) 0,109	1	67	5
C.3	2,1	10	(4) 0,96	(4) 0,109	(4) 0,897	(4) 0,083	0,1	7	30
C.3	2,4	8	(4) 0,967	(4) 0,386	(4) 0,904	(4) 0,292	0,2	12	10
C.3	3,2	3	(4) 0,92	(4) 0,081	(4) 0,860	(4) 0,061	0,6	25	8

C.3	2,7	2	0,818 (2)	0,161 (2)	0,764 (2)	0,122 (2)	0,9	29	3
C.3	2,9	7	0,965 (4)	0,224 (4)	0,902 (4)	0,170 (4)	0,4	73	15
C.3	2,5	10	0,97 (4)	0,362 (4)	0,907 (4)	0,274 (4)	0,3	62	21
C.3	2	5	0,976 (4)	0,38 (4)	0,912 (4)	0,288 (4)	0,9	67	30
C.3	3,3	4	0,062 (1)	-0,215 (1)	0,058 (1)	-0,163 (1)	0,1	15	9
C.3	1,6	3	0,985 (4)	0,211 (4)	0,921 (4)	0,160 (4)	0,2	77	26
C.3	2,8	2	0,085 (1)	-0,245 (1)	0,079 (1)	-0,186 (1)	0,2	33	29
C.3	1,9	3	0,958 (4)	0,326 (4)	0,895 (4)	0,247 (4)	0,9	40	16
C.3	1,5	6	0,976 (4)	0,345 (4)	0,912 (4)	0,261 (4)	0,7	37	15
C.3	3,1	2	0,834 (3)	0,009 (3)	0,779 (3)	0,007 (3)	0,9	34	24
C.3	2,9	9	0,847 (3)	0,145 (3)	0,792 (3)	0,110 (3)	1	21	25
C.3	2,6	7	0,947 (4)	0,19 (4)	0,885 (4)	0,144 (4)	0,6	16	27
C.3	1,3	1	0,974 (4)	0,217 (4)	0,910 (4)	0,164 (4)	0,9	44	19
C.3	3,5	7	0,998 (7)	0,731 (7)	0,933 (7)	0,554 (7)	0,9	0	12
C.3	3,2	7	0,94 (4)	0,157 (4)	0,879 (4)	0,119 (4)	0,7	42	22
C.3	3,1	1	0,75 (2)	-0,248 (2)	0,701 (2)	-0,188 (2)	1	59	7
C.3	2	5	0,978 (4)	0,413 (4)	0,914 (4)	0,313 (4)	0,4	45	27
C.3	2,7	3	0,879 (3)	-0,021 (3)	0,821 (3)	-0,016 (3)	0,4	40	27
C.3	3,4	6	0,855 (3)	0,04 (3)	0,799 (3)	0,030 (3)	0,2	15	28
C.3	2,1	8	0,959 (4)	0,211 (4)	0,896 (4)	0,160 (4)	0,1	10	13
C.3	3,5	8	0,066 (1)	-0,213 (1)	0,062 (1)	-0,161 (1)	0,2	30	9
C.3	1,6	7	0,984 (4)	0,269 (4)	0,920 (4)	0,204 (4)	0,3	46	9

C.3	1	4	0,983 (4)	0,339 (4)	0,919 (4)	0,257 (4)	0,8	80	19
C.3	2,8	1	0,873 (3)	0,152 (3)	0,816 (3)	0,115 (3)	0,7	30	15
C.3	2,6	8	0,867 (3)	0,068 (3)	0,810 (3)	0,052 (3)	0,6	20	2
C.3	2,4	10	0,977 (4)	0,24 (4)	0,913 (4)	0,182 (4)	0,8	37	23
C.3	2,9	3	0,855 (3)	0,137 (3)	0,799 (3)	0,104 (3)	0,8	61	18
C.3	3,3	3	0,952 (4)	0,315 (4)	0,890 (4)	0,239 (4)	0,5	80	5
C.3	1,3	2	0,984 (4)	0,379 (4)	0,920 (4)	0,287 (4)	0,1	20	18
C.3	2,4	8	0,964 (4)	0,308 (4)	0,901 (4)	0,233 (4)	0,5	59	6
C.3	1,4	7	0,964 (4)	0,373 (4)	0,901 (4)	0,283 (4)	0,3	11	3
C.3	1,7	5	0,979 (4)	0,168 (4)	0,915 (4)	0,127 (4)	0,5	41	10
C.3	3,4	10	0,056 (1)	-0,197 (1)	0,052 (1)	-0,149 (1)	0,9	65	30
C.3	1,3	6	0,978 (4)	0,383 (4)	0,914 (4)	0,290 (4)	0,6	59	25
C.3	2,7	3	0,875 (3)	-0,032 (3)	0,818 (3)	-0,024 (3)	0,9	26	29
C.3	3,4	8	0,88 (3)	-0,119 (3)	0,822 (3)	-0,090 (3)	0,2	66	1
C.3	2,8	7	0,969 (4)	0,247 (4)	0,906 (4)	0,187 (4)	0,3	59	5
C.3	1,1	1	0,973 (4)	0,319 (4)	0,909 (4)	0,242 (4)	0,6	32	24
C.3	2,6	1	0,938 (4)	0,217 (4)	0,877 (4)	0,164 (4)	0,6	72	10
C.3	3	3	0,98 (5)	0,593 (5)	0,916 (5)	0,449 (5)	1	68	13
C.3	1,5	9	0 (1)	-0,138 (1)	0,000 (1)	-0,105 (1)	1	37	1
C.3	2,3	10	0,974 (4)	0,352 (4)	0,910 (4)	0,267 (4)	0,1	41	9
C.3	3	7	0,913 (3)	0,14 (3)	0,853 (3)	0,106 (3)	0,8	19	24
C.3	2,2	3	0 (1)	-0,138 (1)	0,000 (1)	-0,105 (1)	1	54	1

C.3	2,5	8	0,978 (4)	0,227 (4)	0,914 (4)	0,172 (4)	0,7	43	10
C.3	2,1	7	0,959 (4)	0,201 (4)	0,896 (4)	0,152 (4)	0,3	35	17
C.3	2,7	9	0,983 (4)	0,13 (4)	0,919 (4)	0,098 (4)	1	72	19
C.3	1,6	4	0,985 (4)	0,389 (4)	0,921 (4)	0,295 (4)	0,4	5	30
C.3	2,1	3	0,971 (4)	0,18 (4)	0,907 (4)	0,136 (4)	0,7	5	14
C.3	1	8	0,982 (4)	0,271 (4)	0,918 (4)	0,205 (4)	0,8	64	7
C.3	3,1	7	0,855 (3)	0,159 (3)	0,799 (3)	0,120 (3)	0,3	5	6
C.3	3	9	0,979 (5)	0,504 (5)	0,915 (5)	0,382 (5)	0,5	42	10
C.3	3,1	10	0,728 (2)	-0,038 (2)	-0,038 (2)	-0,038 (2)	0,4	17	10
C.3	2,3	2	0,967 (4)	0,35 (4)	0,904 (4)	0,265 (4)	0,3	48	15
C.3	2,1	7	0,958 (4)	0,176 (4)	0,895 (4)	0,133 (4)	0,1	72	23
C.3	2,9	10	0,973 (4)	0,1 (4)	0,909 (4)	0,076 (4)	0,4	70	6
C.3	2,9	5	0,742 (2)	-0,188 (2)	0,693 (2)	-0,142 (2)	0,6	20	22
C.3	3,5	1	0,088 (1)	-0,234 (1)	0,082 (1)	-0,177 (1)	0,3	27	7
C.3	1	10	0,986 (4)	0,342 (4)	0,921 (4)	0,259 (4)	0,9	77	19
C.3	1,3	7	0,976 (4)	0,229 (4)	0,912 (4)	0,173 (4)	0,2	53	2

^aОптимално растојање између тачака просторне решетке, ^bЕкстензија просторне решетке, ^cКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^dОптималан број главних компоненти/латентних варијабли, ^eКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^fКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^gКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^hОптимална вредности стандардне девијације (енг, minimum sigma), ⁱОптимална вредност диелектричне константе (енг, dielectric constant), ^jОптималне вредности максималних и минималних CutOff.

Табела ДМ5, Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за N.3 пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Проба	OP ^a	EP ^b	r^{2b}	q^{2d}	r^{2h}	q^{2e}	Мин, δ^k	ϵ^3	CutOff ^h
			BOTH	BOTH	BOTH	BOTH			
			(PC ^r) LOO	(PC) LOO	(PC) LSO	(PC) LSO			
N.3	3,5	7	0,942 (4)	0,265 (4)	0,864 (4)	0,212 (4)	0,7	44	21
N.3	3,2	6	0,899 (3)	0,273 (3)	0,825 (3)	0,218 (3)	0,3	38	24
N.3	1,1	5	0,925 (3)	0,271 (3)	0,849 (3)	0,217 (3)	0,7	76	2
N.3	2,5	4	0,983 (4)	0,315 (4)	0,902 (4)	0,252 (4)	0,8	53	2
N.3	1,1	9	0,972 (4)	0,250 (4)	0,892 (4)	0,200 (4)	0,1	38	27
N.3	2,2	10	0,897 (3)	-0,034 (3)	0,823 (3)	-0,027 (3)	1	75	11
N.3	2,1	9	0,986 (4)	0,354 (4)	0,905 (4)	0,283 (4)	0,8	57	23
N.3	1,1	6	0,966 (4)	0,366 (4)	0,886 (4)	0,293 (4)	0,2	18	1
N.3	1,2	2	0,984 (4)	0,374 (4)	0,903 (4)	0,299 (4)	0,2	7	4
N.3	2,2	10	0,952 (4)	0,303 (4)	0,873 (4)	0,242 (4)	0,5	28	26
N.3	2,6	7	0,995 (7)	0,682 (7)	0,913 (7)	0,546 (7)	0,9	75	23
N.3	3,5	7	0,982 (5)	0,457 (5)	0,901 (5)	0,366 (5)	0,6	50	9
N.3	3,2	10	0,982 (4)	0,281 (4)	0,901 (4)	0,225 (4)	0,6	4	6
N.3	2,2	4	0,982 (4)	0,339 (4)	0,901 (4)	0,271 (4)	0,1	38	24
N.3	1,2	6	0,976 (4)	0,415 (4)	0,895 (4)	0,332 (4)	0,4	14	29
N.3	2,6	4	0,975 (4)	0,281 (4)	0,894 (4)	0,225 (4)	0,1	17	28
N.3	2,2	4	0,976 (4)	0,237 (4)	0,895 (4)	0,190 (4)	0,1	74	16
N.3	1,9	9	0,860 (3)	-0,061 (3)	0,789 (3)	-0,049 (3)	0,3	67	10

N.3	2,7	1	0,998 (8)	0,401 (8)	0,916 -8,000	0,321 -8,000	0,5	42	15
N.3	2,8	10	0,072 (1)	-0,216 (1)	0,066 (1)	-0,173 (1)	0,3	30	8
N.3	3,3	6	0,973 (4)	0,515 (4)	0,893 (4)	0,412 (4)	0,2	32	30
N.3	3,5	9	0,213 (1)	-0,318 (1)	0,195 (1)	-0,254 (1)	0,8	51	21
N.3	3,4	6	0,976 (4)	0,296 (4)	0,895 (4)	0,237 (4)	0,6	65	1
N.3	1,1	6	0,071 (1)	-0,212 (1)	0,065 (1)	-0,170 (1)	0,4	71	25
N.3	3,3	4	0,966 (4)	0,400 (4)	0,886 (4)	0,320 (4)	0,4	27	17
N.3	2,4	2	0,842 (3)	0,177 (3)	0,772 (3)	0,142 (3)	0,5	69	6
N.3	2,8	4	0,875 (3)	0,319 (3)	0,803 (3)	0,255 (3)	0,9	75	13
N.3	3,5	4	0,957 (5)	0,533 (5)	0,878 (5)	0,426 (5)	0,3	15	16
N.3	3	6	0,984 (4)	0,478 (4)	0,903 (4)	0,382 (4)	0,8	31	20
N.3	2	9	0,979 (4)	0,262 (4)	0,898 (4)	0,210 (4)	0,1	17	11
N.3	1,4	6	0,970 (4)	0,363 (4)	0,890 (4)	0,290 (4)	0,1	30	16
N.3	2,3	1	0,975 (4)	0,349 (4)	0,894 (4)	0,279 (4)	0,6	3	25
N.3	1,5	6	0,928 (4)	0,155 (4)	0,851 (4)	0,124 (4)	0,1	53	8
N.3	3,1	9	0,963 (4)	0,391 (4)	0,883 (4)	0,313 (4)	0,9	78	14
N.3	2,4	1	0,986 (4)	0,358 (4)	0,905 (4)	0,286 (4)	0,3	47	18
N.3	1	4	0,100 (1)	-0,158 (1)	0,092 (1)	-0,126 (1)	0,8	4	2
N.3	2,2	7	0,951 (4)	0,535 (4)	0,872 (4)	0,428 (4)	0,9	71	1
N.3	3,5	7	0,947 (4)	0,601 (4)	0,869 (4)	0,481 (4)	0,2	2	25
N.3	3,1	8	0,971 (4)	0,153 (4)	0,891 (4)	0,122 (4)	0,2	31	20
N.3	1,8	8	0,979 (4)	0,324 (4)	0,898 (4)	0,259 (4)	0,3	64	25

N.3	1,1	7	0,979 (4)	0,313 (4)	0,898 (4)	0,250 (4)	0,3	23	21
N.3	1,7	7	0,982 (4)	0,333 (4)	0,901 (4)	0,266 (4)	0,6	70	26
N.3	1	3	0,976 (4)	0,303 (4)	0,895 (4)	0,242 (4)	0,2	47	8
N.3	2	5	0,975 (4)	0,135 (4)	0,894 (4)	0,108 (4)	0,2	37	3
N.3	2,2	10	0,979 (4)	0,352 (4)	0,898 (4)	0,282 (4)	0,2	20	5
N.3	1,3	10	0,957 (4)	0,310 (4)	0,878 (4)	0,248 (4)	0,6	60	9
N.3	3	7	0,986 (4)	0,341 (4)	0,905 (4)	0,273 (4)	0,1	5	3
N.3	1	9	0,946 (4)	0,310 (4)	0,868 (4)	0,248 (4)	0,1	35	19
N.3	2,4	1	0,957 (4)	0,424 (4)	0,878 (4)	0,339 (4)	0,6	75	9
N.3	1,9	1	0,985 (4)	0,274 (4)	0,904 (4)	0,219 (4)	0,2	48	2
N.3	2,6	6	0,966 (4)	0,167 (4)	0,886 (4)	0,134 (4)	0,3	58	13
N.3	2,3	8	0,978 (4)	0,320 (4)	0,897 (4)	0,256 (4)	0,3	22	28
N.3	1,1	2	0,957 (4)	0,186 (4)	0,878 (4)	0,149 (4)	0,4	68	26
N.3	1,8	4	0,948 (4)	0,194 (4)	0,870 (4)	0,155 (4)	1	15	3
N.3	2,1	8	0,880 (3)	-0,071 (3)	0,807 (3)	-0,057 (3)	0,1	8	9
N.3	2,5	4	0,986 (4)	0,483 (4)	0,905 (4)	0,386 (4)	0,2	74	13
N.3	2	9	0,951 (4)	0,386 (4)	0,872 (4)	0,309 (4)	0,2	71	7
N.3	2,6	3	0,897 (3)	0,232 (3)	0,823 (3)	0,186 (3)	0,3	76	18
N.3	2,9	10	0,985 (4)	0,309 (4)	0,904 (4)	0,247 (4)	0,2	7	25
N.3	1,1	9	0,976 (4)	0,276 (4)	0,895 (4)	0,221 (4)	0,5	61	11
N.3	1,1	7	0,982 (4)	0,413 (4)	0,901 (4)	0,330 (4)	0,4	28	3
N.3	1,3	8	0,972 (4)	0,325 (4)	0,892 (4)	0,260 (4)	0,5	58	8

N.3	2,2	7	0,979 (4)	0,356 (4)	0,898 (4)	0,285 (4)	1	44	13
N.3	1,3	2	0,976 (4)	0,323 (4)	0,895 (4)	0,258 (4)	0,3	30	17
N.3	1	6	0,982 (4)	0,303 (4)	0,901 (4)	0,242 (4)	0,3	4	19
N.3	1,6	4	0,959 (4)	0,371 (4)	0,880 (4)	0,297 (4)	0,8	2	7
N.3	2,4	1	0,080 (1)	-0,213 (1)	0,073 (1)	-0,170 (1)	0,3	77	15
N.3	2,8	6	0,687 (2)	-0,192 (2)	0,630 (2)	-0,154 (2)	0,5	40	14
N.3	3,1	4	0,940 (4)	0,344 (4)	0,862 (4)	0,275 (4)	0,3	37	30
N.3	3,2	6	0,882 (3)	0,233 (3)	0,809 (3)	0,186 (3)	0,5	44	14
N.3	3,2	5	0,973 (4)	0,274 (4)	0,893 (4)	0,219 (4)	0,3	71	30
N.3	1,2	3	0,970 (4)	0,397 (4)	0,890 (4)	0,318 (4)	1	50	6
N.3	2	1	0,974 (4)	0,357 (4)	0,894 (4)	0,286 (4)	0,7	48	14
N.3	2,3	10	0,954 (4)	0,347 (4)	0,875 (4)	0,278 (4)	0,7	56	5
N.3	1,9	1	0,967 (4)	0,270 (4)	0,887 (4)	0,216 (4)	1	17	28
N.3	1,6	5	0,983 (4)	0,259 (4)	0,902 (4)	0,207 (4)	0,9	27	28
N.3	1,2	8	0,708 (2)	-0,018 (2)	0,650 (2)	-0,014 (2)	0,6	29	14
N.3	2,9	6	0,984 (4)	0,139 (4)	0,903 (4)	0,111 (4)	0,4	8	26
N.3	1,8	4	0,986 (4)	0,352 (4)	0,905 (4)	0,282 (4)	1	47	12
N.3	1,2	10	0,980 (4)	0,295 (4)	0,899 (4)	0,236 (4)	0,3	38	8
N.3	1,2	6	0,133 (1)	-0,180 (1)	0,122 (1)	-0,144 (1)	0,4	56	9
N.3	3,2	8	0,809 (2)	0,204 (2)	0,742 (2)	0,163 (2)	0,6	32	6
N.3	2,7	2	0,985 (4)	0,166 (4)	0,904 (4)	0,133 (4)	0,2	68	15
N.3	2,4	5	0,978 (4)	0,395 (4)	0,897 (4)	0,316 (4)	1	80	29

N.3	1,6	4	0,985 (4)	0,391 (4)	0,904 (4)	0,313 (4)	0,9	63	28
N.3	1,6	10	0,685 (2)	-0,253 (2)	0,628 (2)	-0,202 (2)	0,8	61	9
N.3	3	8	0,974 (4)	0,337 (4)	0,894 (4)	0,270 (4)	0,4	36	29
N.3	1,5	3	0,978 (4)	0,340 (4)	0,897 (4)	0,272 (4)	0,2	21	7
N.3	2,3	3	0,987 (4)	0,185 (4)	0,906 (4)	0,148 (4)	0,3	40	29
N.3	2,4	5	0,659 (2)	-0,070 (2)	0,605 (2)	-0,056 (2)	0,7	26	22
N.3	3,1	2	0,983 (4)	0,460 (4)	0,902 (4)	0,368 (4)	1	39	8
N.3	2	10	0,680 (2)	-0,015 (2)	0,624 (2)	-0,012 (2)	0,3	23	12
N.3	3,1	1	0,980 (4)	0,251 (4)	0,899 (4)	0,201 (4)	0,1	54	13
N.3	1,3	3	0,865 (3)	0,038 (3)	0,794 (3)	0,030 (3)	0,4	65	7
N.3	3,2	7	0,979 (4)	0,394 (4)	0,898 (4)	0,315 (4)	0,6	64	8
N.3	1,5	6	0,104 (1)	-0,237 (1)	0,095 (1)	-0,190 (1)	0,8	74	25
N.3	3,1	10	0,979 (4)	0,196 (4)	0,898 (4)	0,157 (4)	0,3	75	28
N.3	2,1	5	0,975 (4)	0,250 (4)	0,894 (4)	0,200 (4)	0,7	13	13
N.3	1,5	1	0,988 (4)	0,321 (4)	0,906 (4)	0,257 (4)	0,4	54	19
N.3	2,3	3	0,086 (1)	-0,191 (1)	0,079 (1)	-0,153 (1)	0,6	44	12

^aОптимално растојање између тачака просторне решетке, ^bЕкстензија просторне решетке, ^bКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^cОптималан број главних компоненти/латентних варијабли, ^dКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^eКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^fКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^gОптимална вредности стандардне девијације (енг, minimum sigma), ^hОптимална вредност диелектричне константе (енг, dielectric constant), ⁱОптималне вредности максималних и минималних CutOff.

Табела ДМ6, Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за O.3 пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Проба	OP ^a	EP ^b	r^{2b}	q^{2d}	r^{2h}	q^{2e}	Мин, δ^k	ϵ^3	CutOff ^h
			BOTH	BOTH	BOTH	BOTH			
			(PC ^r) LOO	(PC) LOO	(PC) LSO	(PC) LSO			
O.3	1,8	9	0,985 (4)	0,326 (4)	0,942 (4)	0,265 (4)	0,6	60	22
O.3	3,3	8	0,068 (1)	-0,207 (1)	0,065 (1)	-0,168 (1)	0,1	59	27
O.3	3,4	3	0,149 (1)	-0,272 (1)	0,142 (1)	-0,221 (1)	0,7	38	28
O.3	1,8	6	0,980 (4)	0,244 (4)	0,937 (4)	0,198 (4)	0,4	16	11
O.3	2	9	0,983 (4)	0,398 (4)	0,940 (4)	0,324 (4)	0,4	58	10
O.3	2,4	6	0,990 (4)	0,475 (4)	0,947 (4)	0,386 (4)	0,9	30	28
O.3	2,3	4	0,977 (4)	0,193 (4)	0,934 (4)	0,157 (4)	0,6	14	18
O.3	3,4	1	0,948 (4)	0,019 (4)	0,907 (4)	0,015 (4)	0,3	53	22
O.3	1,7	9	0,980 (4)	0,229 (4)	0,937 (4)	0,186 (4)	0,5	41	18
O.3	1,4	6	0,979 (4)	0,230 (4)	0,936 (4)	0,187 (4)	0,3	30	13
O.3	2,1	6	0,968 (4)	0,241 (4)	0,926 (4)	0,196 (4)	0,8	20	20
O.3	1,4	4	0,971 (4)	0,280 (4)	0,929 (4)	0,228 (4)	0,9	80	27
O.3	2,6	2	0,940 (3)	-0,038 (3)	0,899 (3)	-0,031 (3)	0,3	30	17
O.3	2,8	10	0,941 (4)	0,038 (4)	0,900 (4)	0,031 (4)	0,2	28	30
O.3	2,5	1	0,951 (4)	0,539 (4)	0,909 (4)	0,438 (4)	0,6	54	19
O.3	3,3	1	0,759 (3)	0,403 (3)	0,726 (3)	0,328 (3)	1	59	2
O.3	2,1	9	0,078 (1)	-0,199 (1)	0,075 (1)	-0,162 (1)	0,4	32	29
O.3	1,3	4	0,975 (4)	0,320 (4)	0,932 (4)	0,260 (4)	0,8	15	3
O.3	2,8	3	0,095	-0,205	0,091	-0,167	0,1	74	30

O.3	1	8	(1) 0,985 (4)	(1) 0,330 (4)	(1) 0,942 (4)	(1) 0,268 (4)	0,6	21	16
O.3	1	8	0,986 (4)	0,350 (4)	0,943 (4)	0,285 (4)	0,3	41	12
O.3	3	2	0,735 (2)	0,065 (2)	0,703 (2)	0,053 (2)	0,8	46	6
O.3	1,2	6	0,981 (4)	0,300 (4)	0,938 (4)	0,244 (4)	0,7	9	28
O.3	2,9	9	0,855 (3)	0,149 (3)	0,818 (3)	0,121 (3)	0,2	47	21
O.3	2,1	8	0,945 (4)	0,229 (4)	0,904 (4)	0,186 (4)	0,2	3	20
O.3	3	3	0,951 (4)	0,202 (4)	0,909 (4)	0,164 (4)	0,9	38	6
O.3	1,1	5	0,976 (4)	0,243 (4)	0,933 (4)	0,198 (4)	0,4	58	17
O.3	3,4	6	0,861 (3)	0,047 (3)	0,823 (3)	0,038 (3)	0,7	74	7
O.3	2,9	6	0,960 (4)	0,358 (4)	0,918 (4)	0,291 (4)	0,9	3	7
O.3	2,3	6	0,982 (4)	0,296 (4)	0,939 (4)	0,241 (4)	0,7	37	25
O.3	3,1	6	0,098 (1)	-0,223 (1)	0,094 (1)	-0,181 (1)	1	67	13
O.3	2,8	5	0,940 (4)	0,094 (4)	0,899 (4)	0,076 (4)	1	34	3
O.3	2,8	7	0,894 (3)	0,187 (3)	0,855 (3)	0,152 (3)	0,3	60	6
O.3	2	9	0,986 (4)	0,477 (4)	0,943 (4)	0,388 (4)	1	68	17
O.3	1,4	7	0,983 (4)	0,293 (4)	0,940 (4)	0,238 (4)	0,1	12	15
O.3	1,4	8	0,980 (4)	0,283 (4)	0,937 (4)	0,230 (4)	1	33	26
O.3	2,1	1	0,981 (4)	0,436 (4)	0,938 (4)	0,354 (4)	1	50	29
O.3	3	10	0,904 (3)	0,155 (3)	0,865 (3)	0,126 (3)	1	56	25
O.3	3,4	5	0,878 (3)	-0,019 (3)	0,840 (3)	-0,015 (3)	0,1	10	13
O.3	2,6	2	0,944 (3)	-0,016 (3)	0,903 (3)	-0,013 (3)	0,5	14	13
O.3	2,4	3	0,932	0,099	0,891	0,080	0,4	65	12

O.3	3,5	3	(4) 0,919	(4) 0,064	(4) 0,879	(4) 0,052	0,3	40	16
O.3	2	5	(4) 0,267	(4) -0,125	(4) 0,255	(4) -0,102	0,9	12	1
O.3	2,6	5	(1) 0,938	(1) -0,038	(1) 0,897	(1) -0,031	0,9	2	27
O.3	3,3	8	(4) 0,938	(4) 0,156	(4) 0,897	(4) 0,127	0,9	54	19
O.3	1,8	8	(4) 0,953	(4) 0,101	(4) 0,911	(4) 0,082	0,7	3	20
O.3	1,6	7	(4) 0,989	(4) 0,259	(4) 0,946	(4) 0,211	0,6	53	24
O.3	1	7	(4) 0,977	(4) 0,272	(4) 0,934	(4) 0,221	0,4	8	11
O.3	1,8	5	(4) 0,984	(4) 0,250	(4) 0,941	(4) 0,203	0,4	17	13
O.3	3,5	3	(4) 0,936	(4) 0,298	(4) 0,895	(4) 0,242	0,2	7	21
O.3	3,5	5	(2) 0,588	(2) 0,057	(2) 0,562	(2) 0,046	0,5	52	21
O.3	3,5	7	(7) 0,995	(7) 0,635	(7) 0,952	(7) 0,516	0,7	67	22
O.3	3,2	6	(2) 0,602	(2) -0,213	(2) 0,576	(2) -0,173	0,7	74	2
O.3	3	10	(3) 0,906	(3) 0,167	(3) 0,866	(3) 0,136	0,8	65	24
O.3	1	7	(4) 0,983	(4) 0,301	(4) 0,940	(4) 0,245	0,2	53	10
O.3	2,8	2	(3) 0,886	(3) 0,060	(3) 0,847	(3) 0,049	0,4	7	1
O.3	1,2	6	(4) 0,982	(4) 0,312	(4) 0,939	(4) 0,254	0,5	71	13
O.3	1,2	10	(4) 0,976	(4) 0,308	(4) 0,933	(4) 0,250	0,9	58	3
O.3	1	1	(3) 0,843	(3) 0,202	(3) 0,806	(3) 0,164	0,6	74	1
O.3	3	7	(3) 0,914	(3) 0,176	(3) 0,874	(3) 0,143	0,6	36	17
O.3	1,2	9	(4) 0,979	(4) 0,277	(4) 0,936	(4) 0,225	0,3	29	2
O.3	2,7	3	(4) 0,954	(4) 0,213	(4) 0,912	(4) 0,173	0,9	5	8
O.3	3	6	(4) 0,997	(4) 0,675	(4) 0,953	(4) 0,549	0,2	24	27

O.3	1,1	3	(7) 0,981 (4)	(7) 0,302 (4)	(7) 0,938 (4)	(7) 0,245 (4)	0,5	60	5
O.3	1,2	3	0,978 (4)	0,292 (4)	0,935 (4)	0,237 (4)	0,2	62	9
O.3	3,3	1	0,109 (1)	-0,233 (1)	0,104 (1)	-0,189 (1)	0,4	67	27
O.3	1	9	0,977 (4)	0,240 (4)	0,934 (4)	0,195 (4)	0,3	17	6
O.3	1,8	9	0,986 (4)	0,290 (4)	0,943 (4)	0,236 (4)	0,8	70	24
O.3	2,2	7	0,957 (4)	0,154 (4)	0,915 (4)	0,125 (4)	0,2	43	9
O.3	1,4	3	0,976 (4)	0,259 (4)	0,933 (4)	0,211 (4)	0,5	69	25
O.3	3,3	1	0,046 (1)	-0,178 (1)	0,044 (1)	-0,145 (1)	0,1	3	13
O.3	2	3	0,959 (4)	0,187 (4)	0,917 (4)	0,152 (4)	0,2	28	27
O.3	3	9	0,957 (4)	0,401 (4)	0,915 (4)	0,326 (4)	0,8	25	8
O.3	2,2	1	0,978 (4)	0,230 (4)	0,935 (4)	0,187 (4)	0,7	34	17
O.3	2,9	9	0,845 (3)	0,154 (3)	0,808 (3)	0,125 (3)	0,1	28	27
O.3	3,1	6	0,088 (1)	-0,191 (1)	0,084 (1)	-0,155 (1)	0,9	64	29
O.3	2,6	8	1,000 (8)	0,408 (8)	0,956 -8,000	0,332 -8,000	0,7	1	9
O.3	2,2	10	0,941 (4)	0,207 (4)	0,900 (4)	0,168 (4)	0,2	0	10
O.3	1,6	1	0,966 (4)	0,292 (4)	0,924 (4)	0,237 (4)	0,8	71	9
O.3	1,7	1	0,983 (4)	0,332 (4)	0,940 (4)	0,270 (4)	0,2	61	14
O.3	1,5	9	0,977 (4)	0,338 (4)	0,934 (4)	0,275 (4)	0,5	17	21
O.3	1,8	4	0,984 (4)	0,130 (4)	0,941 (4)	0,106 (4)	0,8	57	24
O.3	2,6	6	0,956 (3)	0,147 (3)	0,914 (3)	0,119 (3)	0,8	28	22
O.3	3,4	7	0,940 (4)	0,296 (4)	0,899 (4)	0,241 (4)	0,4	1	8
O.3	3,5	9	0,981	0,518	0,938	0,421	0,3	29	21

O.3	1,4	1	(5) 0,977 (4)	(5) 0,207 (4)	(5) 0,934 (4)	(5) 0,168 (4)	0,6	61	14
O.3	2,5	10	0,956 (4)	0,336 (4)	0,914 (4)	0,273 (4)	0,1	7	28
O.3	2,9	8	0,970 (5)	0,274 (5)	0,928 (5)	0,223 (5)	0,5	76	15
O.3	3	8	0,728 (2)	0,071 (2)	0,696 (2)	0,058 (2)	0,4	6	10
O.3	2,3	6	0,084 (1)	-0,216 (1)	0,080 (1)	-0,176 (1)	1	15	7
O.3	2,3	5	0,981 (4)	0,422 (4)	0,938 (4)	0,343 (4)	0,2	56	5
O.3	3,3	3	0,946 (4)	0,373 (4)	0,905 (4)	0,303 (4)	0,8	67	6
O.3	2,2	5	0,897 (3)	-0,070 (3)	0,858 (3)	-0,057 (3)	0,6	30	13
O.3	2,1	10	0,971 (4)	0,196 (4)	0,929 (4)	0,159 (4)	0,7	47	10
O.3	1,7	6	0,980 (4)	0,282 (4)	0,937 (4)	0,229 (4)	0,3	68	3
O.3	3,5	2	0,907 (3)	0,322 (3)	0,867 (3)	0,262 (3)	0,4	2	17
O.3	2,1	5	0,963 (4)	0,160 (4)	0,921 (4)	0,130 (4)	1	66	5
O.3	2,2	9	0,992 (5)	0,435 (5)	0,949 (5)	0,354 (5)	0,1	42	28
O.3	3,2	1	0,063 (1)	-0,190 (1)	0,060 (1)	-0,154 (1)	0,4	4	15
O.3	2,8	8	0,815 (2)	0,109 (2)	0,779 (2)	0,089 (2)	0,7	68	11

^aОптимално растојање између тачака просторне решетке, ^bЕкстензија просторне решетке, ^cКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^dОптималан број главних компоненти/латентних варијабли, ^eКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^fКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^gКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^hОптимална вредности стандардне девијације (енг, minimum sigma), ⁱОптимална вредност диелектричне константе (енг, dielectric constant), ^jОптималне вредности максималних и минималних CutOff.

Табела ДМ7, Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за Н пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Проба	ОР ^а	ЕР ^б	$r^{2в}$	$q^{2д}$	$r^{2ђ}$	$q^{2е}$	Мин, $\delta^ж$	$\epsilon^з$	CutOff ^и
			BOTH	BOTH	BOTH	BOTH			
			(PC ^г) LOO	(PC) LOO	(PC) LSO	(PC) LSO			
Н	2,7	9	0,842 (3)	-0,012 (3)	0,788 (3)	-0,009 (3)	0,4	57	26
Н	2,4	1	0,960 (4)	0,361 (4)	0,899 (4)	0,273 (4)	0,5	19	17
Н	2,5	2	0,081 (1)	-0,214 (1)	0,076 (1)	-0,162 (1)	0,7	25	5
Н	1,4	4	0,971 (4)	0,242 (4)	0,909 (4)	0,183 (4)	0,5	23	9
Н	2,4	8	0,959 (4)	0,324 (4)	0,898 (4)	0,245 (4)	0,8	9	8
Н	1,1	8	0,983 (4)	0,317 (4)	0,921 (4)	0,240 (4)	0,5	70	19
Н	2,9	10	0,966 (4)	0,333 (4)	0,905 (4)	0,252 (4)	0,4	42	9
Н	3,1	10	0,105 (1)	-0,240 (1)	0,098 (1)	-0,181 (1)	0,9	10	18
Н	1	2	0,980 (4)	0,330 (4)	0,918 (4)	0,250 (4)	0,3	78	17
Н	3,2	7	0,957 (4)	0,425 (4)	0,896 (4)	0,321 (4)	0,3	8	24
Н	1,3	6	0,969 (4)	0,328 (4)	0,907 (4)	0,248 (4)	1	40	27
Н	3,1	8	0,514 (2)	0,009 (2)	0,481 (2)	0,007 (2)	1	76	2
Н	3	7	0,913 (3)	0,187 (3)	0,855 (3)	0,141 (3)	0,8	27	11
Н	3,5	7	0,884 (3)	0,115 (3)	0,828 (3)	0,087 (3)	0,5	40	27
Н	2,2	10	0,971 (4)	0,230 (4)	0,909 (4)	0,174 (4)	0,8	66	25
Н	1,5	9	0,979 (4)	0,384 (4)	0,917 (4)	0,290 (4)	0,6	23	25
Н	2,5	4	0,895 (3)	-0,070 (3)	0,838 (3)	-0,053 (3)	0,4	76	29
Н	2,9	4	0,965 (4)	0,072 (4)	0,904 (4)	0,054 (4)	0,9	58	7
Н	3,4	8	0,968	0,328	0,906	0,248	0,1	55	11

H	1,6	3	(5) 0,983 (4)	(5) 0,231 (4)	(5) 0,921 (4)	(5) 0,175 (4)	0,3	10	22
H	3,4	6	(3) 0,825 (3)	(3) -0,073 (3)	(3) 0,773 (3)	(3) -0,055 (3)	0,3	32	19
H	2,8	9	(1) 0,117 (1)	(1) -0,283 (1)	(1) 0,110 (1)	(1) -0,214 (1)	0,7	56	10
H	1	9	(4) 0,984 (4)	(4) 0,337 (4)	(4) 0,921 (4)	(4) 0,255 (4)	0,6	15	8
H	2,4	3	(4) 0,962 (4)	(4) 0,259 (4)	(4) 0,901 (4)	(4) 0,196 (4)	0,3	14	26
H	2,2	3	(4) 0,981 (4)	(4) 0,248 (4)	(4) 0,919 (4)	(4) 0,188 (4)	0,8	66	20
H	1,7	5	(4) 0,975 (4)	(4) 0,211 (4)	(4) 0,913 (4)	(4) 0,160 (4)	0,7	7	15
H	1,9	6	(4) 0,989 (4)	(4) 0,439 (4)	(4) 0,926 (4)	(4) 0,332 (4)	0,4	80	2
H	2	8	(4) 0,964 (4)	(4) 0,209 (4)	(4) 0,903 (4)	(4) 0,158 (4)	1	62	14
H	1,3	7	(4) 0,987 (4)	(4) 0,243 (4)	(4) 0,924 (4)	(4) 0,184 (4)	1	76	11
H	1,6	1	(4) 0,967 (4)	(4) 0,302 (4)	(4) 0,906 (4)	(4) 0,228 (4)	0,6	40	6
H	2	3	(4) 0,950 (4)	(4) 0,049 (4)	(4) 0,890 (4)	(4) 0,037 (4)	0,7	31	25
H	2,4	9	(4) 0,966 (4)	(4) 0,279 (4)	(4) 0,905 (4)	(4) 0,211 (4)	0,3	67	27
H	1,2	4	(4) 0,973 (4)	(4) 0,349 (4)	(4) 0,911 (4)	(4) 0,264 (4)	0,9	17	4
H	1	4	(4) 0,983 (4)	(4) 0,337 (4)	(4) 0,921 (4)	(4) 0,255 (4)	0,2	34	12
H	2,1	6	(4) 0,914 (4)	(4) 0,342 (4)	(4) 0,856 (4)	(4) 0,259 (4)	0,3	1	5
H	2,8	5	(8) 0,999 (8)	(8) 0,344 (8)	(8) 0,936 (8)	(8) 0,260 (8)	1	8	11
H	2,3	6	(4) 0,981 (4)	(4) 0,339 (4)	(4) 0,919 (4)	(4) 0,256 (4)	0,9	16	16
H	3,4	8	(5) 0,966 (5)	(5) 0,352 (5)	(5) 0,905 (5)	(5) 0,266 (5)	0,5	32	12
H	1,8	9	(4) 0,984 (4)	(4) 0,269 (4)	(4) 0,921 (4)	(4) 0,203 (4)	0,4	73	5
H	2,5	2	(4) 0,982 (4)	(4) 0,232 (4)	(4) 0,920 (4)	(4) 0,175 (4)	0,6	38	19

H	1,1	9	0,983 (4)	0,305 (4)	0,921 (4)	0,231 (4)	0,7	11	12
H	1,5	9	0,978 (4)	0,358 (4)	0,916 (4)	0,271 (4)	1	55	7
H	3	6	0,952 (4)	0,494 (4)	0,892 (4)	0,374 (4)	0,7	3	17
H	1,6	3	0,987 (4)	0,262 (4)	0,924 (4)	0,198 (4)	0,5	14	13
H	2,7	7	0,924 (3)	0,215 (3)	0,865 (3)	0,163 (3)	0,2	58	6
H	1,2	9	0,985 (4)	0,338 (4)	0,922 (4)	0,256 (4)	0,8	46	25
H	1,7	8	0,949 (4)	0,313 (4)	0,889 (4)	0,237 (4)	0,7	2	23
H	3,2	2	0,966 (4)	0,551 (4)	0,905 (4)	0,417 (4)	0,9	29	16
H	3,3	6	0,096 (1)	-0,221 (1)	0,090 (1)	-0,167 (1)	0,4	63	5
H	1,8	1	0,979 (4)	0,276 (4)	0,917 (4)	0,209 (4)	0,2	25	17
H	2,5	3	0,989 (5)	0,564 (5)	0,926 (5)	0,427 (5)	0,9	26	20
H	1,1	5	0,975 (4)	0,231 (4)	0,913 (4)	0,175 (4)	0,7	53	15
H	1,6	3	0,981 (4)	0,224 (4)	0,919 (4)	0,169 (4)	0,7	24	26
H	3,5	5	0,593 (2)	0,022 (2)	0,555 (2)	0,017 (2)	1	45	8
H	2,8	10	0,870 (3)	-0,079 (3)	0,815 (3)	-0,060 (3)	0,9	38	12
H	3,3	8	0,000 (1)	-0,138 (1)	0,000 (1)	-0,104 (1)	1	62	1
H	1,5	8	0,984 (4)	0,294 (4)	0,921 (4)	0,222 (4)	0,2	55	18
H	1	6	0,976 (4)	0,322 (4)	0,914 (4)	0,244 (4)	0,3	7	11
H	3,4	4	0,997 (8)	0,696 (8)	0,934 (8)	0,526 (8)	0,9	6	24
H	2,7	9	0,908 (3)	0,205 (3)	0,850 (3)	0,155 (3)	0,4	15	2
H	2,8	9	0,065 (1)	-0,218 (1)	0,061 (1)	-0,165 (1)	0,6	68	21
H	2,4	1	0,961 (4)	0,366 (4)	0,900 (4)	0,277 (4)	0,5	44	16

H	2,2	2	0,980 (4)	0,025 (4)	0,918 (4)	0,019 (4)	0,2	22	29
H	2,5	7	0,985 (4)	0,233 (4)	0,922 (4)	0,176 (4)	0,3	26	25
H	1,7	9	0,967 (4)	0,427 (4)	0,906 (4)	0,323 (4)	0,9	34	2
H	1,6	10	0,987 (4)	0,321 (4)	0,924 (4)	0,243 (4)	0,5	22	29
H	1,9	10	0,964 (4)	0,194 (4)	0,903 (4)	0,147 (4)	0,5	75	25
H	3,3	4	0,000 (1)	-0,138 (1)	0,000 (1)	-0,104 (1)	1	73	1
H	2,1	9	0,921 (4)	0,179 (4)	0,862 (4)	0,135 (4)	0,9	1	25
H	1,9	10	0,983 (4)	0,197 (4)	0,921 (4)	0,149 (4)	0,7	24	6
H	3,1	2	0,614 (2)	-0,061 (2)	0,575 (2)	-0,046 (2)	0,4	18	4
H	2,2	10	0,974 (4)	0,255 (4)	0,912 (4)	0,193 (4)	1	17	23
H	2,4	5	0,985 (4)	0,165 (4)	0,922 (4)	0,125 (4)	0,8	15	18
H	2,3	3	0,973 (4)	0,306 (4)	0,911 (4)	0,231 (4)	0,7	27	21
H	2,8	2	0,080 (1)	-0,241 (1)	0,075 (1)	-0,182 (1)	0,9	71	14
H	3,4	8	0,916 (3)	0,031 (3)	0,858 (3)	0,023 (3)	0,8	31	5
H	3,1	1	0,668 (2)	-0,020 (2)	0,626 (2)	-0,015 (2)	0,6	63	9
H	1,1	1	0,973 (4)	0,313 (4)	0,911 (4)	0,237 (4)	1	68	7
H	1,4	6	0,974 (4)	0,300 (4)	0,912 (4)	0,227 (4)	0,1	65	22
H	1,8	3	0,965 (4)	0,264 (4)	0,904 (4)	0,200 (4)	0,9	48	4
H	2	9	0,952 (4)	0,032 (4)	0,892 (4)	0,024 (4)	0,2	6	27
H	2,6	8	0,953 (4)	0,361 (4)	0,892 (4)	0,273 (4)	0,9	38	24
H	2,9	10	0,894 (3)	0,226 (3)	0,837 (3)	0,171 (3)	0,8	64	15
H	1,4	2	0,972 (4)	0,326 (4)	0,910 (4)	0,247 (4)	0,6	76	6

H	2,3	10	0,983 (4)	0,350 (4)	0,921 (4)	0,265 (4)	0,7	35	15
H	2,5	8	0,988 (4)	0,512 (4)	0,925 (4)	0,387 (4)	0,1	52	8
H	3,4	10	0,951 (4)	0,210 (4)	0,891 (4)	0,159 (4)	0,6	5	29
H	3	4	0,936 (4)	0,139 (4)	0,877 (4)	0,105 (4)	0,2	2	1
H	1,1	1	0,971 (4)	0,297 (4)	0,909 (4)	0,225 (4)	1	40	9
H	1,5	7	0,979 (4)	0,236 (4)	0,917 (4)	0,178 (4)	0,7	51	8
H	3,4	5	0,939 (4)	0,217 (4)	0,879 (4)	0,164 (4)	0,3	59	13
H	2,7	5	0,973 (4)	0,157 (4)	0,911 (4)	0,119 (4)	0,6	15	5
H	2,6	7	0,949 (4)	0,252 (4)	0,889 (4)	0,191 (4)	0,6	17	10
H	1,8	2	0,967 (4)	0,220 (4)	0,906 (4)	0,166 (4)	0,2	13	15
H	2,6	10	0,988 (4)	0,380 (4)	0,925 (4)	0,287 (4)	0,8	55	14
H	3,4	10	0,076 (1)	-0,213 (1)	0,071 (1)	-0,161 (1)	0,3	41	23
H	1,4	10	0,984 (4)	0,184 (4)	0,921 (4)	0,139 (4)	0,4	49	19
H	3	3	0,893 (3)	0,404 (3)	0,836 (3)	0,306 (3)	0,9	0	25
H	2,9	1	0,095 (1)	-0,196 (1)	0,089 (1)	-0,148 (1)	0,5	64	26
H	3,3	6	0,074 (1)	-0,214 (1)	0,069 (1)	-0,162 (1)	0,5	70	10

^aОптимално растојање између тачака просторне решетке, ^bЕкстензија просторне решетке, ^cКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^dОптималан број главних компоненти/латентних варијабли, ^eКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^fКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^gКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^hОптимална вредности стандардне девијације (енг, minimum sigma), ⁱОптимална вредност диелектричне константе (енг, dielectric constant), ^jОптималне вредности максималних и минималних CutOff.

Табела ДМ8, Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за С.2 пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Проба	ОР ^а	ЕР ^б	$r^{2в}$	$q^{2д}$	$r^{2ђ}$	$q^{2е}$	Мин, $\delta^ж$	$\epsilon^з$	CutOff ^ш
			BOTH	BOTH	BOTH	BOTH			
			(PC) LOO	(PC) LOO	(PC) LSO	(PC) LSO			
C.2	2,8	10	0,926 (3)	-0,013 (3)	0,867 (3)	-0,010 (3)	0,5	71	33
C.2	2,6	2	1,152 (4)	0,433 (4)	1,079 (4)	0,328 (4)	0,7	27	24
C.2	2,8	3	0,105 (1)	-0,278 (1)	0,099 (1)	-0,210 (1)	1	36	7
C.2	1,7	4	1,262 (4)	0,315 (4)	1,182 (4)	0,238 (4)	0,8	37	14
C.2	2,5	9	1,055 (4)	0,356 (4)	0,988 (4)	0,270 (4)	0,9	10	9
C.2	1,3	9	1,180 (4)	0,380 (4)	1,105 (4)	0,288 (4)	0,7	98	27
C.2	3	10	1,063 (4)	0,366 (4)	0,995 (4)	0,277 (4)	0,5	53	11
C.2	3,4	12	0,137 (1)	-0,312 (1)	0,128 (1)	-0,236 (1)	1,2	13	24
C.2	1,1	2	1,078 (4)	0,363 (4)	1,010 (4)	0,275 (4)	0,4	104	23
C.2	3,4	8	1,148 (4)	0,510 (4)	1,075 (4)	0,386 (4)	0,5	13	40
C.2	1,6	7	1,260 (4)	0,426 (4)	1,180 (4)	0,322 (4)	1,3	52	35
C.2	3,2	9	0,565 (2)	0,010 (2)	0,529 (2)	0,007 (2)	1,1	84	2
C.2	3,2	7	1,096 (3)	0,224 (3)	1,026 (3)	0,170 (3)	1	34	14
C.2	3,8	8	1,149 (3)	0,150 (3)	1,076 (3)	0,113 (3)	0,8	64	43
C.2	2,5	10	1,262 (4)	0,299 (4)	1,182 (4)	0,226 (4)	1,1	91	34
C.2	1,6	10	1,077 (4)	0,422 (4)	1,008 (4)	0,319 (4)	0,7	27	29
C.2	2,7	5	1,074	-0,084	1,006	-0,064	0,6	114	44

			(3)	(3)	(3)	(3)			
C.2	3	4	1,062	0,079	0,994	0,060	1	64	8
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	3,7	9	1,258	0,426	1,178	0,322	0,4	220	44
			(5)	(5)	(5)	(5)			
C.2	1,7	3	1,081	0,254	1,013	0,192	0,4	13	29
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	3,6	7	0,990	-0,088	0,927	-0,066	0,5	53	32
			(3)	(3)	(3)	(3)			
C.2	3,1	10	0,152	-0,368	0,142	-0,278	1	80	14
			(1)	(1)	(1)	(1)			
C.2	1,1	9	1,082	0,371	1,014	0,280	0,7	18	9
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,6	3	1,154	0,311	1,081	0,235	0,5	23	43
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,5	4	1,275	0,322	1,194	0,244	1,1	91	28
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2	6	1,268	0,274	1,187	0,207	1	10	21
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2	6	1,088	0,483	1,019	0,365	0,5	100	3
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,2	8	1,157	0,251	1,083	0,190	1,2	74	17
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	1,4	7	1,086	0,267	1,017	0,202	1,1	84	12
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	1,9	2	1,257	0,393	1,177	0,297	0,9	60	9
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,1	3	1,045	0,054	0,979	0,041	0,8	35	29
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,6	9	1,159	0,335	1,086	0,253	0,5	112	45
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	1,5	5	1,265	0,454	1,185	0,343	1,2	23	5
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	1,1	4	1,081	0,371	1,013	0,280	0,3	51	18
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,3	6	1,097	0,410	1,027	0,310	0,5	2	8
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	3,1	6	1,299	0,447	1,216	0,338	1,3	10	14
			(8)	(8)	(8)	(8)			

C.2	2,6	7	1,275 (4)	0,441 (4)	1,194 (4)	0,333 (4)	1,2	21	21
C.2	3,5	8	1,063 (5)	0,387 (5)	0,995 (5)	0,293 (5)	0,6	38	14
C.2	2	9	1,181 (4)	0,323 (4)	1,106 (4)	0,244 (4)	0,6	110	8
C.2	2,6	2	1,080 (4)	0,255 (4)	1,012 (4)	0,193 (4)	0,7	44	22
C.2	1,4	10	1,278 (4)	0,397 (4)	1,197 (4)	0,300 (4)	1	16	17
C.2	1,6	9	1,076 (4)	0,394 (4)	1,007 (4)	0,298 (4)	1,1	61	8
C.2	3,2	6	1,142 (4)	0,593 (4)	1,070 (4)	0,448 (4)	0,9	4	22
C.2	1,9	4	1,283 (4)	0,341 (4)	1,202 (4)	0,258 (4)	0,8	22	21
C.2	2,8	7	1,016 (3)	0,237 (3)	0,952 (3)	0,179 (3)	0,3	87	9
C.2	1,4	9	1,182 (4)	0,406 (4)	1,107 (4)	0,307 (4)	1	58	31
C.2	2	9	1,234 (4)	0,407 (4)	1,155 (4)	0,308 (4)	1	3	33
C.2	3,5	2	1,256 (4)	0,716 (4)	1,176 (4)	0,542 (4)	1,2	39	21
C.2	3,4	6	0,106 (1)	-0,243 (1)	0,099 (1)	-0,184 (1)	0,5	79	6
C.2	2	1	1,175 (4)	0,331 (4)	1,100 (4)	0,250 (4)	0,4	50	34
C.2	2,6	3	1,088 (5)	0,620 (5)	1,019 (5)	0,469 (5)	1	29	22
C.2	1,4	6	1,268 (4)	0,300 (4)	1,187 (4)	0,227 (4)	1	76	21
C.2	1,7	3	1,079 (4)	0,246 (4)	1,011 (4)	0,186 (4)	0,8	27	30
C.2	3,7	5	0,712 (2)	0,026 (2)	0,666 (2)	0,020 (2)	1,2	54	10
C.2	3,1	12	1,131 (3)	-0,103 (3)	1,059 (3)	-0,078 (3)	1,2	51	16
C.2	3,4	8	0,000	-0,152	0,000	-0,115	1,1	68	1

			(1)	(1)	(1)	(1)			
C.2	1,7	9	1,181	0,353	1,106	0,267	0,4	110	36
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	1,3	8	1,269	0,419	1,188	0,317	0,6	14	22
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	3,7	6	1,296	0,905	1,214	0,684	1,2	8	32
			(8)	(8)	(8)	(8)			
C.2	2,8	9	0,999	0,226	0,935	0,171	0,5	19	3
			(3)	(3)	(3)	(3)			
C.2	3	11	0,078	-0,262	0,073	-0,198	0,8	91	28
			(1)	(1)	(1)	(1)			
C.2	2,5	1	1,057	0,403	0,990	0,304	0,6	53	19
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,5	3	1,274	0,033	1,193	0,025	0,5	55	73
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,6	7	1,084	0,256	1,015	0,194	0,4	35	33
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	1,9	10	1,160	0,512	1,087	0,387	1,1	42	2
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	1,9	12	1,283	0,417	1,202	0,316	0,8	35	46
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2	12	1,060	0,213	0,993	0,161	0,6	90	30
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	3,5	5	0,000	-0,166	0,000	-0,125	1,2	88	1
			(1)	(1)	(1)	(1)			
C.2	2,4	11	1,197	0,233	1,121	0,176	1,2	1	33
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,2	12	1,278	0,256	1,197	0,194	1	34	9
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	3,2	2	0,675	-0,067	0,632	-0,051	0,5	23	5
			(2)	(2)	(2)	(2)			
C.2	2,4	11	1,169	0,306	1,095	0,231	1,2	20	28
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,5	1	1,084	0,182	1,015	0,137	0,9	17	20
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,6	3	1,265	0,398	1,185	0,301	1	39	30
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	2,9	2	0,088	-0,265	0,082	-0,200	1	79	16
			(1)	(1)	(1)	(1)			

C.2	3,6	9	1,099 (3)	0,037 (3)	1,029 (3)	0,028 (3)	1	39	6
C.2	3,4	2	0,868 (2)	-0,026 (2)	0,813 (2)	-0,020 (2)	0,9	95	14
C.2	1,2	1	1,070 (4)	0,344 (4)	1,002 (4)	0,260 (4)	1,1	75	8
C.2	1,6	7	1,169 (4)	0,360 (4)	1,095 (4)	0,272 (4)	0,3	195	66
C.2	2,1	5	1,255 (4)	0,343 (4)	1,175 (4)	0,260 (4)	1,2	64	5
C.2	2,3	12	1,238 (4)	0,042 (4)	1,159 (4)	0,031 (4)	0,5	15	68
C.2	2,7	8	1,048 (4)	0,397 (4)	0,982 (4)	0,300 (4)	1	42	27
C.2	3,1	10	1,073 (3)	0,271 (3)	1,005 (3)	0,205 (3)	1	80	19
C.2	1,5	1	1,069 (4)	0,359 (4)	1,001 (4)	0,271 (4)	0,7	89	7
C.2	2,6	12	1,278 (4)	0,455 (4)	1,197 (4)	0,344 (4)	1	50	21
C.2	2,6	1	1,087 (4)	0,563 (4)	1,018 (4)	0,426 (4)	0,2	104	16
C.2	3,6	12	1,141 (4)	0,252 (4)	1,069 (4)	0,191 (4)	0,8	7	39
C.2	3,3	6	1,217 (4)	0,181 (4)	1,139 (4)	0,137 (4)	0,5	5	3
C.2	1,2	1	1,068 (4)	0,327 (4)	1,000 (4)	0,247 (4)	1,1	44	10
C.2	1,7	8	1,175 (4)	0,283 (4)	1,100 (4)	0,214 (4)	0,9	66	10
C.2	3,7	6	1,221 (4)	0,282 (4)	1,143 (4)	0,213 (4)	0,6	118	26
C.2	3	6	1,265 (4)	0,204 (4)	1,185 (4)	0,154 (4)	0,9	23	8
C.2	2,7	7	1,044 (4)	0,277 (4)	0,978 (4)	0,210 (4)	0,6	17	10
C.2	2	3	1,160 (4)	0,264 (4)	1,087 (4)	0,200 (4)	0,2	13	15
C.2	2,7	10	1,087	0,418	1,018	0,316	0,8	55	14

			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	3,7	12	0,099	-0,277	0,093	-0,209	0,3	41	23
			(1)	(1)	(1)	(1)			
C.2	1,5	10	1,082	0,202	1,014	0,153	0,4	49	19
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.2	3,2	4	1,072	0,485	1,004	0,367	0,9	0	0
			(3)	(3)	(3)	(3)			
C.2	3,2	2	0,124	-0,255	0,116	-0,193	0,5	64	26
			(1)	(1)	(1)	(1)			
C.2	3,4	6	0,081	-0,235	0,076	-0,178	0,5	70	10
			(1)	(1)	(1)	(1)			

^aОптимално растојање између тачака просторне решетке, ^bЕкстензија просторне решетке, ^cКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^dОптималан број главних компоненти/латентних варијабли, ^eКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^fКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^gКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^hОптимална вредности стандардне девијације (енг, minimum sigma), ⁱОптимална вредност диелектричне констане (енг, dielectric constant), ^jОптималне вредности максималних и минималних CutOff.

Табела ДМ9, Анализа оптимизације варијабли пред-третманом (VPO) за C.cat пробу коришћењем leave-one-out (LOO) и leave-some-out (LSO) унакрсне валидације.

Проба	OP ^a	EP ^b	r^{2b}	q^{2d}	r^{2h}	q^{2e}	Мин, δ^x	ϵ^3	CutOff ^m
			BOTC.cat (PC) ^r LOO	BOTC.cat (PC) LOO	BOTC.cat (PC) LSO	BOTC.cat (PC) LSO			
C.cat	2,9	10	1,010 (3)	-0,014 (3)	0,946 (3)	-0,011 (3)	0,6	86	39
C.cat	2,5	2	1,056 (4)	0,397 (4)	0,989 (4)	0,300 (4)	0,6	23	20
C.cat	2,8	3	0,105 (1)	-0,278 (1)	0,099 (1)	-0,210 (1)	1	36	7
C.cat	1,5	4	1,068 (4)	0,266 (4)	1,000 (4)	0,201 (4)	0,6	28	11
C.cat	2,6	9	1,151 (4)	0,389 (4)	1,078 (4)	0,294 (4)	1	11	10
C.cat	1,4	9	1,278 (4)	0,412 (4)	1,197 (4)	0,312 (4)	0,8	112	30
C.cat	3,1	10	1,159 (4)	0,400 (4)	1,086 (4)	0,302 (4)	0,6	63	14
C.cat	3,2	12	0,116 (1)	-0,264 (1)	0,108 (1)	-0,200 (1)	1	11	20
C.cat	1,3	2	1,274 (4)	0,429 (4)	1,193 (4)	0,324 (4)	0,6	156	34
C.cat	3,3	8	1,053 (4)	0,468 (4)	0,986 (4)	0,354 (4)	0,4	11	32
C.cat	1,5	7	1,163 (4)	0,394 (4)	1,089 (4)	0,298 (4)	1,2	48	32
C.cat	3,4	9	0,668 (2)	0,012 (2)	0,626 (2)	0,009 (2)	1,3	99	3
C.cat	3,2	7	1,096 (3)	0,224 (3)	1,026 (3)	0,170 (3)	1	34	14
C.cat	3,7	8	1,061 (3)	0,138 (3)	0,993 (3)	0,104 (3)	0,7	56	38
C.cat	2,3	10	1,068 (4)	0,253 (4)	1,000 (4)	0,191 (4)	0,9	74	28
C.cat	1,8	10	1,273 (4)	0,499 (4)	1,192 (4)	0,378 (4)	0,9	35	38
C.cat	2,6	5	0,985	-0,077	0,922	-0,058	0,5	95	36

			(3)	(3)	(3)	(3)			
C.cat	3,1	4	1,158	0,086	1,084	0,065	1,1	71	9
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	3,7	9	1,258	0,426	1,178	0,322	0,4	220	44
			(5)	(5)	(5)	(5)			
C.cat	1,8	3	1,180	0,277	1,105	0,210	0,5	17	37
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	3,5	7	0,908	-0,080	0,850	-0,061	0,4	43	25
			(3)	(3)	(3)	(3)			
C.cat	3,1	10	0,152	-0,368	0,142	-0,278	1	80	14
			(1)	(1)	(1)	(1)			
C.cat	1,1	9	1,082	0,371	1,014	0,280	0,7	18	9
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	2,6	3	1,154	0,311	1,081	0,235	0,5	23	43
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	2,5	4	1,275	0,322	1,194	0,244	1,1	91	28
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	2	6	1,268	0,274	1,187	0,207	1	10	21
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	2,1	6	1,187	0,527	1,111	0,398	0,6	120	3
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	2,1	8	1,060	0,230	0,993	0,174	1,1	68	15
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	1,6	7	1,283	0,316	1,202	0,239	1,3	99	14
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	1,7	2	1,064	0,332	0,996	0,251	0,7	47	7
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	2,2	3	1,140	0,059	1,068	0,044	0,9	40	32
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	2,7	9	1,256	0,363	1,176	0,274	0,6	134	54
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	1,5	5	1,265	0,454	1,185	0,343	1,2	23	5
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	1,1	4	1,081	0,371	1,013	0,280	0,3	51	18
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	2,3	6	1,097	0,410	1,027	0,310	0,5	2	8
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	3,1	6	1,299	0,447	1,216	0,338	1,3	10	14
			(8)	(8)	(8)	(8)			

C.cat	2,6	7	1,275 (4)	0,441 (4)	1,194 (4)	0,333 (4)	1,2	21	21
C.cat	3,6	8	1,159 (5)	0,422 (5)	1,086 (5)	0,319 (5)	0,7	45	17
C.cat	1,9	9	1,082 (4)	0,296 (4)	1,014 (4)	0,224 (4)	0,5	91	6
C.cat	2,8	2	1,277 (4)	0,302 (4)	1,195 (4)	0,228 (4)	0,9	57	29
C.cat	1,2	10	1,081 (4)	0,336 (4)	1,013 (4)	0,254 (4)	0,8	13	14
C.cat	1,7	9	1,174 (4)	0,430 (4)	1,099 (4)	0,325 (4)	1,2	66	8
C.cat	3,3	6	1,238 (4)	0,642 (4)	1,159 (4)	0,486 (4)	1	4	24
C.cat	1,9	4	1,283 (4)	0,341 (4)	1,202 (4)	0,258 (4)	0,8	22	21
C.cat	2,8	7	1,016 (3)	0,237 (3)	0,952 (3)	0,179 (3)	0,3	87	9
C.cat	1,4	9	1,182 (4)	0,406 (4)	1,107 (4)	0,307 (4)	1	58	31
C.cat	1,8	9	1,044 (4)	0,344 (4)	0,978 (4)	0,260 (4)	0,8	2	26
C.cat	3,5	2	1,256 (4)	0,716 (4)	1,176 (4)	0,542 (4)	1,2	39	21
C.cat	3,4	6	0,106 (1)	-0,243 (1)	0,099 (1)	-0,184 (1)	0,5	79	6
C.cat	2	1	1,175 (4)	0,331 (4)	1,100 (4)	0,250 (4)	0,4	50	34
C.cat	2,8	3	1,286 (5)	0,733 (5)	1,204 (5)	0,554 (5)	1,2	35	27
C.cat	1,4	6	1,268 (4)	0,300 (4)	1,187 (4)	0,227 (4)	1	76	21
C.cat	1,8	3	1,177 (4)	0,269 (4)	1,102 (4)	0,203 (4)	0,9	31	33
C.cat	3,6	5	0,652 (2)	0,024 (2)	0,611 (2)	0,018 (2)	1,1	50	9
C.cat	3,1	12	1,131 (3)	-0,103 (3)	1,059 (3)	-0,078 (3)	1,2	51	16
C.cat	3,4	8	0,000	-0,152	0,000	-0,115	1,1	68	1

C.cat	1,7	9	(1) 1,181	(1) 0,353	(1) 1,106	(1) 0,267	0,4	110	36
C.cat	1,3	8	(4) 1,269	(4) 0,419	(4) 1,188	(4) 0,317	0,6	14	22
C.cat	3,6	6	(4) 1,196	(4) 0,835	(4) 1,120	(4) 0,632	1,1	7	29
C.cat	2,8	9	(8) 0,999	(8) 0,226	(8) 0,935	(8) 0,171	0,5	19	3
C.cat	3,1	11	(3) 0,085	(3) -0,283	(3) 0,079	(3) -0,214	0,9	102	32
C.cat	2,5	1	(1) 1,057	(1) 0,403	(1) 0,990	(1) 0,304	0,6	53	19
C.cat	2,4	3	(4) 1,176	(4) 0,030	(4) 1,101	(4) 0,023	0,4	44	58
C.cat	2,8	7	(4) 1,281	(4) 0,303	(4) 1,199	(4) 0,229	0,6	52	50
C.cat	1,9	10	(4) 1,160	(4) 0,512	(4) 1,087	(4) 0,387	1,1	42	2
C.cat	1,7	12	(4) 1,086	(4) 0,353	(4) 1,017	(4) 0,267	0,6	26	35
C.cat	2,2	12	(4) 1,253	(4) 0,252	(4) 1,174	(4) 0,191	0,8	120	40
C.cat	3,4	5	(4) 0,000	(4) -0,152	(4) 0,000	(4) -0,115	1,1	80	1
C.cat	2,3	11	(1) 1,105	(1) 0,215	(1) 1,035	(1) 0,162	1,1	1	31
C.cat	2,2	12	(4) 1,278	(4) 0,256	(4) 1,197	(4) 0,194	1	34	9
C.cat	3,2	2	(4) 0,675	(4) -0,067	(4) 0,632	(4) -0,051	0,5	23	5
C.cat	2,4	11	(2) 1,169	(2) 0,306	(2) 1,095	(2) 0,231	1,2	20	28
C.cat	2,6	1	(4) 1,182	(4) 0,198	(4) 1,107	(4) 0,150	1	19	23
C.cat	2,4	3	(4) 1,070	(4) 0,337	(4) 1,002	(4) 0,255	0,8	31	24
C.cat	3,1	2	(4) 0,104	(4) -0,313	(4) 0,097	(4) -0,237	1,2	95	19

C.cat	3,5	9	1,008 (3)	0,034 (3)	0,944 (3)	0,026 (3)	0,9	35	6
C.cat	3,3	2	0,802 (2)	-0,024 (2)	0,751 (2)	-0,018 (2)	0,8	84	12
C.cat	1,4	1	1,265 (4)	0,407 (4)	1,185 (4)	0,308 (4)	1,3	88	9
C.cat	1,6	7	1,169 (4)	0,360 (4)	1,095 (4)	0,272 (4)	0,3	195	66
C.cat	1,9	5	1,062 (4)	0,290 (4)	0,994 (4)	0,220 (4)	1	53	4
C.cat	2,3	12	1,238 (4)	0,042 (4)	1,159 (4)	0,031 (4)	0,5	15	68
C.cat	2,7	8	1,048 (4)	0,397 (4)	0,982 (4)	0,300 (4)	1	42	27
C.cat	3,1	10	1,073 (3)	0,271 (3)	1,005 (3)	0,205 (3)	1	80	19
C.cat	1,7	1	1,264 (4)	0,424 (4)	1,183 (4)	0,320 (4)	0,9	114	9
C.cat	2,5	12	1,180 (4)	0,420 (4)	1,105 (4)	0,318 (4)	0,9	45	19
C.cat	2,6	1	1,087 (4)	0,563 (4)	1,018 (4)	0,426 (4)	0,2	104	16
C.cat	3,7	12	1,236 (4)	0,273 (4)	1,158 (4)	0,206 (4)	0,9	8	44
C.cat	3,1	6	1,030 (4)	0,153 (4)	0,964 (4)	0,116 (4)	0,3	3	2
C.cat	1,3	1	1,165 (4)	0,356 (4)	1,091 (4)	0,270 (4)	1,2	48	11
C.cat	1,8	8	1,273 (4)	0,307 (4)	1,192 (4)	0,232 (4)	1	73	11
C.cat	3,7	6	1,221 (4)	0,282 (4)	1,143 (4)	0,213 (4)	0,6	118	26
C.cat	3	6	1,265 (4)	0,204 (4)	1,185 (4)	0,154 (4)	0,9	23	8
C.cat	2,8	7	1,139 (4)	0,302 (4)	1,066 (4)	0,229 (4)	0,6	17	10
C.cat	1,9	3	1,064 (4)	0,242 (4)	0,996 (4)	0,183 (4)	0,2	13	15
C.cat	2,9	10	1,284	0,494	1,203	0,374	0,8	55	14

			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	3,5	12	0,084	-0,234	0,078	-0,177	0,3	41	23
			(1)	(1)	(1)	(1)			
C.cat	1,6	10	1,181	0,221	1,106	0,167	0,4	49	19
			(4)	(4)	(4)	(4)			
C.cat	3,3	4	1,161	0,525	1,087	0,397	0,9	0	0
			(3)	(3)	(3)	(3)			
C.cat	3,2	2	0,124	-0,255	0,116	-0,193	0,5	64	26
			(1)	(1)	(1)	(1)			
C.cat	3,4	6	0,081	-0,235	0,076	-0,178	0,5	70	10
			(1)	(1)	(1)	(1)			

^aОптимално растојање између тачака просторне решетке, ^bЕкстензија просторне решетке, ^cКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^dОптималан број главних компоненти/латентних варијабли, ^eКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-one-out (LOO) приступа и Y-мешањем, ^fКонвенционални квадратни коефицијент корелације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^gКоефицијент корелације унакрсне валидације добијен помоћу leave-some-out (LSO) методе и Y-мешањем, ^hОптимална вредности стандардне девијације (енг, minimum sigma), ⁱОптимална вредност диелектричне констане (енг, dielectric constant), ^jОптималне вредности максималних и минималних CutOff.

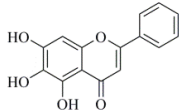
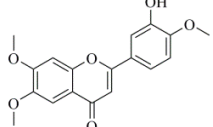
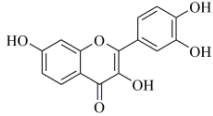
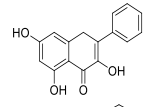
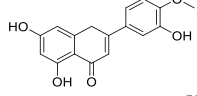
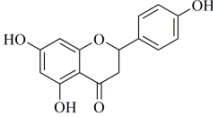
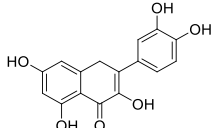
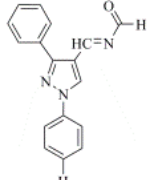
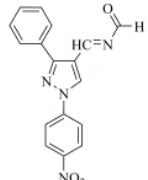
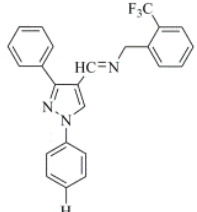
Табела ДМ10. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из N пробе на РС5 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

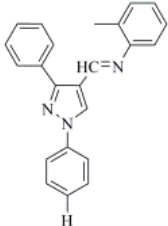
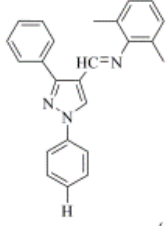
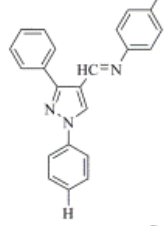
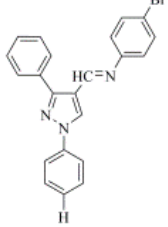
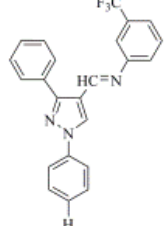
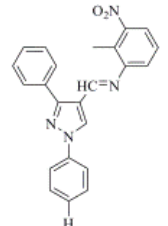
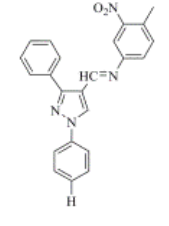
Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Предвиђено	Грешка
1ERR	9,74	9,68	0,06	9,47	0,27
1RK5	8,58	8,58	0,00	8,20	0,38
1SJ0	9,09	9,07	0,02	9,03	0,06
1UOM	7,78	7,78	0,00	8,02	-0,24
1XP1	9,30	9,29	0,01	9,27	0,03
1XP6	9,40	9,40	0,00	9,21	0,19
1XP9	8,89	8,86	0,03	8,72	0,17
1XPC	8,77	8,80	-0,03	8,93	-0,16
1XQC	7,20	7,19	0,01	7,59	-0,39
1YIM	8,82	8,81	0,02	8,59	0,23
1YIN	9,10	9,16	-0,06	9,33	-0,23
2IOG	8,09	8,09	0,00	8,09	0,00
2IOK	9,00	9,01	-0,01	8,74	0,26
2R6W	8,60	8,60	0,01	8,59	0,01
2R6Y	8,90	8,98	-0,08	9,14	-0,24
5AK2	8,40	8,38	0,02	8,88	-0,48

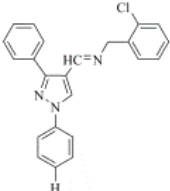
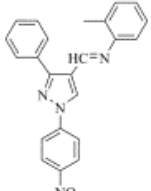
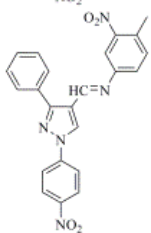
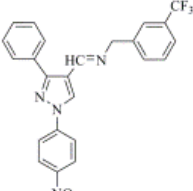
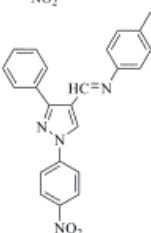
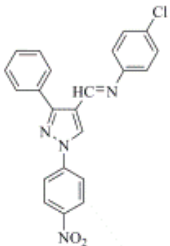
Табела ДМ1111. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из N пробе на РС5 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Предвиђено	Грешка
1ERR	9,74	9,47	0,27	8,21	1,53
1RK5	8,58	8,36	0,22	6,93	1,65
1SJ0	9,09	8,86	0,23	7,77	1,32
1UOM	7,78	7,57	0,21	6,76	1,03
1XP1	9,30	9,07	0,23	8,01	1,30
1XP6	9,40	9,18	0,22	7,94	1,46
1XP9	8,89	8,65	0,25	7,46	1,43
1XPC	8,77	8,58	0,19	7,67	1,10
1XQC	7,20	6,98	0,23	6,32	0,88
1YIM	8,82	8,59	0,23	7,33	1,50
1YIN	9,10	8,94	0,16	8,06	1,04
2IOG	8,09	7,88	0,21	6,83	1,27
2IOK	9,00	8,79	0,21	7,48	1,52
2R6W	8,60	8,38	0,22	7,33	1,27
2R6Y	8,90	8,77	0,13	7,88	1,02
5AK2	8,40	8,16	0,24	7,61	0,79

Табела ДМ12. Хемијске структуре, активност и СВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pIC_{50} помоћу модела генерисаног из Н пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pIC_{50}	Пред. pIC_{50}		Пред. pIC_{50}		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^b	АЕР ^B	
Бајкалеин		4,71	7,73	3,02	8,14	3,43	327
Еупаторин		5,09	6,63	1,54	7,25	2,16	327
Фисетин		5,38	5,83	0,45	6,14	0,76	328
Галангин		4,81	4,29	0,52	5,14	0,33	328
Хесперетин		4,4	3,84	0,56	4,37	0,03	328
Нарингенин		4,18	4,23	0,05	5,03	0,85	328
Кверцетин		4,76	7,83	3,07	7,81	3,05	328
I11-3a		3,70	8,33	4,63	8,92	5,22	329
I11-3b		3,47	8,13	4,66	8,47	5,00	329
I11-4a10		3,61	7,75	4,14	7,92	4,31	329

I11-4a1a		4,33	7,30	2,97	7,47	3,14	329
I11-4a2		4,13	5,41	1,28	5,70	1,57	329
I11-4a3b		4,25	4,97	0,72	5,93	1,68	329
I11-4a5		5,52	4,85	0,67	5,03	0,49	329
I114a6		4,89	5,52	0,63	5,26	0,37	329
I11-4a7		4,89	5,63	0,74	5,70	0,81	329
I11-4a8		5,40	6,84	1,44	7,03	1,63	329

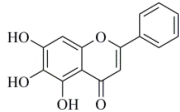
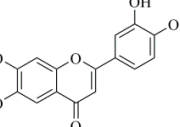
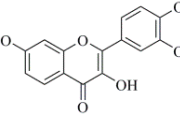
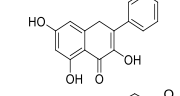
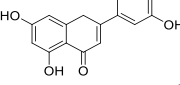
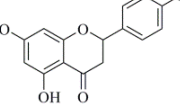
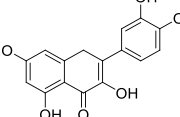
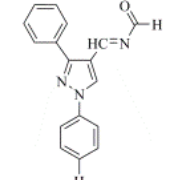
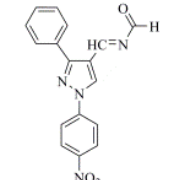
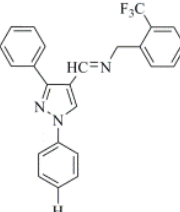
I11-4a9		4,89	7,74	2,85	8,25	3,36	329
I11-4b1		3,58	7,52	3,94	8,24	4,66	329
I11-4b6		3,63	5,07	1,44	6,03	2,40	329
I11-4b7		3,65	4,18	0,53	5,13	1,48	329
I11-4b2		3,58	4,86	1,28	6,24	2,66	329
I11-4b3		3,61	5,18	1,57	6,24	2,63	329

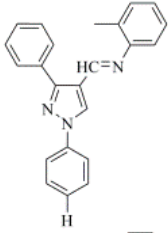
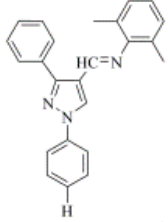
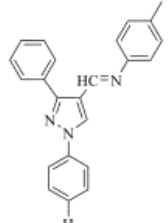
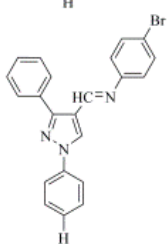
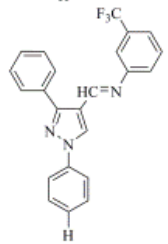
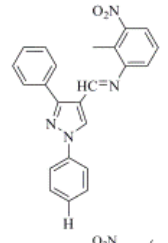
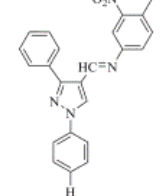
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

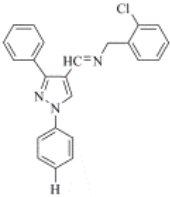
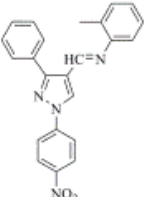
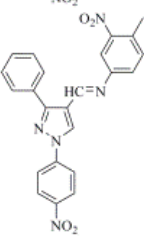
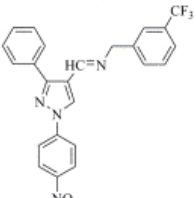
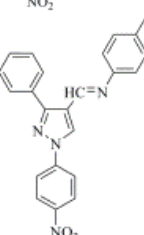
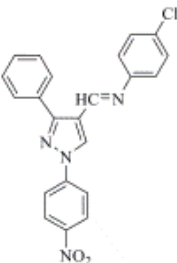
^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^cAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ13. Хемијске структуре, активност и ЛВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pIC_{50} помоћу модела генерисаног из Н пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pIC_{50}	Пред. pIC_{50}		Пред. pIC_{50}		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^b	АЕР ^B	
Бајкалеин		4,71	7,64	2,93	9,51	4,80	327
Еупаторин		5,09	6,54	1,45	8,62	3,53	327
Фисетин		5,38	5,74	0,36	7,51	2,13	328
Галангин		4,81	4,20	0,61	6,51	1,70	328
Хесперетин		4,4	3,75	0,65	5,74	1,34	328
Нарингенин		4,18	4,14	0,04	6,40	2,22	328
Кверцетин		4,76	7,74	2,98	9,18	4,42	328
I11-3a		3,70	8,24	4,54	10,29	6,59	329
I11-3b		3,47	8,04	4,57	9,84	6,37	329
I11-4a10		3,61	7,66	4,05	9,29	5,68	329

I11-4a1a		4,33	7,21	2,88	8,84	4,51	329
I11-4a2		4,13	5,32	1,19	7,07	2,94	329
I11-4a3b		4,25	4,88	0,63	7,30	3,05	329
I11-4a5		5,52	4,76	0,76	6,40	0,88	329
I11-4a6		4,89	5,43	0,54	6,63	1,74	329
I11-4a7		4,89	5,54	0,65	7,07	2,18	329
I11-4a8		5,40	6,75	1,35	8,40	3,00	329

I11-4a9		4,89	7,65	2,76	9,62	4,73	329
I11-4b1		3,58	7,43	3,85	9,61	6,03	329
I11-4b6		3,63	4,98	1,35	7,40	3,77	329
I11-4b7		3,65	4,09	0,44	6,50	2,85	329
I11-4b2		3,58	4,77	1,19	7,61	4,03	329
I11-4b3		3,61	5,09	1,48	7,61	4,00	329

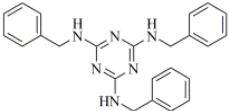
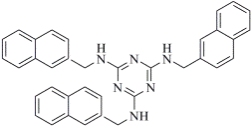
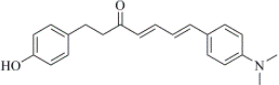
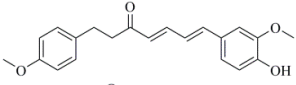
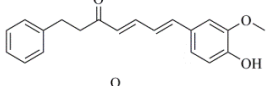
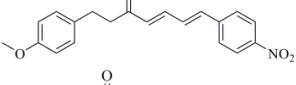
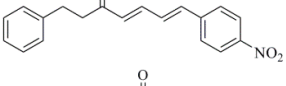
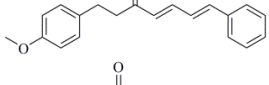
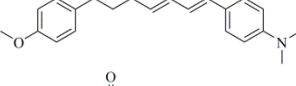
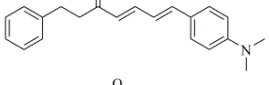
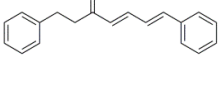
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ14. Хемијске структуре, активност и СВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу модела генерисаног из Н пробе на РС5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pK_i	Пред. pK_i		Пред. pK_i		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^б	АЕР ^B	
I3-I1		7,25	9,24	1,99	10,14	2,89	327
I3-I2		9,08	7,55	1,53	9,84	0,76	327
I3-I3		9,23	4,26	4,97	6,74	2,49	328
I3-I4		8,68	8,08	0,60	10,52	1,84	328
I3-I-A1		7,57	7,54	0,03	9,42	1,85	328
I3-I-A2		8,60	7,64	0,96	8,95	0,35	328
I3-I-A3		8,36	6,45	1,91	7,63	0,73	328
I3-I-B		8,49	5,41	3,08	7,79	0,70	329

I4-1c		3,39	8,67	5,28	10,52	7,13	329
I4-1e		4,49	6,37	1,88	8,54	4,05	329
I6-10		3,63	7,12	3,49	9,01	5,38	329
I6-12		5,86	3,64	2,22	5,62	0,24	329
I6-14		6,01	5,98	0,03	8,38	2,37	329
I6-15		5,63	4,70	0,93	5,84	0,21	329
I6-16		6,29	4,59	1,70	5,63	0,66	327
I6-17		5,83	5,00	0,83	7,40	1,57	327
I6-18		5,66	6,58	0,92	7,51	1,85	328
I6-19		6,04	5,31	0,73	6,62	0,58	328
I6-1		6,19	5,77	0,42	8,51	2,32	328

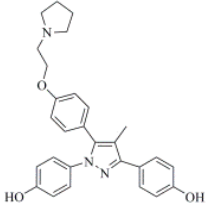
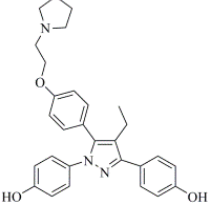
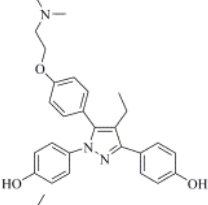
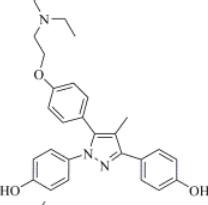
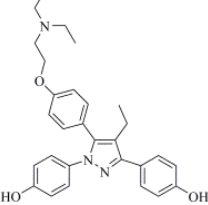
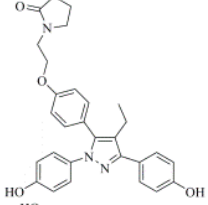
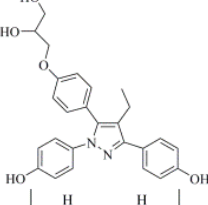
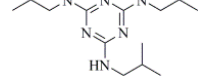
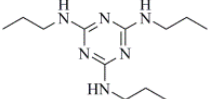
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

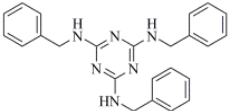
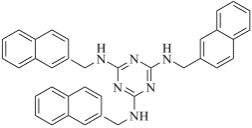
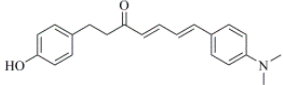
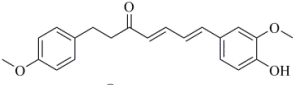
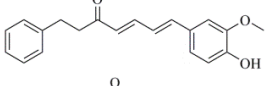
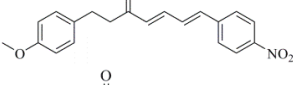
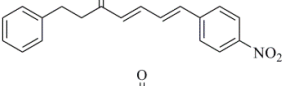
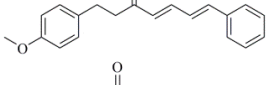
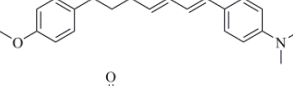
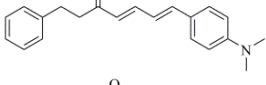
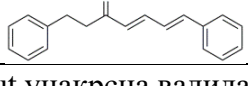
^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ15. Хемијске структуре, активност и ЛВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу модела генерисаног из Н пробе на РС5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pK_i	Пред. pK_i		Пред. pK_i		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^b	АЕР ^B	
I3-I1		7,25	9,16	1,91	9,15	1,90	327
I3-I2		9,08	7,47	1,61	8,85	0,24	327
I3-I3		9,23	4,18	5,05	5,75	3,49	328
I3-I4		8,68	8,00	0,68	9,53	0,85	328
I3-I-A1		7,57	7,46	0,11	8,43	0,86	328
I3-I-A2		8,60	7,56	1,04	7,96	0,65	328
I3-I-A3		8,36	6,37	1,99	6,64	1,73	328
I3-I-B		8,49	5,33	3,16	6,80	1,70	329

I3-I-C1		7,60	8,77	1,17	8,28	0,68	329
I3-I-C2		8,72	6,98	1,74	7,65	1,08	329
I3-I-D		8,48	7,85	0,63	8,28	0,21	329
I3-I-E1		8,42	7,12	1,30	7,62	0,81	329
I3-I-E2		8,74	6,47	2,27	6,36	2,39	329
I3-I-F		8,64	6,68	1,96	6,89	1,76	329
I3-I-G		8,37	9,57	1,20	8,41	0,04	329
I4-1a		3,19	6,68	3,49	6,58	3,39	329
I4-1b		3,10	8,56	5,46	9,40	6,30	329

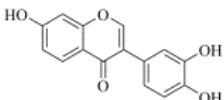
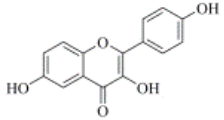
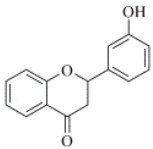
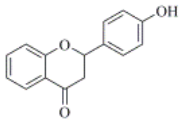
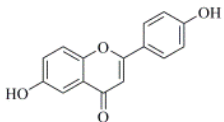
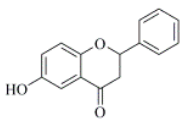
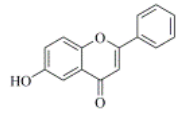
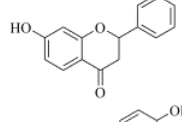
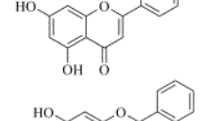
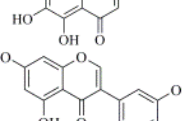

I4-1c		3,39	8,59	5,20	9,53	6,14	329
I4-1e		4,49	6,29	1,80	7,55	3,06	329
I6-10		3,63	7,04	3,41	8,02	4,39	329
I6-12		5,86	3,56	2,30	4,63	1,24	329
I6-14		6,01	5,90	0,11	7,39	1,38	329
I6-15		5,63	4,62	1,01	4,85	0,78	329
I6-16		6,29	4,51	1,78	4,64	1,66	327
I6-17		5,83	4,92	0,91	6,41	0,58	327
I6-18		5,66	6,50	0,84	6,52	0,86	328
I6-19		6,04	5,23	0,81	5,63	0,42	328
I6-1		6,19	5,69	0,50	7,52	1,33	328

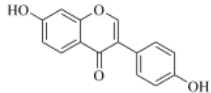
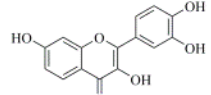
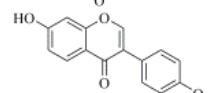
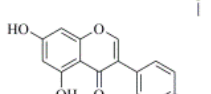
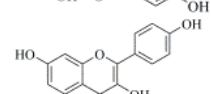
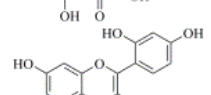
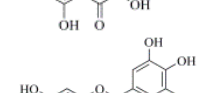
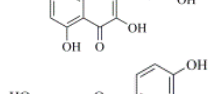
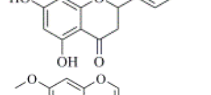
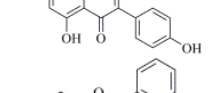
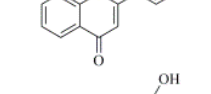
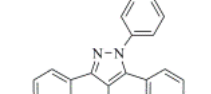
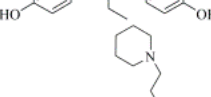
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

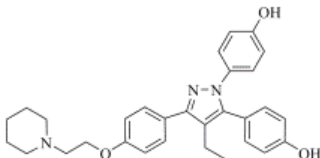
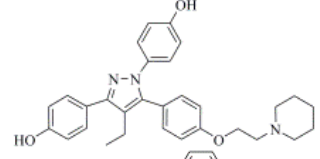
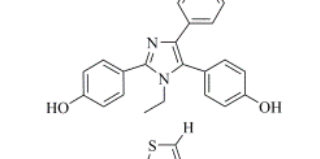
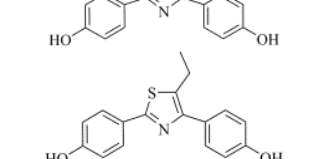
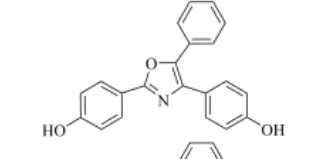
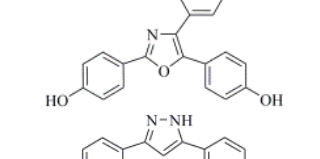
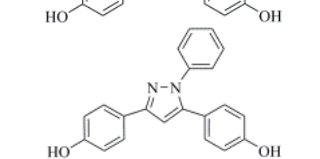
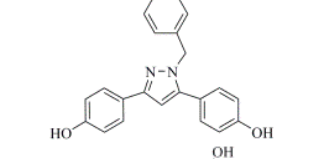
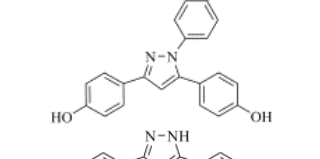
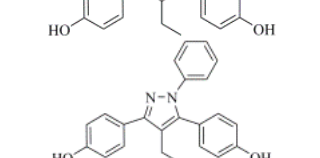


^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

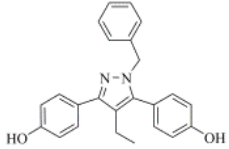
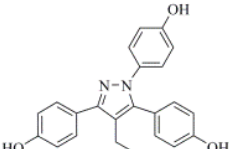
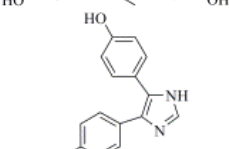
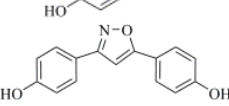
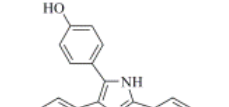
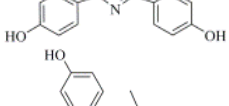
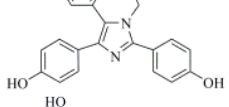
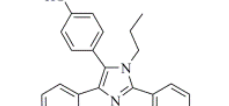
^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табле ДМ16. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pRBA помоћу модела генерисаног из Н пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pRBA	Пред. pRBA		Пред. pRBA		Реф.
			LOO ^a	AEP ^B	LSO ^b	AEP ^B	
3',4',7-трихидрокси изофлаван		5,35	8,57	3,22	10,52	5,17	330
3,6,4'-трихидрокси флаван		3,35	7,57	4,22	9,52	6,17	330
3'-хидроксифлаванон		5,77	6,46	0,69	8,41	2,64	330
4'-хидроксифлаванон		5,64	5,67	0,03	7,62	1,98	330
6,4'-дихидроксифлаванон		3,82	7,38	3,56	8,41	4,59	330
6-хидроксифлаванон		6,05	7,67	1,62	8,52	2,47	331
6-хидроксифлаванон		6,4	7,42	1,02	8,42	2,02	331
7-хидроксифлаванон		6,72	7,42	0,70	8,30	1,58	331
Апигенин		4,55	6,56	2,01	7,52	2,97	332
Бајкалеин		6,05	6,58	0,53	6,75	0,70	332
Биоканин А		5,37	8,17	2,80	9,62	4,25	332

Диазенин		4,64	7,78	3,14	8,64	4,00	332
Фисетин		5,35	6,65	1,30	7,63	2,28	332
Формонетин		5,89	7,79	1,90	9,41	3,52	332
Генистеин		3,35	6,74	3,39	8,52	5,17	332
Камферол		4,60	7,25	2,65	8,62	4,02	333
Морин		6,35	7,57	1,22	8,52	2,17	333
Мирицетин		5,75	6,23	0,48	6,96	1,21	333
Нарингенин		5,13	6,46	1,33	7,08	1,95	333
Прунетин		5,75	4,23	1,52	4,75	1,01	333
Флавоон		5,35	5,57	0,22	6,40	1,05	333
I101		1,45	8,57	7,12	9,30	7,85	333
I102		3,19	8,38	5,19	9,30	6,11	333
I103		3,30	7,53	4,23	8,30	5,00	333

I104		3,88	8,18	4,30	8,98	5,10	333
I105		1,94	6,95	5,01	8,63	6,69	333
I912		3,60	6,90	3,30	8,43	4,83	333
I922a		5,35	8,57	3,22	10,52	5,17	333
I922b		3,35	7,57	4,22	9,52	6,17	330
I929		5,77	6,46	0,69	8,41	2,64	330
I931		5,64	5,67	0,03	7,62	1,98	330
I935a		3,82	7,38	3,56	8,41	4,59	330
I935b		6,05	7,67	1,62	8,52	2,47	330
I935c		6,40	7,42	1,02	8,42	2,02	331
I935d		6,72	7,42	0,70	8,30	1,58	331
I938a		4,55	6,56	2,01	7,52	2,97	331
I938b		6,05	6,58	0,53	6,75	0,70	332

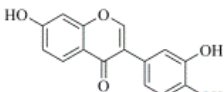
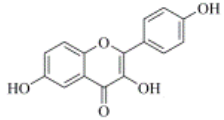
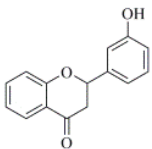
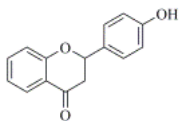
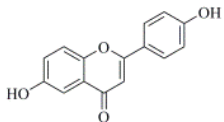
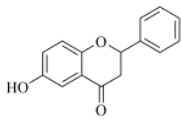
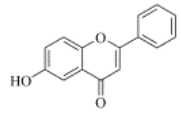
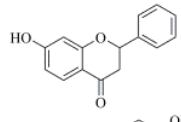
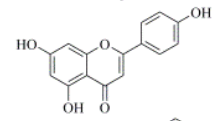
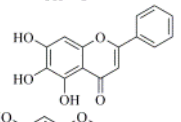
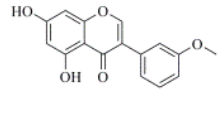
I938c		5,37	8,57	3,22	10,52	5,17	332
I938d		4,64	7,57	4,22	9,52	6,17	332
I93		5,35	6,46	0,69	8,41	2,64	332
I941		5,89	5,67	0,03	7,62	1,98	332
I96a		3,35	7,38	3,56	8,41	4,59	332
I96b		4,60	7,67	1,62	8,52	2,47	332
I96c		6,35	7,42	1,02	8,42	2,02	333
I96d		5,75	7,42	0,70	8,30	1,58	333

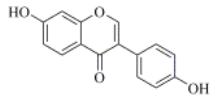
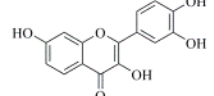
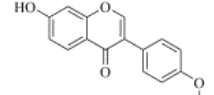
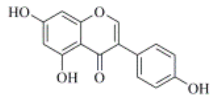
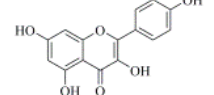
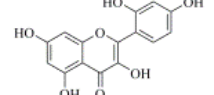
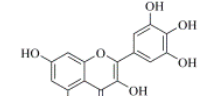
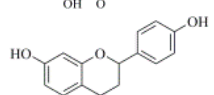
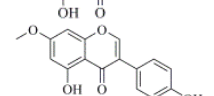
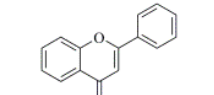
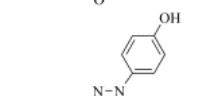
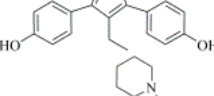
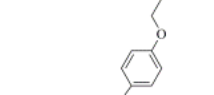
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ17. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pRBA помоћу модела генерисаног из Н пробе на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pRBA	Пред. pRBA		Пред. pRBA		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^b	АЕР ^B	
3',4',7-трихидрокси изофлаван		5,35	8,44	3,09	7,63	2,28	330
3,6,4'-трихидрокси флаван		3,35	7,44	4,09	6,63	3,28	330
3'-хидроксифлаванон		5,77	6,33	0,56	5,52	0,25	330
4'-хидроксифлаванон		5,64	5,54	0,10	4,73	0,91	330
6,4'-дихидроксифлаванон		3,82	7,25	3,43	5,52	1,70	330
6-хидроксифлаванон		6,05	7,54	1,49	5,63	0,42	331
6-хидроксифлаванон		6,4	7,29	0,89	5,53	0,87	331
7-хидроксифлаванон		6,72	7,29	0,57	5,41	1,31	331
Апигенин		4,55	6,43	1,88	4,63	0,08	332
Бајкалеин		6,05	6,45	0,40	3,86	2,19	332
Биоканин А		5,37	8,04	2,67	6,73	1,36	332

Диазенин		4,64	7,65	3,01	5,75	1,11	332
Фисетин		5,35	6,52	1,17	4,74	0,61	332
Формонетин		5,89	7,66	1,77	6,52	0,63	332
Генистеин		3,35	6,61	3,26	5,63	2,28	332
Камферол		4,6	7,12	2,52	5,73	1,13	333
Морин		6,35	7,44	1,09	5,63	0,72	333
Мирицетин		5,75	6,10	0,35	4,07	1,68	333
Нарингенин		5,13	6,33	1,20	4,19	0,94	333
Прунетин		5,75	4,10	1,65	1,86	3,89	333
Флавон		5,35	5,44	0,09	3,51	1,84	333
I101		1,45	8,44	6,99	6,41	4,96	333
I102		3,19	8,25	5,06	6,41	3,22	333
I103		3,3	7,40	4,10	5,41	2,11	333

I104		3,88	8,05	4,17	6,09	2,21	333
I105		1,94	6,82	4,88	5,74	3,80	333
I912		3,6	6,77	3,17	5,54	1,94	333
I922a		5,35	8,44	3,09	7,63	2,28	333
I922b		3,35	7,44	4,09	6,63	3,28	330
I929		5,77	6,33	0,56	5,52	0,25	330
I931		5,64	5,54	0,10	4,73	0,91	330
I935a		3,82	7,25	3,43	5,52	1,70	330
I935b		6,05	7,54	1,49	5,63	0,42	330
I935c		6,4	7,29	0,89	5,53	0,87	331
I935d		6,72	7,29	0,57	5,41	1,31	331
I938a		4,55	6,43	1,88	4,63	0,08	331
I938b		6,05	6,45	0,40	3,86	2,19	332

I938c		5,37	8,44	3,09	7,63	2,28	332
I938d		4,64	7,44	4,09	6,63	3,28	332
I93		5,35	6,33	0,56	5,52	0,25	332
I941		5,89	5,54	0,10	4,73	0,91	332
I96a		3,35	7,25	3,43	5,52	1,70	332
I96b		4,6	7,54	1,49	5,63	0,42	332
I96c		6,35	7,29	0,89	5,53	0,87	333
I96d		5,75	7,29	0,57	5,41	1,31	333

^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

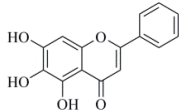
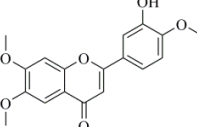
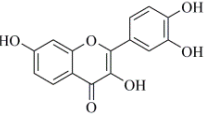
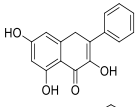
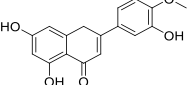
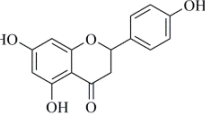
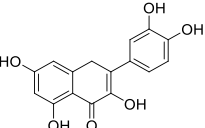
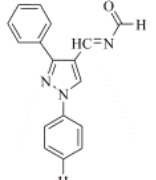
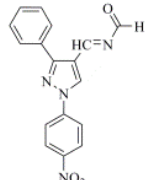
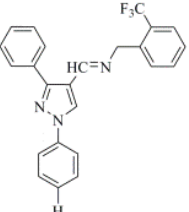
Табела ДМ18. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из STE.HV поља на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-one-out унакрсне валидације.

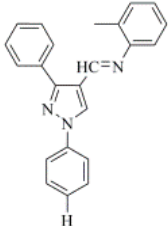
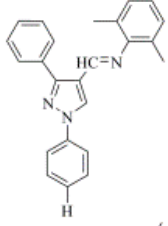
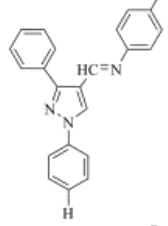
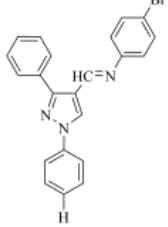
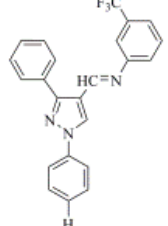
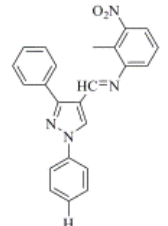
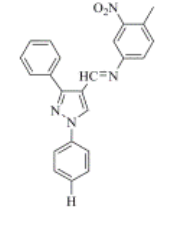
Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Предвиђено	Грешка
1ERR	9,74	8,73	1,02	8,51	1,23
1RK5	8,58	8,39	0,19	8,45	0,13
1SJ0	9,09	9,08	0,01	9,05	0,04
1UOM	7,78	8,28	-0,50	8,42	-0,64
1XP1	9,30	9,10	0,20	9,03	0,27
1XP6	9,40	9,32	0,08	9,06	0,34
1XP9	8,89	9,06	-0,17	9,07	-0,18
1XPC	8,77	7,58	-0,38	8,09	-0,89
1XQC	7,20	7,58	-0,38	8,09	-0,89
1YIM	8,82	8,98	-0,16	8,98	-0,16
1YIN	9,10	8,53	0,57	8,44	0,66
2IOG	8,09	9,13	-1,04	9,45	-1,36
2IOK	9,00	9,08	-0,08	8,72	0,28
2R6W	8,60	8,40	0,20	8,40	0,20
2R6Y	8,90	8,65	0,25	8,61	0,29
5AK2	8,40	8,53	-0,13	8,74	-0,34

Табела ДМ19. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу модела генерисаног из STE.HV поља на PC5 након процедуре симулираног хлађења и leave-some-out унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунао	Грешка	Предвиђено	Грешка
1ERR	9,74	8,37	0,21	7,96	0,62
1RK5	8,58	8,62	-0,22	8,01	0,39
1SJ0	9,09	8,41	0,59	7,64	1,36
1UOM	7,78	8,12	0,78	7,26	1,64
1XP1	9,30	9,74	-1,14	8,31	0,29
1XP6	9,40	9,03	-0,94	8,62	-0,53
1XP9	8,89	8,62	0,48	7,63	1,47
1XPC	8,77	7,36	1,46	6,94	1,88
1XQC	7,20	7,91	-0,71	7,61	-0,41
1YIM	8,82	8,02	0,75	7,51	1,26
1YIN	9,10	8,06	0,83	7,61	1,28
2IOG	8,09	8,36	1,04	7,15	2,25
2IOK	9,00	7,16	2,14	7,63	1,67
2R6W	8,60	8,32	-0,54	7,15	0,63
2R6Y	8,90	7,69	1,40	7,89	1,20
5AK2	8,40	7,31	2,43	7,15	2,59

Табела ДМ20. Хемијске структуре, активност и СВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pIC_{50} помоћу модела генерисаног из STE.HВ поља на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pIC_{50}	Пред. pIC_{50}		Пред. pIC_{50}		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^b	АЕР ^B	
Бајкалеин		4,71	7,41	2,70	9,47	4,76	327
Еупаторин		5,09	6,31	1,22	8,58	3,49	327
Фисетин		5,38	5,51	0,13	7,47	2,09	328
Галангин		4,81	3,97	0,84	6,47	1,66	328
Хесперетин		4,4	3,52	0,88	5,70	1,30	328
Нарингенин		4,18	3,91	0,27	6,36	2,18	328
Кверцетин		4,76	7,51	2,75	9,14	4,38	328
I11-3a		3,70	8,01	4,31	10,25	6,55	329
I11-3b		3,47	7,81	4,34	9,80	6,33	329
I11-4a10		3,61	7,43	3,82	9,25	5,64	329

I11-4a1a		4,33	6,98	2,65	8,80	4,47	329
I11-4a2		4,13	5,09	0,96	7,03	2,90	329
I11-4a3b		4,25	4,65	0,40	7,26	3,01	329
I11-4a5		5,52	4,53	0,99	6,36	0,84	329
I114a6		4,89	5,20	0,31	6,59	1,70	329
I11-4a7		4,89	5,31	0,42	7,03	2,14	329
I11-4a8		5,40	6,52	1,12	8,36	2,96	329

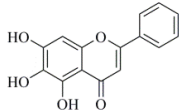
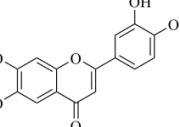
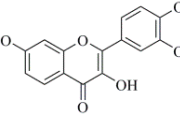
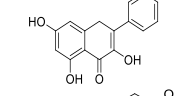
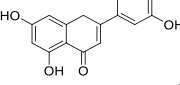
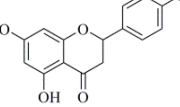
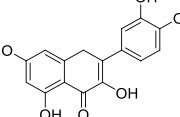
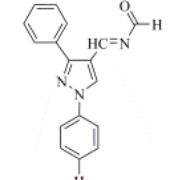
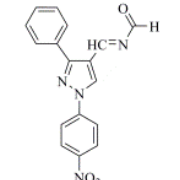
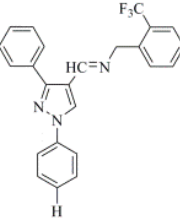
I11-4a9		4,89	7,42	2,53	9,58	4,69	329
I11-4b1		3,58	7,20	3,62	9,57	5,99	329
I11-4b6		3,63	4,75	1,12	7,36	3,73	329
I11-4b7		3,65	3,86	0,21	6,46	2,81	329
I11-4b2		3,58	4,54	0,96	7,57	3,99	329
I11-4b3		3,61	4,86	1,25	7,57	3,96	329

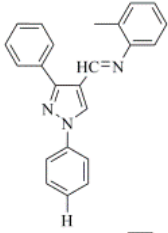
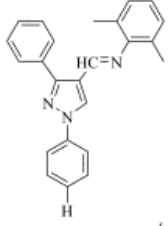
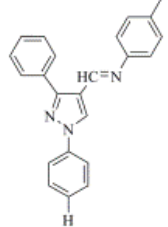
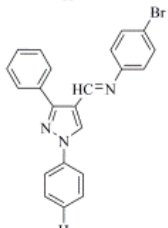
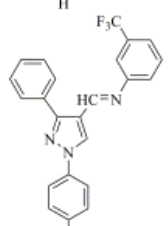
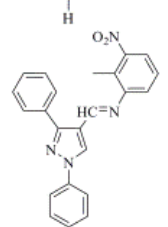
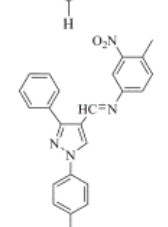
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

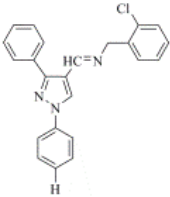
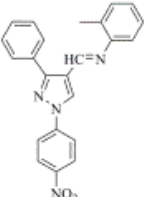
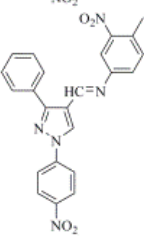
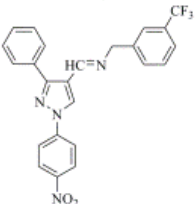
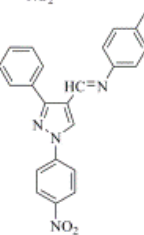
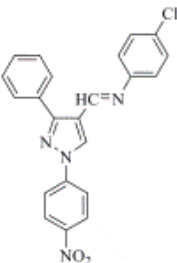
^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ21. Хемијске структуре, активност и LV предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pIC_{50} помоћу модела генерисаног из STE.HV поља на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pIC_{50}	Пред. pIC_{50}		Пред. pIC_{50}		Реф.
			LOO ^a	AEP ^B	LSO ^b	AEP ^B	
Бајкалеин		4,71	7,19	2,48	9,50	4,79	327
Еупаторин		5,09	6,09	1,00	8,61	3,52	327
Фисетин		5,38	5,29	0,09	7,50	2,12	328
Галангин		4,81	3,75	1,06	6,50	1,69	328
Хесперетин		4,4	3,30	1,10	5,73	1,33	328
Нарингенин		4,18	3,69	0,49	6,39	2,21	328
Кверцетин		4,76	7,29	2,53	9,17	4,41	328
I11-3a		3,70	7,79	4,09	10,28	6,58	329
I11-3b		3,47	7,59	4,12	9,83	6,36	329
I11-4a10		3,61	7,21	3,60	9,28	5,67	329

I11-4a1a		4,33	6,76	2,43	8,83	4,50	329
I11-4a2		4,13	4,87	0,74	7,06	2,93	329
I11-4a3b		4,25	4,43	0,18	7,29	3,04	329
I11-4a5		5,52	4,31	1,21	6,39	0,87	329
I11-4a6		4,89	4,98	0,09	6,62	1,73	329
I11-4a7		4,89	5,09	0,20	7,06	2,17	329
I11-4a8		5,40	6,30	0,90	8,39	2,99	329

I11-4a9		4,89	7,20	2,31	9,61	4,72	329
I11-4b1		3,58	6,98	3,40	9,60	6,02	329
I11-4b6		3,63	4,53	0,90	7,39	3,76	329
I11-4b7		3,65	3,64	0,01	6,49	2,84	329
I11-4b2		3,58	4,32	0,74	7,60	4,02	329
I11-4b3		3,61	4,64	1,03	7,60	3,99	329

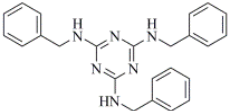
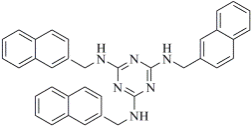
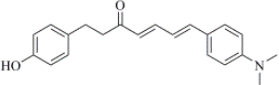
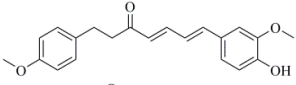
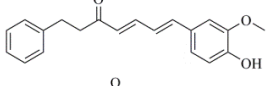
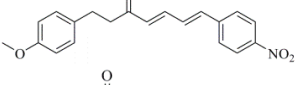
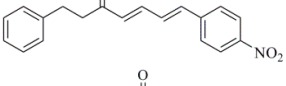
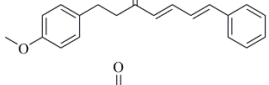
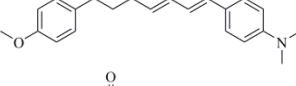
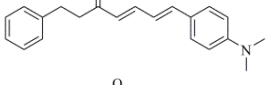
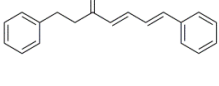
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ22. Хемијске структуре, активност и СВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу модела генерисаног из STE.HВ поља на РС5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pK_i	Пред. pK_i		Пред. pK_i		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^c	АЕР ^B	
I3-I1		7,25	8,70	1,45	11,50	4,25	330
I3-I2		9,08	7,01	2,07	11,20	2,12	330
I3-I3		9,23	3,72	5,51	8,10	1,13	330
I3-I4		8,68	7,54	1,14	11,88	3,20	330
I3-I-A1		7,57	7,00	0,57	10,78	3,21	330
I3-I-A2		8,60	7,10	1,50	10,31	1,71	331
I3-I-A3		8,36	5,91	2,45	8,99	0,63	331
I3-I-B		8,49	4,87	3,62	9,15	0,66	331

I4-1c		3,39	8,13	4,74	11,88	8,49	333
I4-1e		4,49	5,83	1,34	9,90	5,41	333
I6-10		3,63	6,58	2,95	10,37	6,74	333
I6-12		5,86	3,10	2,76	6,98	1,12	333
I6-14		6,01	5,44	0,57	9,74	3,73	333
I6-15		5,63	4,16	1,47	7,20	1,57	333
I6-16		6,29	8,70	1,45	11,50	4,25	333
I6-17		5,83	7,01	2,07	11,20	2,12	333
I6-18		5,66	3,72	5,51	8,10	1,13	333
I6-19		6,04	7,54	1,14	11,88	3,20	333
I6-1		6,19	7,00	0,57	10,78	3,21	333

^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

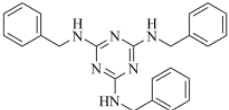
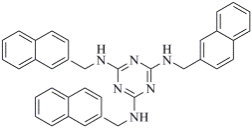
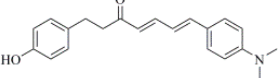
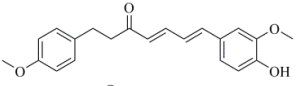
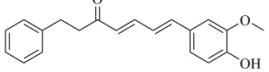
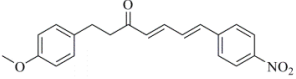
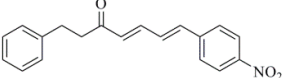
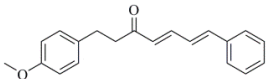
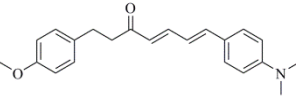
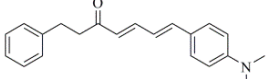
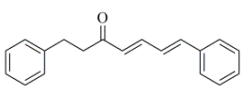
^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^cAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ22. Хемијске структуре, активност и ЛВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу модела генерисаног из STE.HВ поља на РС5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pK_i	Пред. pK_i		Пред. pK_i		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^b	АЕР ^B	
I3-I1		7,25	8,98	1,73	10,98	3,73	330
I3-I2		9,08	7,29	1,79	10,68	1,60	330
I3-I3		9,23	4,00	5,23	7,58	1,65	330
I3-I4		8,68	7,82	0,86	11,36	2,68	330
I3-I-A1		7,57	7,28	0,29	10,26	2,69	330
I3-I-A2		8,60	7,38	1,22	9,79	1,19	331
I3-I-A3		8,36	6,19	2,17	8,47	0,11	331
I3-I-B		8,49	5,15	3,34	8,63	0,14	331

I3-I-C1		7,60	8,59	0,99	10,11	2,51	332
I3-I-C2		8,72	6,80	1,92	9,48	0,76	332
I3-I-D		8,48	7,67	0,81	10,11	1,63	332
I3-I-E1		8,42	6,94	1,48	9,45	1,03	332
I3-I-E2		8,74	6,29	2,45	8,19	0,55	332
I3-I-F		8,64	6,50	2,14	8,72	0,08	332
I3-I-G		8,37	9,39	1,02	10,24	1,87	332
I4-1a		3,19	6,50	3,31	8,41	5,22	333
I4-1b		3,10	8,38	5,28	11,23	8,13	333

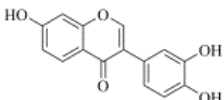
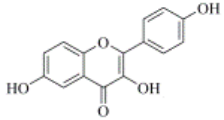
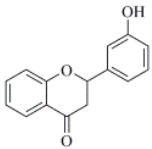
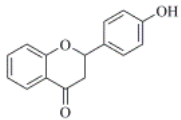
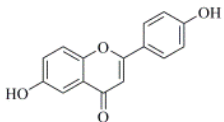
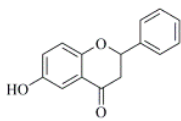
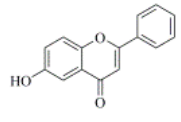
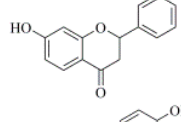
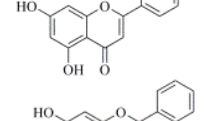
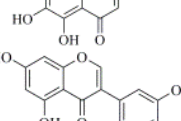

I4-1c		3,39	8,41	5,02	11,36	7,97	333
I4-1e		4,49	6,11	1,62	9,38	4,89	333
I6-10		3,63	6,86	3,23	9,85	6,22	333
I6-12		5,86	3,38	2,48	6,46	0,60	333
I6-14		6,01	5,72	0,29	9,22	3,21	333
I6-15		5,63	4,44	1,19	6,68	1,05	333
I6-16		6,29	8,98	1,73	10,98	3,73	333
I6-17		5,83	7,29	1,79	10,68	1,60	333
I6-18		5,66	4,00	5,23	7,58	1,65	333
I6-19		6,04	7,82	0,86	11,36	2,68	333
I6-1		6,19	7,28	0,29	10,26	2,69	333

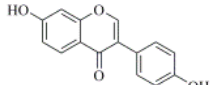
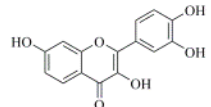
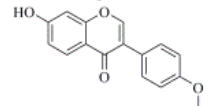
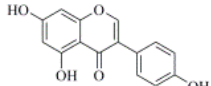
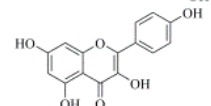
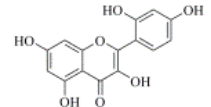
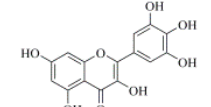
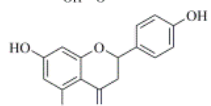
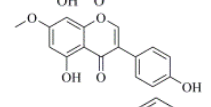
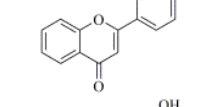
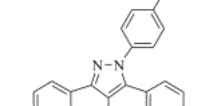
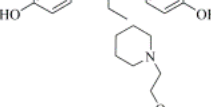
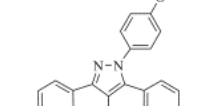
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

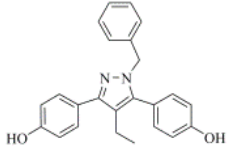
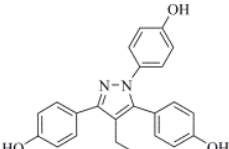
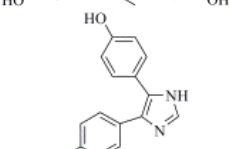
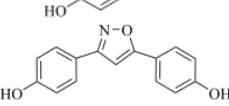
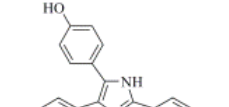
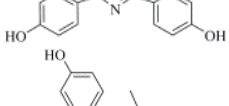
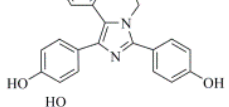
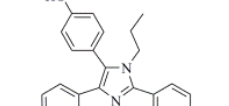
^cAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табле ДМ24. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pRBA помоћу модела генерисаног из STE.HB поља на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pRBA	Пред. pRBA		Пред. pRBA		Реф.
			LOO ^a	AEP ^B	LSO ^b	AEP ^B	
3',4',7-трихидрокси изофлаван		5,35	8,31	2,96	11,36	6,01	330
3,6,4'-трихидрокси флаван		3,35	7,31	3,96	10,36	7,01	330
3'-хидроксифлаванон		5,77	6,20	0,43	9,25	3,48	330
4'-хидроксифлаванон		5,64	5,41	0,23	8,46	2,82	330
6,4'-дихидроксифлаванон		3,82	7,12	3,30	9,25	5,43	330
6-хидроксифлаванон		6,05	7,41	1,36	9,36	3,31	331
6-хидроксифлаванон		6,4	7,16	0,76	9,26	2,86	331
7-хидроксифлаванон		6,72	7,16	0,44	9,14	2,42	331
Апигенин		4,55	6,30	1,75	8,36	3,81	332
Бајкалеин		6,05	6,32	0,27	7,59	1,54	332
Биоканин А		5,37	7,91	2,54	10,46	5,09	332

Диазенин		4,64	7,52	2,88	9,48	4,84	332
Фисетин		5,35	6,39	1,04	8,47	3,12	332
Формонетин		5,89	7,53	1,64	10,25	4,36	332
Генистеин		3,35	6,48	3,13	9,36	6,01	332
Камферол		4,60	6,99	2,39	9,46	4,86	333
Морин		6,35	7,31	0,96	9,36	3,01	333
Мирицетин		5,75	5,97	0,22	7,80	2,05	333
Нарингенин		5,13	6,20	1,07	7,92	2,79	333
Прунетин		5,75	3,97	1,78	5,59	0,16	333
Флавоон		5,35	5,31	0,04	7,24	1,89	333
I101		1,45	8,31	6,86	10,14	8,69	333
I102		3,19	8,12	4,93	10,14	6,95	333
I103		3,30	7,27	3,97	9,14	5,84	333

I104		3,88	7,92	4,04	9,82	5,94	333
I105		1,94	6,69	4,75	9,47	7,53	333
I912		3,60	6,64	3,04	9,27	5,67	333
I922a		5,35	8,31	2,96	11,36	6,01	333
I922b		3,35	7,31	3,96	10,36	7,01	330
I929		5,77	6,20	0,43	9,25	3,48	330
I931		5,64	5,41	0,23	8,46	2,82	330
I935a		3,82	7,12	3,30	9,25	5,43	330
I935b		6,05	7,41	1,36	9,36	3,31	330
I935c		6,40	7,16	0,76	9,26	2,86	331
I935d		6,72	7,16	0,44	9,14	2,42	331
I938a		4,55	6,30	1,75	8,36	3,81	331
I938b		6,05	6,32	0,27	7,59	1,54	332

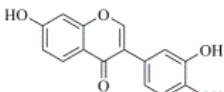
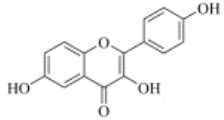
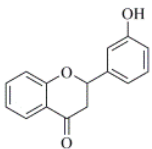
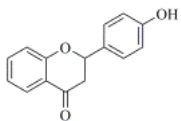
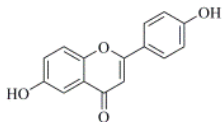
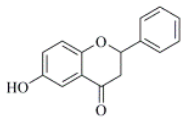
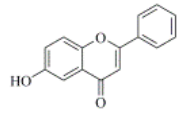
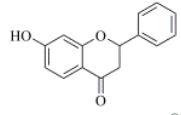
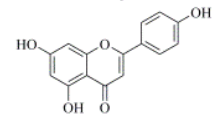
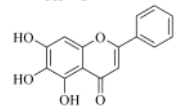
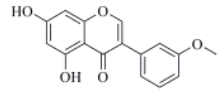
I938c		5,37	8,31	2,94	11,36	5,99	332
I938d		4,64	7,31	2,67	10,36	5,72	332
I93		5,35	6,20	0,85	9,25	3,90	332
I941		5,89	5,41	0,48	8,46	2,57	332
I96a		3,35	7,12	3,77	9,25	5,90	332
I96b		4,60	7,41	2,81	9,36	4,76	332
I96c		6,35	7,16	0,81	9,26	2,91	333
I96d		5,75	7,16	1,41	9,14	3,39	333

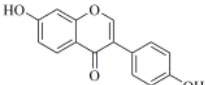
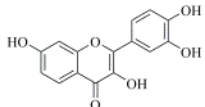
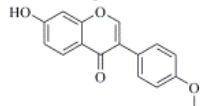
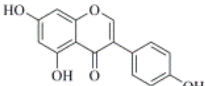
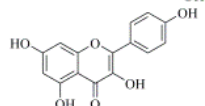
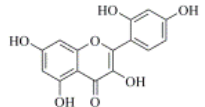
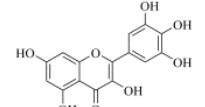
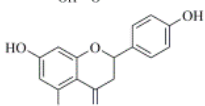
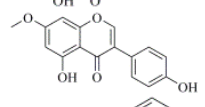
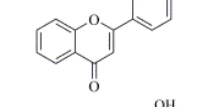
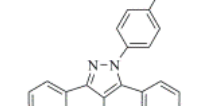
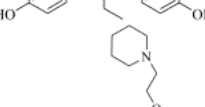
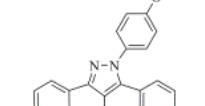
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

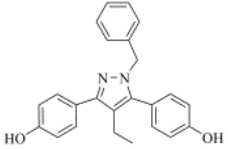
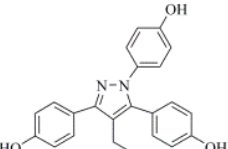
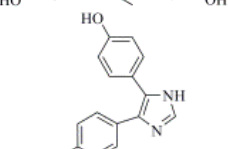
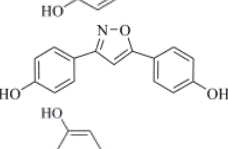
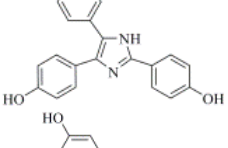
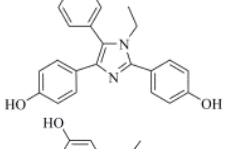
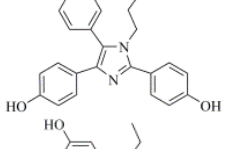
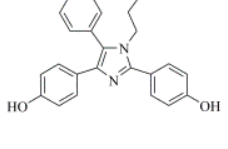
^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ25. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pRBA помоћу модела генерисаног из STE.HB поља на PC5 након поступка симулираног хлађења и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pRBA	Пред. pRBA		Пред. pRBA		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^б	АЕР ^B	
3',4',7-трихидрокси изофлаван		5,35	8,13	2,78	11,88	6,53	330
3,6,4'-трихидрокси флаван		3,35	7,13	3,78	10,88	7,53	330
3'-хидроксифлаванон		5,77	6,02	0,25	9,77	4,00	330
4'-хидроксифлаванон		5,64	5,23	0,41	8,98	3,34	330
6,4'-дихидроксифлаванон		3,82	6,94	3,12	9,77	5,95	330
6-хидроксифлаванон		6,05	7,23	1,18	9,88	3,83	331
6-хидроксифлаванон		6,4	6,98	0,58	9,78	3,38	331
7-хидроксифлаванон		6,72	6,98	0,26	9,66	2,94	331
Апигенин		4,55	6,12	1,57	8,88	4,33	332
Бајкалеин		6,05	6,14	0,09	8,11	2,06	332
Биоканин А		5,37	7,73	2,36	10,98	5,61	332

Диазенин		4,64	7,34	2,70	10,00	5,36	332
Фисетин		5,35	6,21	0,86	8,99	3,64	332
Формонетин		5,89	7,35	1,46	10,77	4,88	332
Генистеин		3,35	6,30	2,95	9,88	6,53	332
Камферол		4,6	6,81	2,21	9,98	5,38	333
Морин		6,35	7,13	0,78	9,88	3,53	333
Мирицетин		5,75	5,79	0,04	8,32	2,57	333
Нарингенин		5,13	6,02	0,89	8,44	3,31	333
Прунетин		5,75	3,79	1,96	6,11	0,36	333
Флавоон		5,35	5,13	0,22	7,76	2,41	333
I101		1,45	8,13	6,68	10,66	9,21	333
I102		3,19	7,94	4,75	10,66	7,47	333
I103		3,3	7,09	3,79	9,66	6,36	333

I104		3,88	7,74	3,86	10,34	6,46	333
I105		1,94	6,51	4,57	9,99	8,05	333
I912		3,6	6,46	2,86	9,79	6,19	333
I922a		5,35	8,13	2,78	11,88	6,53	333
I922b		3,35	7,13	3,78	10,88	7,53	330
I929		5,77	6,02	0,25	9,77	4,00	330
I931		5,64	5,23	0,41	8,98	3,34	330
I935a		3,82	6,94	3,12	9,77	5,95	330
I935b		6,05	7,23	1,18	9,88	3,83	330
I935c		6,4	6,98	0,58	9,78	3,38	331
I935d		6,72	6,98	0,26	9,66	2,94	331
I938a		4,55	6,12	1,57	8,88	4,33	331
I938b		6,05	6,14	0,09	8,11	2,06	332

I938c		5,37	8,13	2,76	11,88	6,51	332
I938d		4,64	7,13	2,49	10,88	6,24	332
I93		5,35	6,02	0,67	9,77	4,42	332
I941		5,89	5,23	0,66	8,98	3,09	332
I96a		3,35	6,94	3,59	9,77	6,42	332
I96b		4,6	7,23	2,63	9,88	5,28	332
I96c		6,35	6,98	0,63	9,78	3,43	333
I96d		5,75	6,98	1,23	9,66	3,91	333

^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ26. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз биохемијске маркере серума.

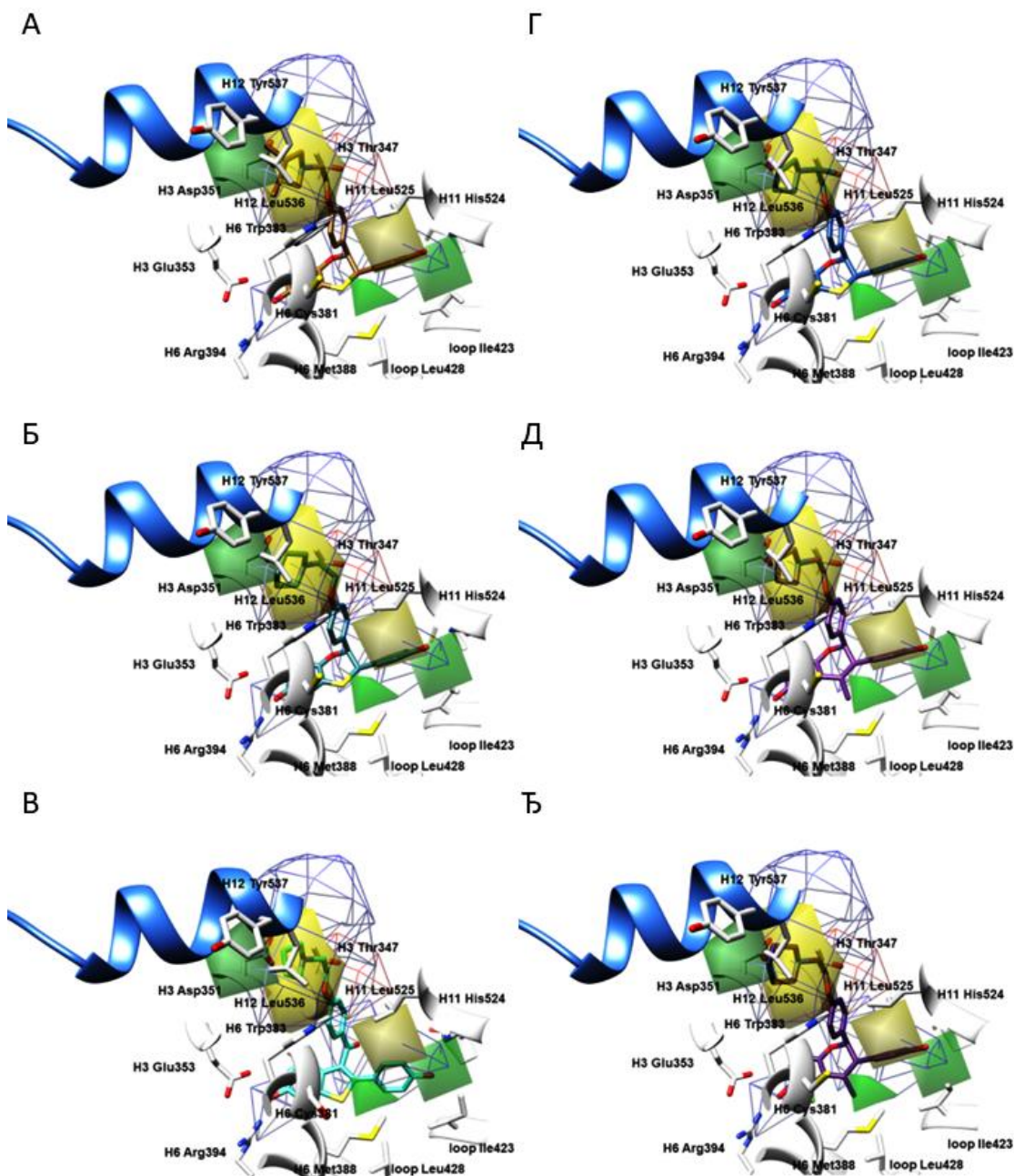
Јед.	Доза (mg/kg)	AST ^a (U/L)	ALT ^b (A/L)	ALP ^b (A/L)	γ-GT ^Г (U/L)	ТВС ^д (μmol/L)
СВЕ-1	5	47,91±0,43 ^{h,†,‡,l}	43,54±0,69 ^{*,†}	91,26±0,36 ^{*,†}	13,45±0,36 [†]	12,46±0,24 ^{†,‡}
	50	51,32±0,32 ^{†,§,⊥}	44,63±0,84 ^{*,†,§}	94,31±0,55 ^{*,†,§}	15,35±0,32 [†]	16,34±0,24 ^{†,§,⊥}
СВЕ-2	5	42,73±0,94 [†]	46,51±0,62 [†]	99,34±0,42 ^{*,†}	16,34±0,45	12,46±0,46 ^{†,‡}
	50	44,56±0,52 ^{†,§,⊥}	46,63±0,54 ^{*,†,§}	105,36±0,35 ^{*,†,§,⊥}	18,34±0,42 [*]	15,42±0,45 ^{†,§,⊥}
СВЕ-3	5	45,32±0,31 [†]	47,63±0,85 ^{†,‡,l}	72,32±0,46 ^{†,‡,l}	11,34±0,43 [†]	13,56±0,31 ^{†,‡}
	50	47,43±0,56 [†]	49,36±0,78 ^{†,§}	89,53±0,35 ^{*,†,§,⊥}	12,45±0,46 ^{†,§}	18,35±0,32 ^{†,§}
СВЕ-4	5	49,36±0,24 [†]	53,39±0,51 ^{*,†}	99,35±0,21 ^{*,†,l}	12,43±0,32 [†]	12,45±0,53 ^{†,‡}
	50	51,63±0,84 ^{*,†}	57,84±0,51 ^{*,†}	107,53±0,52 ^{*,†,⊥}	13,56±0,42 [†]	18,42±0,33 ^{†,§}
СВЕ-5	5	49,56±0,51 [†]	56,28±0,74 ^{*,†}	117,36±0,37 ^{*,†,‡,l}	11,34±0,42 [†]	15,52±0,41 ^{†,‡}
	50	52,63±0,59 ^{†,§}	59,63±0,18 ^{*,†,§}	121,32±0,44 ^{*,†,⊥}	14,32±0,45	18,53±0,34 ^{*,†}
СВЕ-6	5	48,56±0,51 ^{†,‡,l}	52,63±0,78 ^{*,†}	112,37±0,32 ^{*,†,l}	12,52±0,36 [†]	16,43±0,32 [†]
	50	53,69±0,59 [†]	59,53±0,74 ^{*,†}	125,45±0,31 ^{*,†,§,⊥}	14,32±0,36 [†]	19,53±0,22 [†]
4-ОТН.^е	5	56,54±0,63	56,59±0,74 ^{*,†}	106,43±0,46 ^{*,†,l}	13,31±0,43	23,42±0,22 ^{*,†,l}
	50	55,63±0,48 ^{*,†}	59,57±0,43 ^{*,†}	124,31±0,22 ^{*,†,⊥,⊥}	17,42±0,31	22,43±0,35 [*]
Ral.^ж	5	53,63±0,84 [†]	53,54±0,41 ^{*,†}	99,35±0,32 ^{*,†}	10,34±0,67 [†]	15,64±0,65 [†]
	50	59,52±0,59 ^{*,†}	55,74±0,47 ^{*,†}	106,43±0,36 ^{*,†,§,l}	14,23±0,63 [†]	25,63±0,47 ^{*,†}
MNU^з	50	137,56±0,48 ^{*,§,l,⊥}	161,41±0,74 ^{*,‡,§,l}	216,42±0,42 ^{*,‡,§,l,⊥}	19,32±0,55 ^{*,l,⊥}	33,53±0,55 ^{*,‡,l,⊥}
Контрола^д		46,52±0,97 ^{†,‡,§,l,⊥}	41,11±0,74 ^{†,‡,§,l,⊥}	79,36±0,33 ^{†,‡,§,l,⊥}	12,53±0,47 ^{†,§}	15,63±0,43 ^{†,‡,§,⊥}

^aКаталитичка активност аспартат трансминазе; ^bКаталитичка активност аланин трансминазе; ^вКаталитичка активност алкалне фосфатазе; ^ГКаталитичка активност γ-глутамилтрансферазе; ^дУкупни садржај билирубина; ^hРезултати су представљени као средња вредност±стандардна девијација најмање три мерења; ^е**4-хидрокситамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОТН**); ^ж**Ралоксифен** (енг. **Raloxifene, Ral**); ^зметил нитрозоуреа; ^д0,9% NaCl. *p < 0,05 када се пореди са групом негативне контроле; †p < 0,05 када се пореди са MNU у концентрацији од 50 mg/kg; ‡p < 0,05 када се пореди са 4-ОТН у концентрацији од 5 mg/kg; §p < 0,05 када се пореди са 4-ОТН у концентрацији од 50 mg/kg; ⊥p < 0,05 када се пореди са Ral у концентрацији од 5 mg/kg; ⊥p < 0,05 када се пореди са Ral у концентрацији од 50 mg/kg.

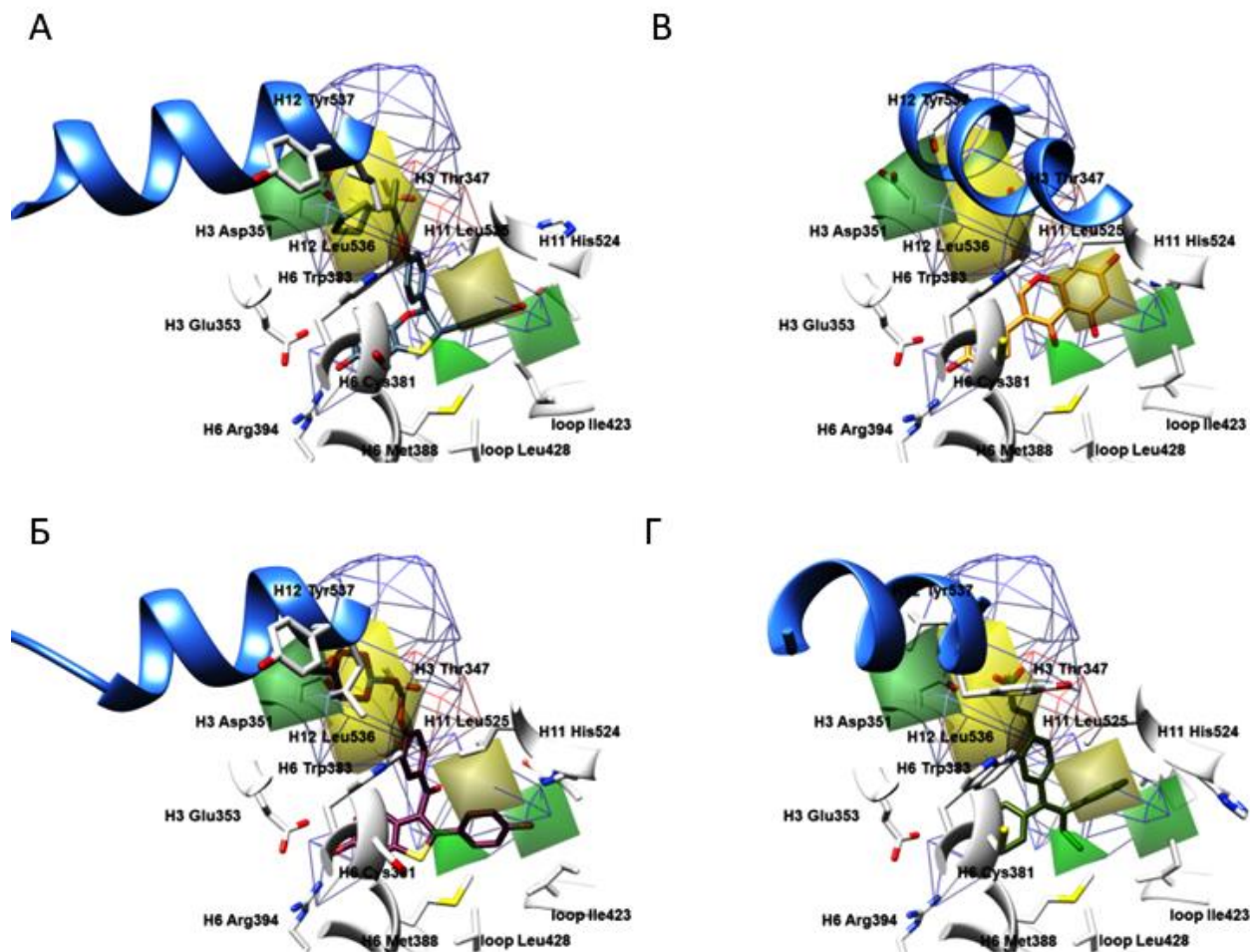
Табела ДМ27. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз маркере оксидативног оштећења јетре.

Јед.	Доза (mg/kg)	TP ^a (g/L)	GSH ^b (mg/g)	CAT ^b (μmol/mg)	SOD ^г (U/mg)	TBARS ^д (nmol/mg)
СВЕ-1	5	30,56±0,21 ^{b,†,‡,⊥}	8,66±0,32 [†]	14,11±0,35 [†]	6,21±0,42	0,63±0,23 ^{†,‡,⊥}
	50	36,31±0,22 ^{†,§,⊥}	8,67±0,32 [†]	15,67±0,12 [†]	8,22±0,56 [†]	0,33±0,34 ^{†,§,⊥}
СВЕ-2	5	35,22±0,15 ^{†,‡,⊥}	8,51±0,34 [†]	12,35±0,46 [†]	5,56±0,42	0,45±0,12 ^{†,‡,⊥}
	50	36,36±0,46 ^{†,§,⊥}	9,12±0,23 ^{†,§}	16,21±0,33 [†]	12,43±0,45 [†]	0,73±0,21 ^{†,§,⊥}
СВЕ-3	5	39,24±0,33 ^{*,†}	7,79±0,23 [†]	14,46±0,63 [†]	5,56±0,55	0,45±0,24 ^{†,‡,⊥}
	50	41,46±0,33 [*]	8,34±0,32 [†]	17,34±0,22 [†]	9,46±0,41 [†]	0,67±0,32 ^{†,§,⊥}
СВЕ-4	5	31,27±0,36 ^{†,‡,⊥}	8,22±0,25	12,33±0,22 [†]	9,12±0,43	0,44±0,22 ^{†,‡,⊥}
	50	33,65±0,88 ^{†,§,⊥}	8,33±0,33 [†]	13,22±0,45 ^{†,§}	16,11±0,34 ^{*,†,§,⊥}	0,78±0,23 ^{†,§,⊥}
СВЕ-5	5	33,46±0,44 ^{†,‡,⊥}	7,35±0,27	13,63±0,23 [†]	12,54±0,53 [†]	0,34±0,12 ^{†,‡,⊥}
	50	31,66±0,64 ^{†,§,⊥}	8,31±0,67 [†]	16,33±0,36 [†]	13,32±0,44 ^{*,†,§,⊥}	0,63±0,43 ^{†,§,⊥}
СВЕ-6	5	31,35±0,36 ^{†,‡,⊥}	7,79±0,23	13,42±0,22 [†]	13,67±0,75 [†]	0,33±0,33 ^{†,‡,⊥}
	50	34,5±0,40 ^{†,§,⊥}	8,24±0,34 [†]	17,23±0,32 [†]	13,67±0,54 ^{†,§}	0,46±0,33 ^{†,§,⊥}
4-ОТН.^е	5	36,44±0,44 ^{*,†}	4,21±0,22 [*]	12,21±0,33 [†]	7,53±0,32	1,33±0,23 ^{*,†}
	50	42,67±0,34 [*]	5,35±0,33 [*]	16,46±0,35 ^{*,†,⊥}	7,43±0,43	2,56±0,31 ^{*,⊥}
Ral.^ж	5	45,35±0,35 ^{*,†}	6,33±0,24	9,23±0,35 [†]	5,45±0,31	1,32±0,34 [†]
	50	41,33±0,36 [*]	5,33±0,36	13,31±0,25 [†]	8,36±0,42 [†]	1,54±0,53 ^{†,§}
MNU^з	50	55,43±0,11 ^{*,⊥}	2,22±0,35 [*]	2,42±0,32 ^{*,†,§,⊥}	1,45±0,44 [⊥]	2,64±0,43 ^{*,†,⊥}
Контрола^и		32,33±0,22 ^{†,‡,§,⊥}	7,55±0,41 [†]	13,22±0,43 [†]	7,45±0,54	0,54±0,33 ^{†,‡,§,⊥}

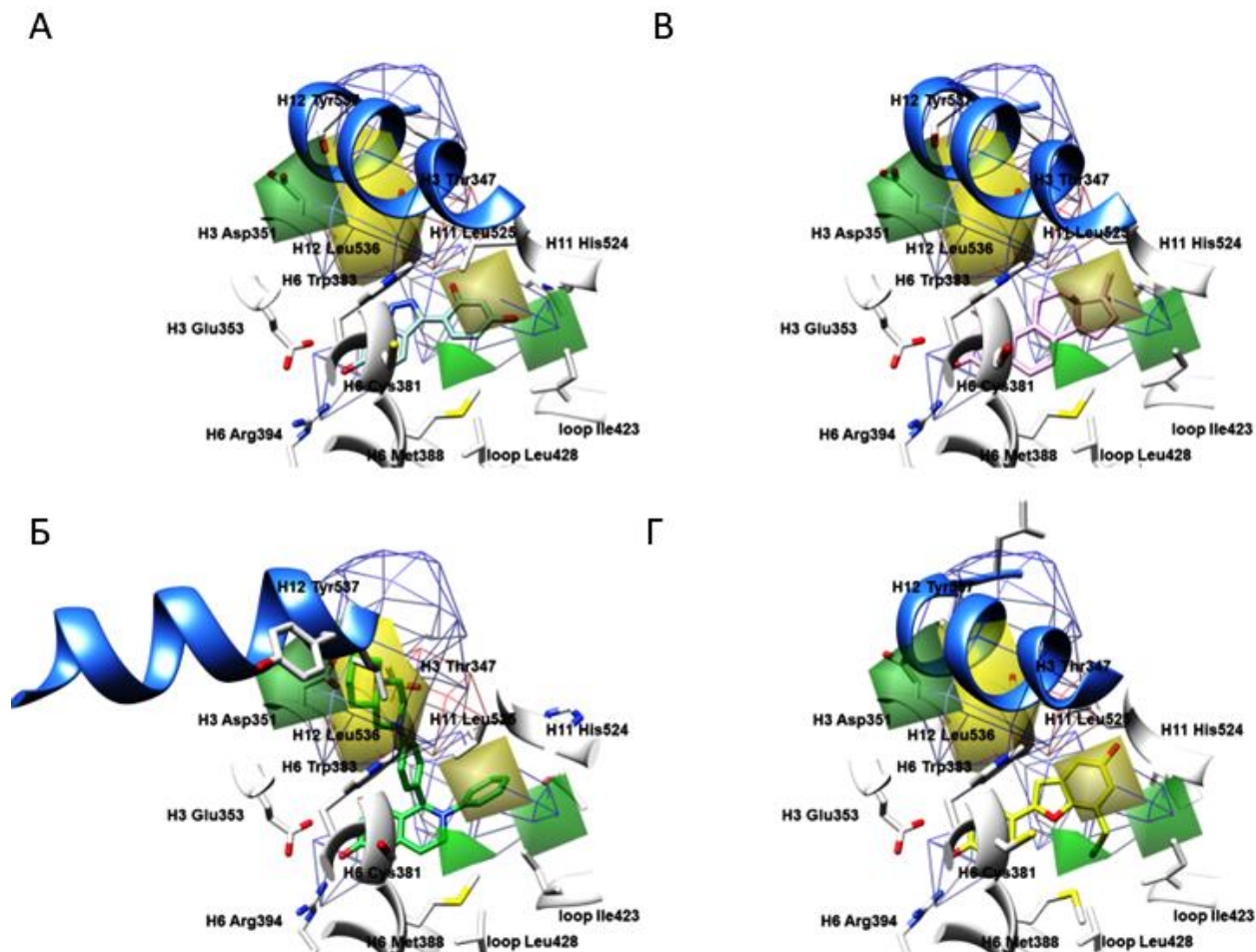
^aУкупни садржај протеина; ^bКонцентрација редукованог глутатиона; ^вКаталитичка активност каталазе; ^гКаталитичка активност супероксид дисмутазе; Садржај реактивних супстанци тиобарбитурне киселине; ^дРезултати су представљени као средња вредност±стандардна девијација најмање три мерења; ^е**4-хидрокси тамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОТН**); ^ж**Ралоксифен** (енг. **Raloxifene, Ral**); ^зметил нитрозоуреа; ^и(енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОТН**). * p < 0,05 када се пореди са групом негативне контроле; † p < 0,05 када се пореди са MNU у концентрацији од 50 mg/kg; ‡ p < 0,05 када се пореди са **4-ОТН** у концентрацији од 5 mg/kg; § p < 0,05 када се пореди са **4-ОТН** у концентрацији од 50 mg/kg; ⊥ p < 0,05 када се пореди са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg; ⊥ p < 0,05 када се пореди са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg.



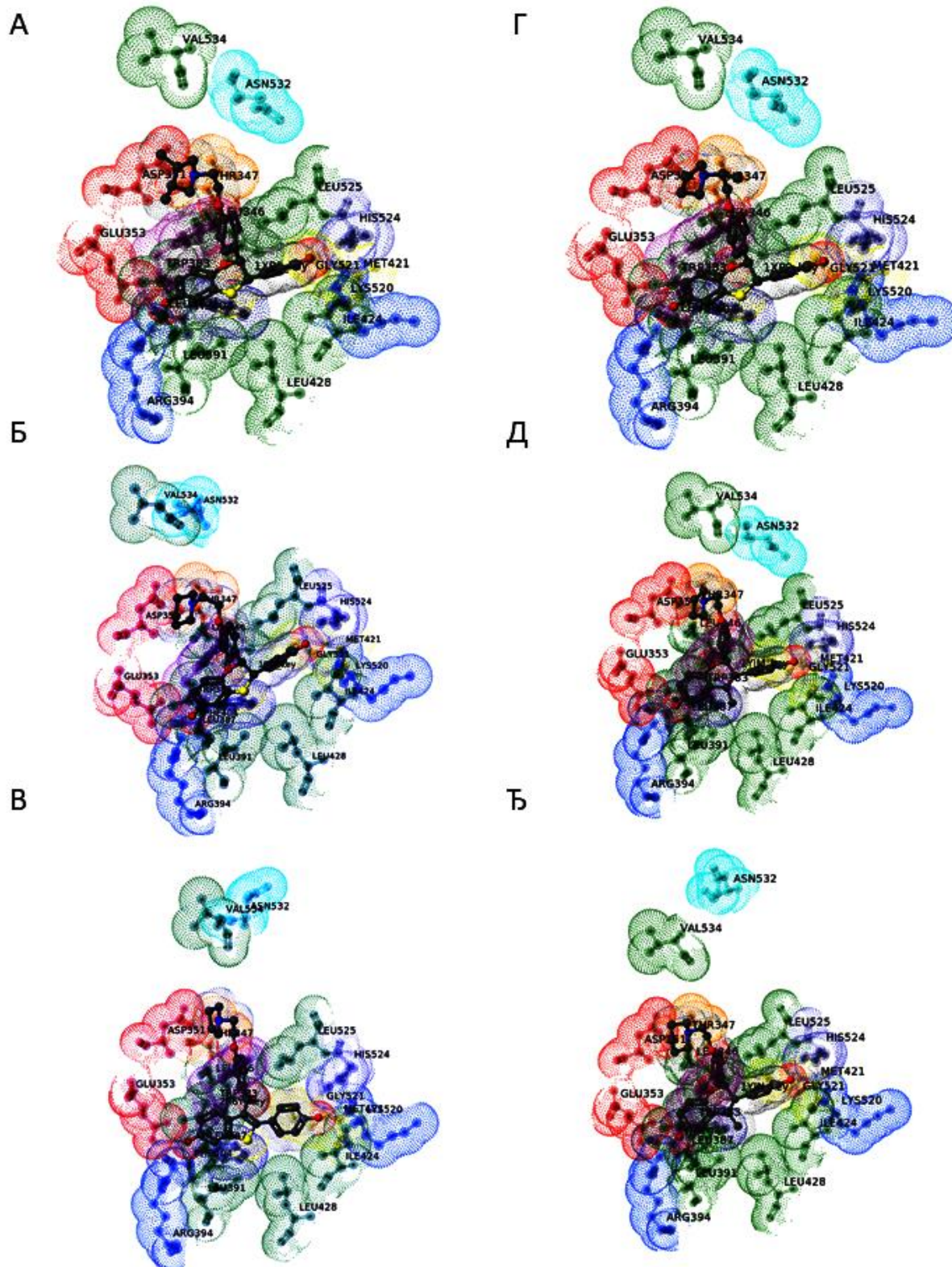
Слика ДМ1. Мапе стерних (позитивни зелени STE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF, негативни жути *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF) и електростатичких (позитивни црвени ELE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF, негативни плави ELE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF) поља стварних доприноса (*AAC*) активности лиганда (L_{ACC}) добијени из модела Н пробе за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Зелени и жути полихедрони указују на регионе где повећана и смањена волуминозност могу повећати активност. Црвени и плави полихедрони указују на регионе где наелектрисане функционалне групе могу повећати или смањити активност, респективно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ2. Мапе стерних (позитивни зелени STE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF, негативни жути *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF) и електростатичких (позитивни црвени ELE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF, негативни плави ELE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF) поља стварних доприноса (*AAC*) активности лиганда (L_{ACC}) добијени из модела Н пробе за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Зелени и жути полихедрони указују на регионе где повећана и смањена волуминозност могу повећати активност. Црвени и плави полихедрони указују на регионе где наелектрисане функционалне групе могу повећати или смањити активност, респективно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

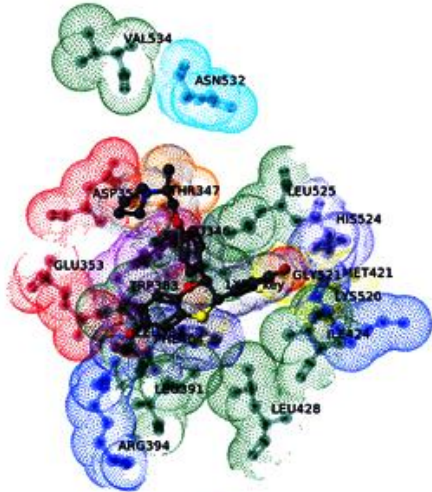


Слика ДМ3. Мапе стерних (позитивни зелени STE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF, негативни жути *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF) и електростатичких (позитивни црвени ELE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF, негативни плави ELE *PLS*-коэффициенти \times средња вредност MIF) поља стварних доприноса (*AAC*) активности лиганда (L_{AAC}) добијени из модела Н пробе за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Зелени и жути полихедрони указују на регионе где повећана и смањена волуминозност могу повећати активност. Црвени и плави полихедрони указују на регионе где наелектрисане функционалне групе могу повећати или смањити Црвени и плави полихедрони указују на регионе где наелектраактивност, респективно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник за парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

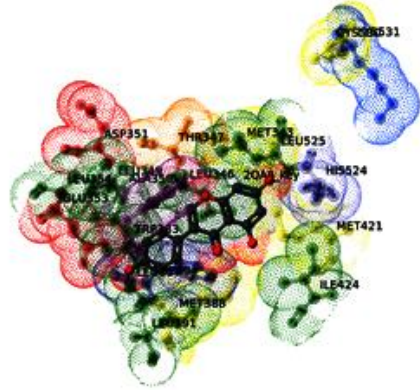


Слика ДМ4. Репрезентација позитивних и негативних доприноса аминокиселина (MRAACs) унутар Ру-ComBinЕ модела проистеклог из комбинације STE.НВ поља за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). STE и НВ MRAACs означени су обојеним транспарентним површинама преклопљеним преко структура аминокиселина.

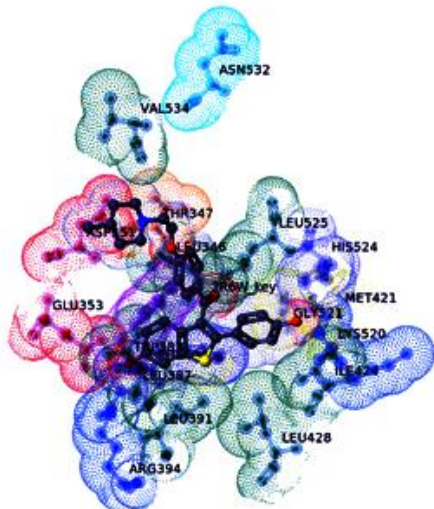
A



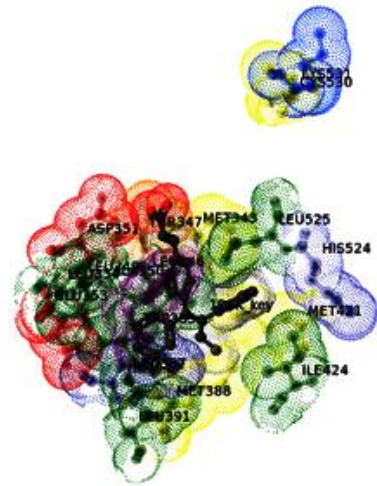
B



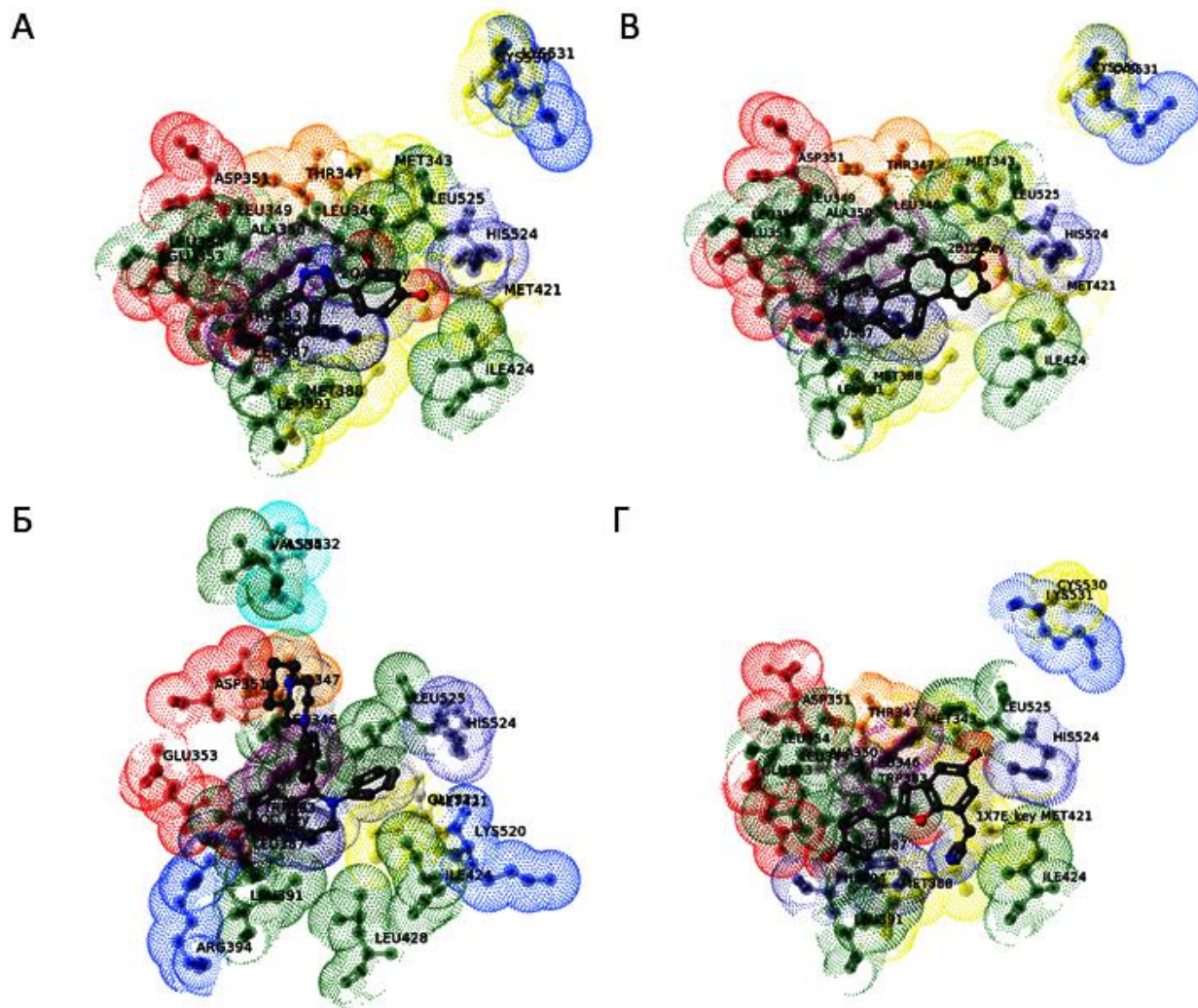
Б



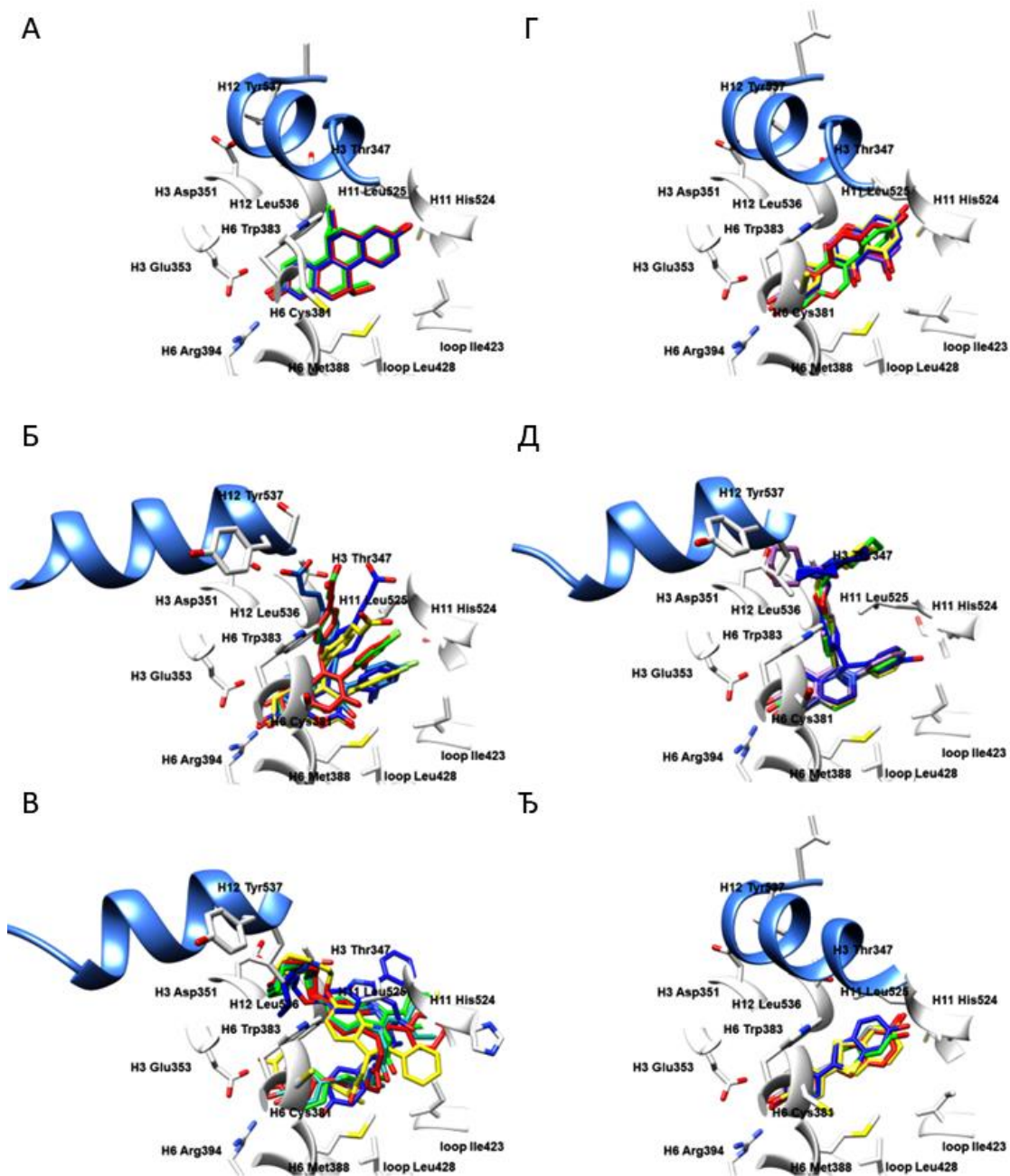
Г



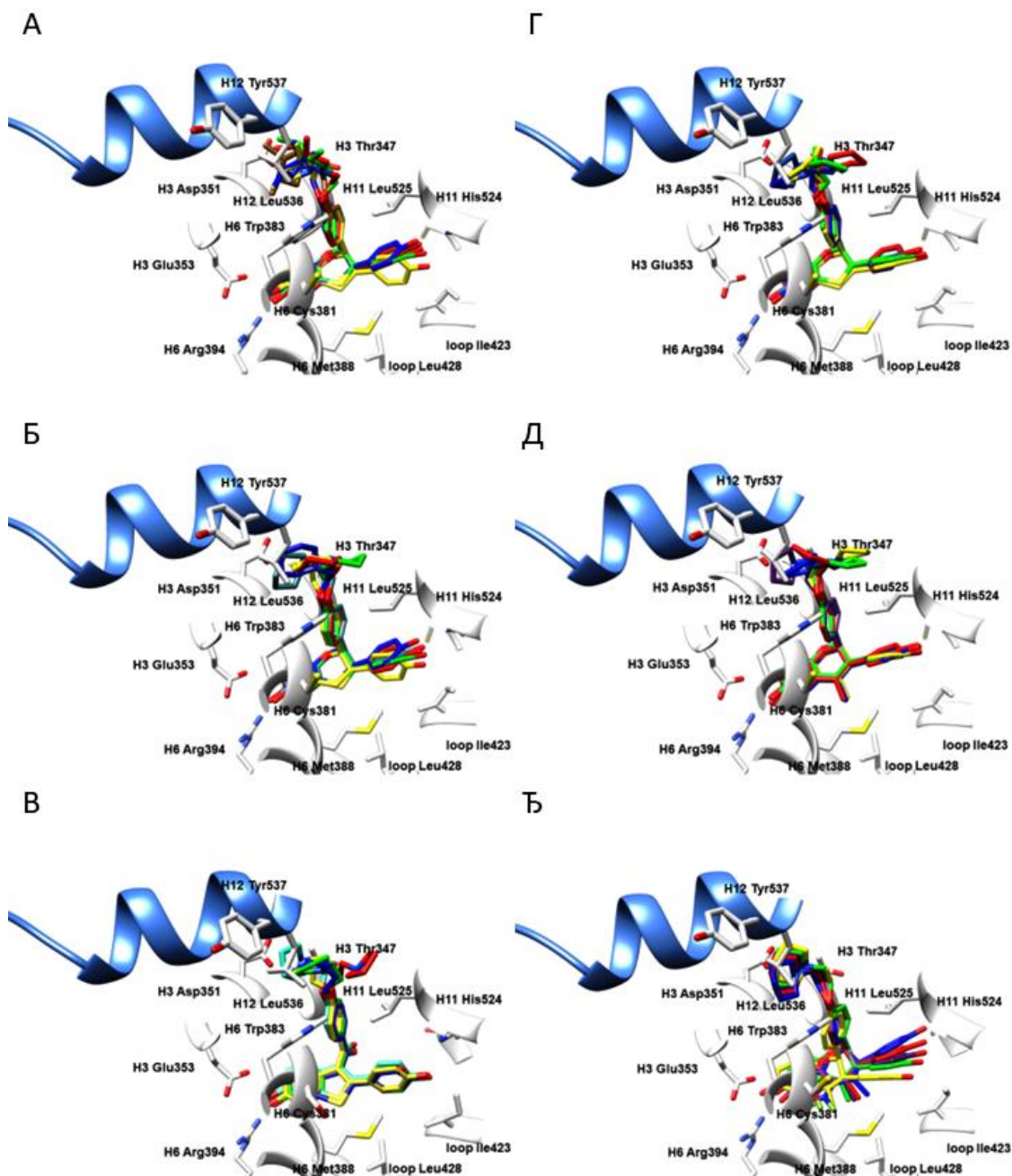
Слика ДМ5. Репрезентација позитивних и негативних доприноса аминокиселина (MRAACs) унутар Py-ComBinE модела проистеклог из комбинације STE.НВ поља за **1XPC** (A); **2R6W** (Б); **2QA8** (B); **1R5K** (Г). STE и НВ MRAACs означени су обојеним транспарентним површинама преклопљеним преко структура аминокиселина.



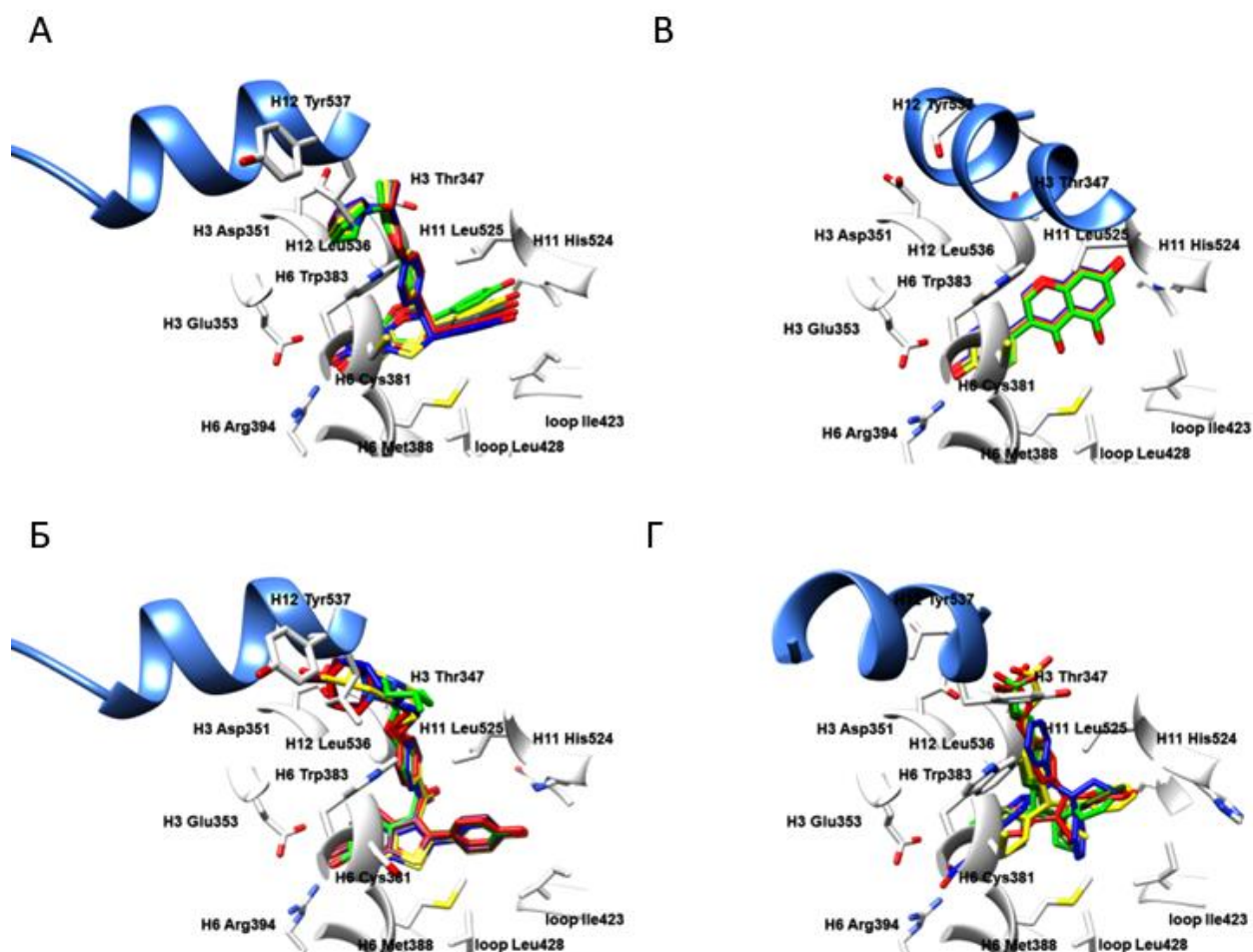
Слика ДМ6. Репрезентација позитивних и негативних доприноса аминокиселина (MRAACs) унутар Ру-ComBinE модела проистеклог из комбинације STE.НВ поља за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). STE и НВ MRAACs означени су обојеним транспарентним површинама преклопљеним преко структура аминокиселина.



Слика ДМ7. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Smina: **1L2I** (A), ЕС тамно плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **5AK2** (Б), ЕС тамно плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **2IOG** (B), ЕС тамно зелена, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1X7R** (Г), ЕС љубичаста, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1UOM** (Д), ЕС љубичаста, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; и **1GWQ** (Ђ) ЕС сива, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

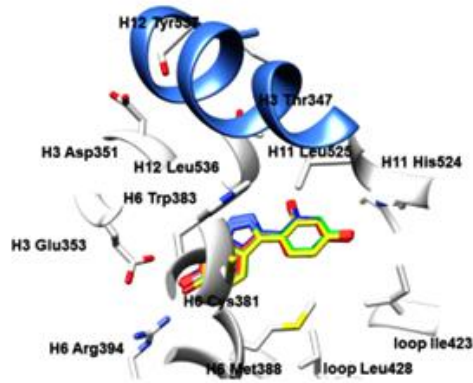


Слика ДМ8. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Smina: **1XP6** (A), ЕС браон, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1SJ0** (Б), ЕС тамно плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **2R6Y** (B), ЕС светло плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1XP9** (Г), ЕС плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1YIM** (Д), ЕС љубичаста, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; и **1YIN** (Ђ) ЕС љубичаста, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

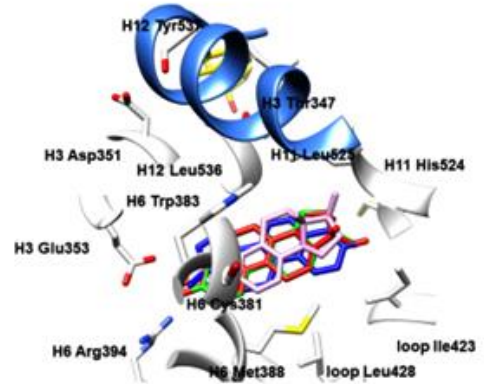


Слика ДМ9. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Smina: **1XPC** (A), ЕС сива, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **2R6W** (Б), ЕС тамно црвена, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **2QA8** (B), ЕС наранџаста, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; и **1R5K** (Г) ЕС тамно зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

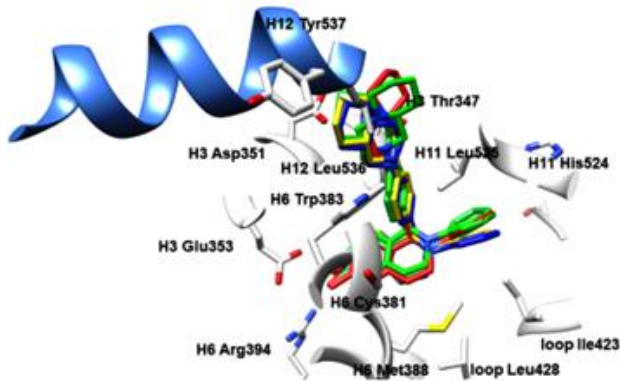
A



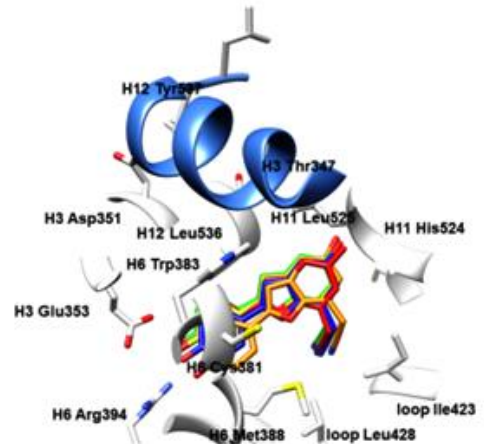
B



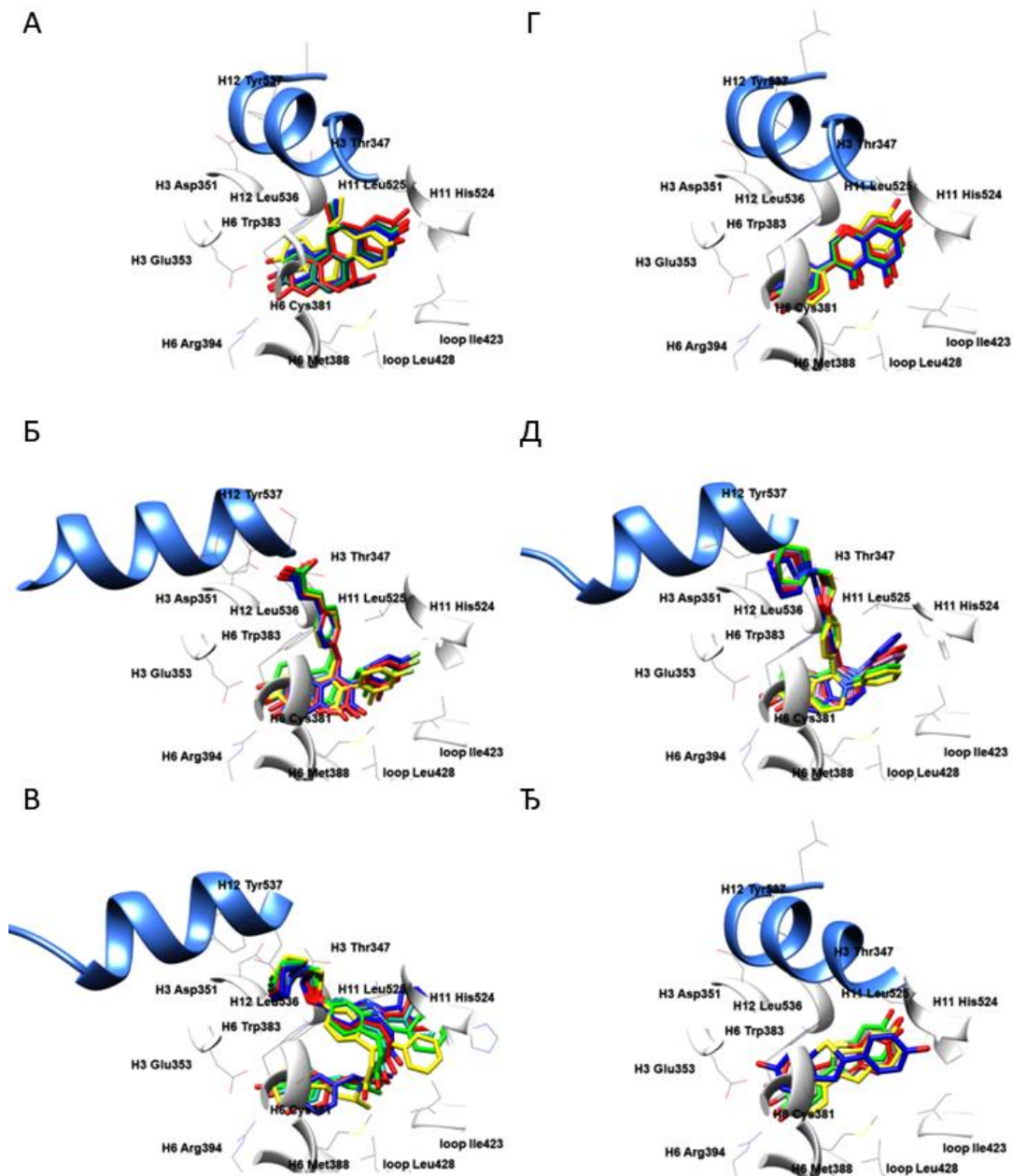
Б



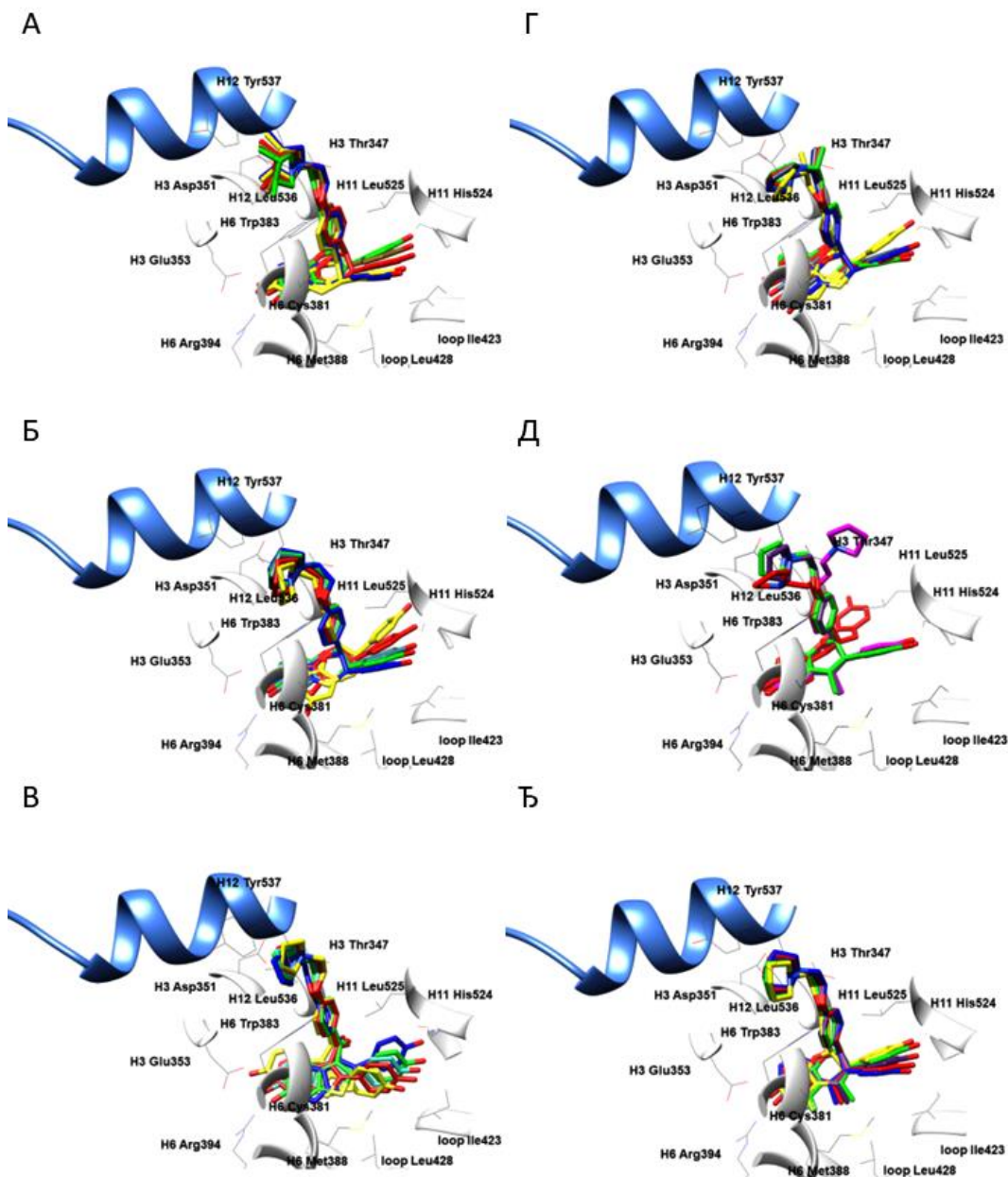
Г



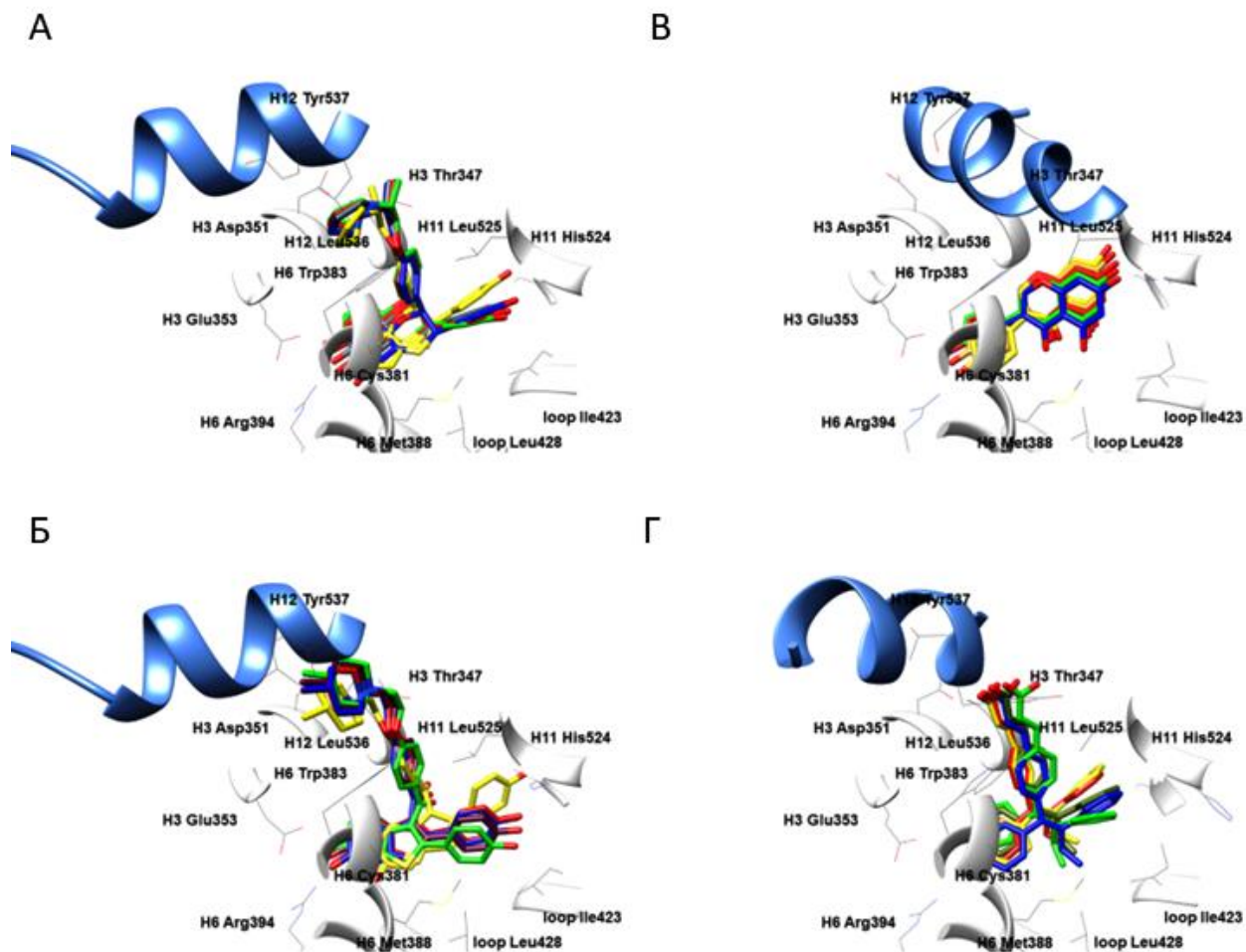
Слика ДМ10. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Smina: **2QA6** (A), EC светло плава, ECRD црвена, RCRD зелена, ECCD плава, RCCD жута; **1XQC** (Б), EC светло зелена, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; **2B1Z** (B), EC светло розе, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена; и **1X7E** (Г) EC жута, ECRD светло плава, RCRD розе, ECCD зелена, RCCD црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ11. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру ER α , помоћу програмског пара Balloon/ShaEP: **1L2I** (A), EC тамно плава, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **5AK2** (Б), EC тамно плава, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **2IOG** (B), EC тамно зелена, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **1X7R** (Г), EC љубичаста, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **1UOM** (Д), EC љубичаста, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; и **1GWQ** (Ђ) EC сива, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

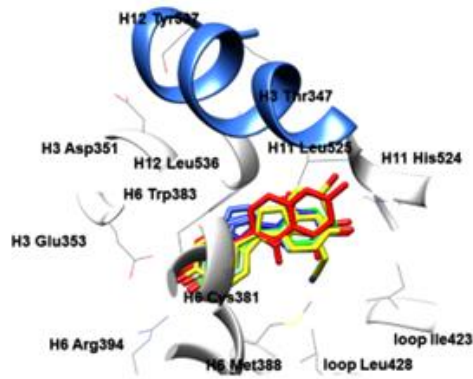


Слика ДМ12. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда $ER\alpha$ помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру $ER\alpha$, помоћу програмског пара Balloon/ShaEP: **1XP6** (А), ЕС браон, ЕСРА светло плава, RCRA розе, ECCD зелена, RCCA црвена; **1SJ0** (Б), ЕС тамно плава, ЕСРА црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **2R6Y** (В), ЕС светло плава, ЕСРА црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **1XP9** (Г), ЕС плава, ЕСРА црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **1YIM** (Д), ЕС љубичаста, ЕСРА црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; и **1YIN** (Ђ) ЕС љубичаста, ЕСРА светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

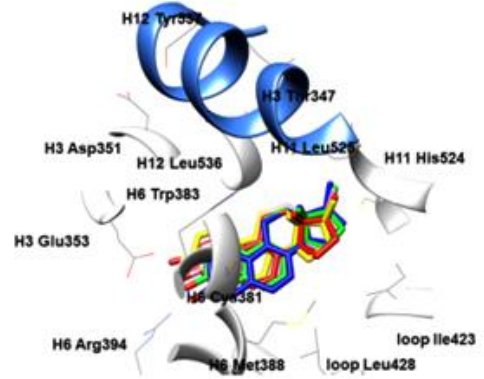


Слика ДМ13. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру ER α , помоћу програмског пара Balloon/ShaEP: **1XPC** (A), EC сива, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **2R6W** (Б), EC тамно црвена, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **2QA8** (B), EC наранџаста, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; и **1R5K** (Г) EC тамно зелена, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

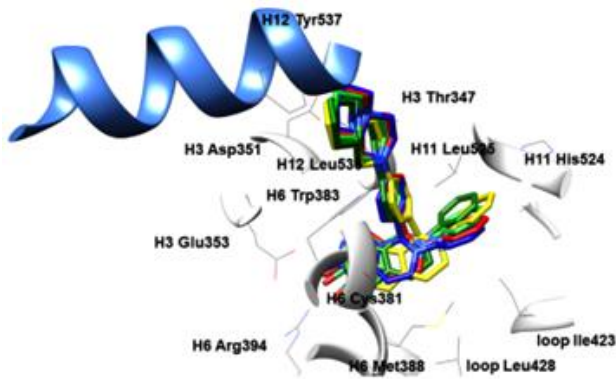
A



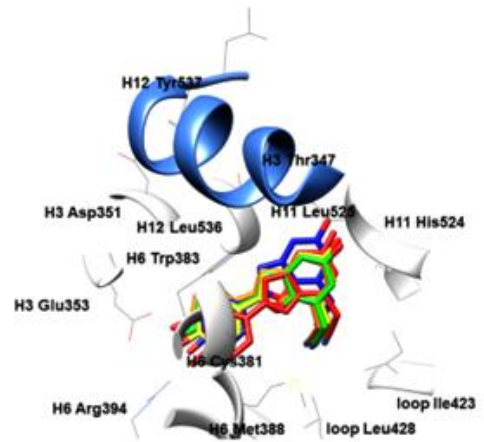
B



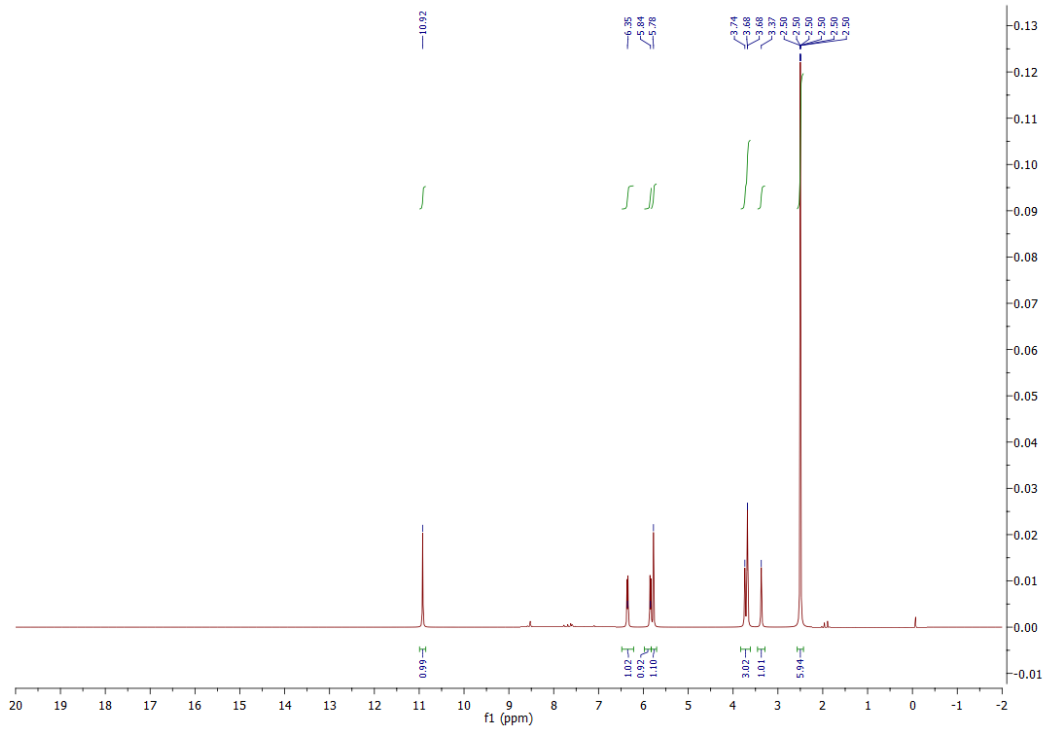
Б



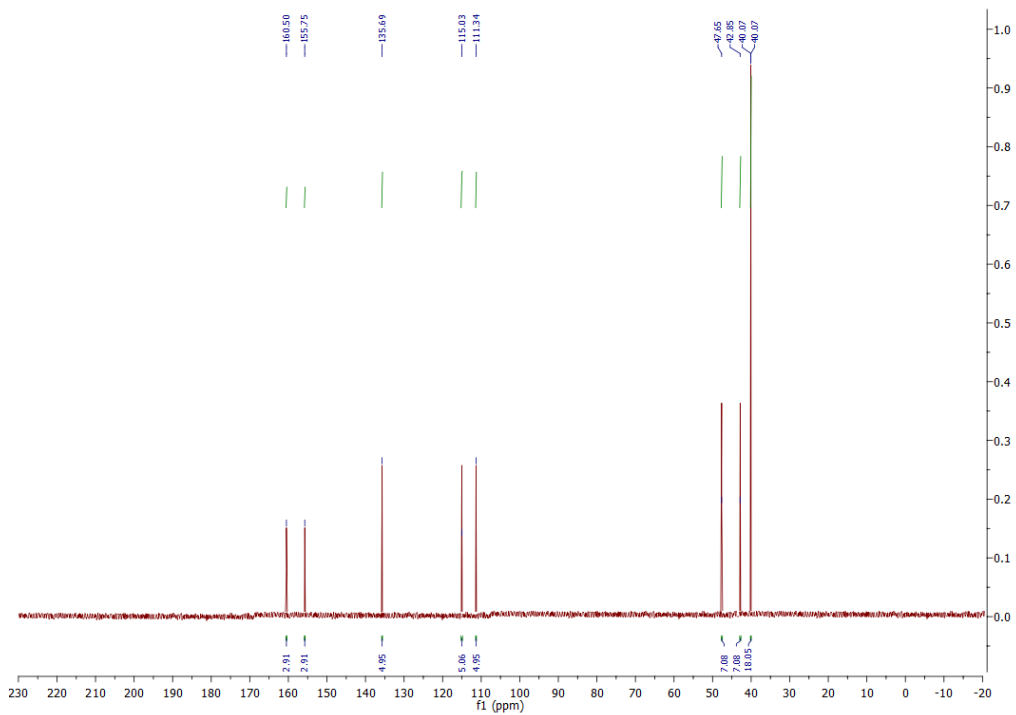
Г



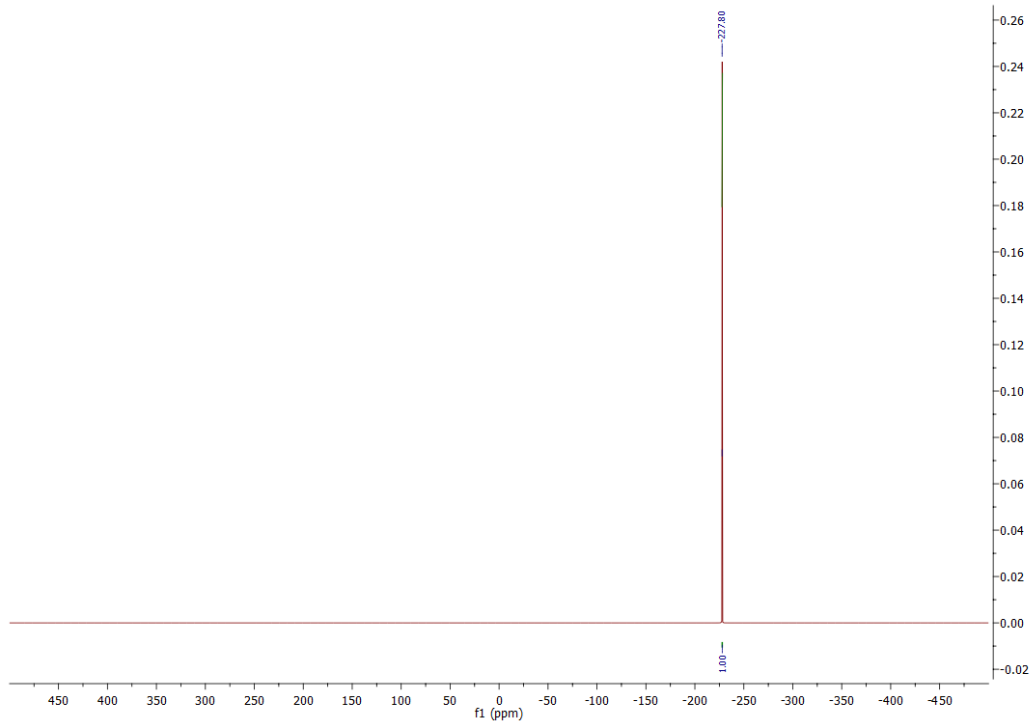
Слика ДМ14. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу, виртуелно поравњаних у активном центру ER α , помоћу програмског пара Balloon/ShaEP: **2QA6** (A), EC светло плава, ECRA б светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена; **1XQC** (Б), EC светло зелена, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; **2B1Z** (B), EC светло розе, ECRA црвена, RCRA зелена, ECCA плава, RCCA жута; и **1X7E** (Г) EC жута, ECRA светло плава, RCRA розе, ECCA зелена, RCCA црвена. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



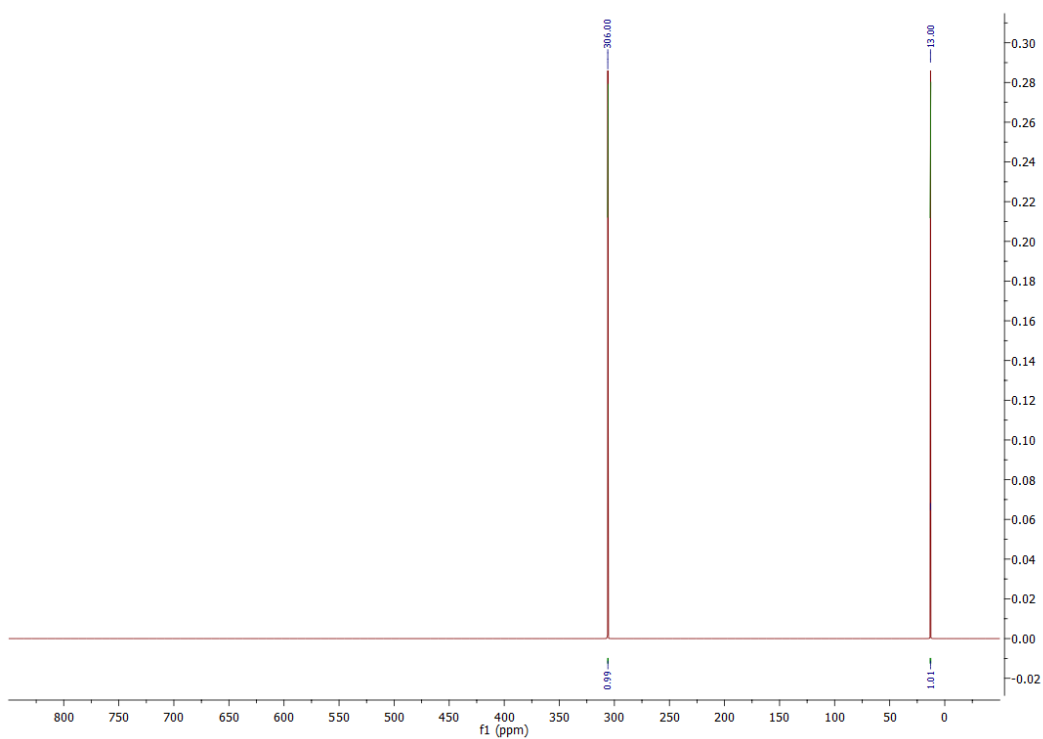
Слика ДМ15. ^1H NMR спектар једињења **СВЕ-RR1**.



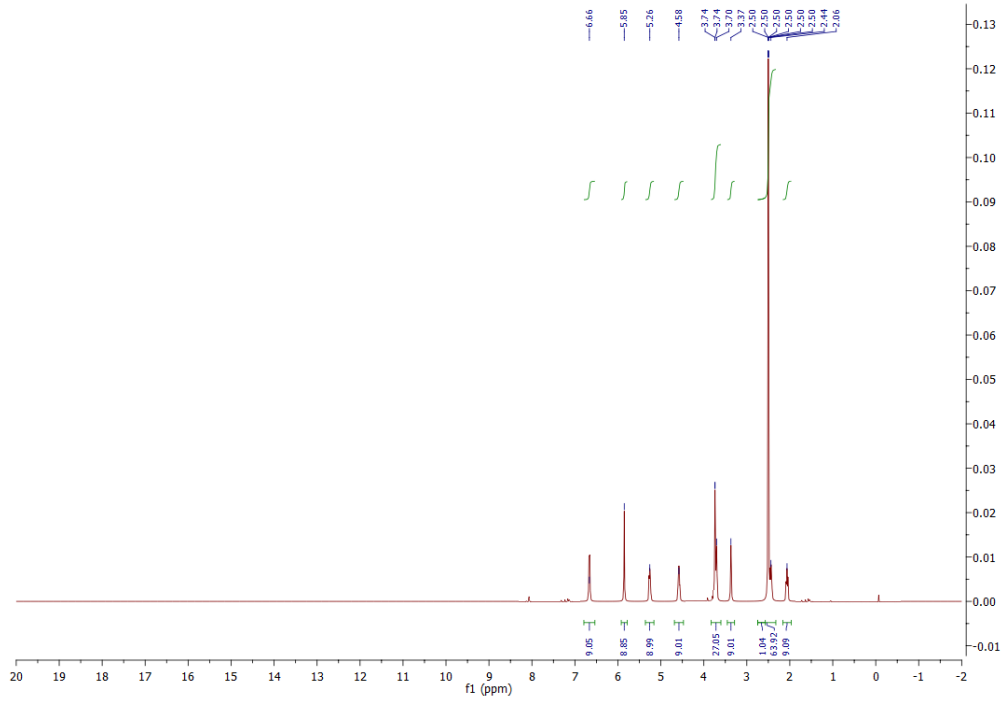
Слика ДМ16. ^{13}C NMR спектар једињења **СВЕ-RR1**.



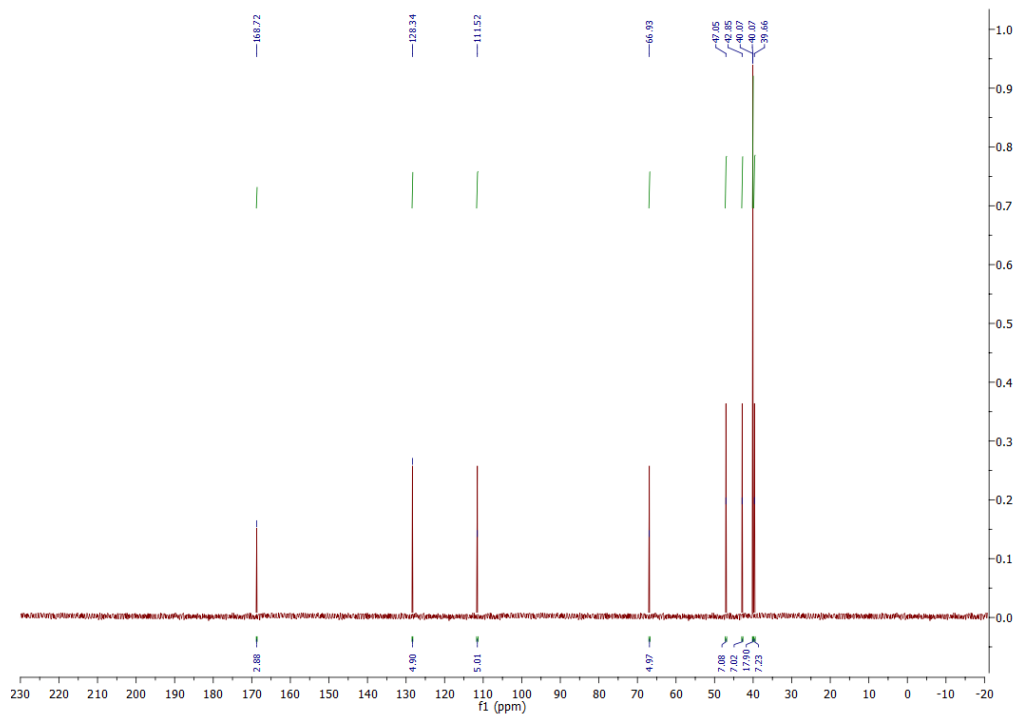
Слика ДМ17. ^{15}N NMR спектар једињења **СВЕ-RR1**.



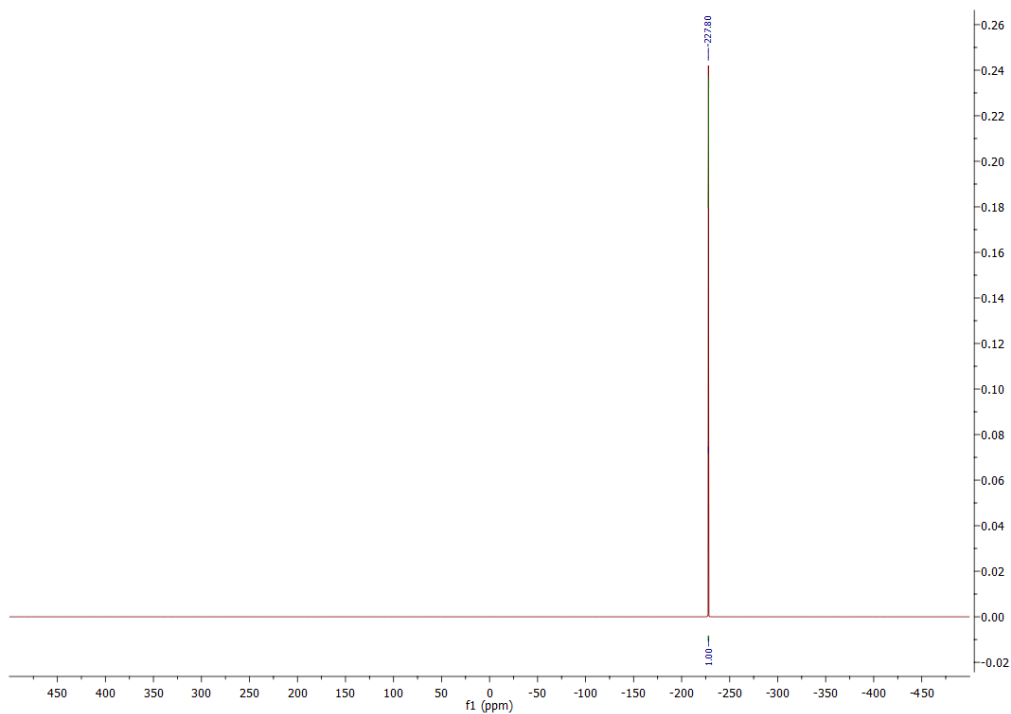
Слика ДМ18. ^{17}O NMR спектар једињења **СВЕ-RR1**.



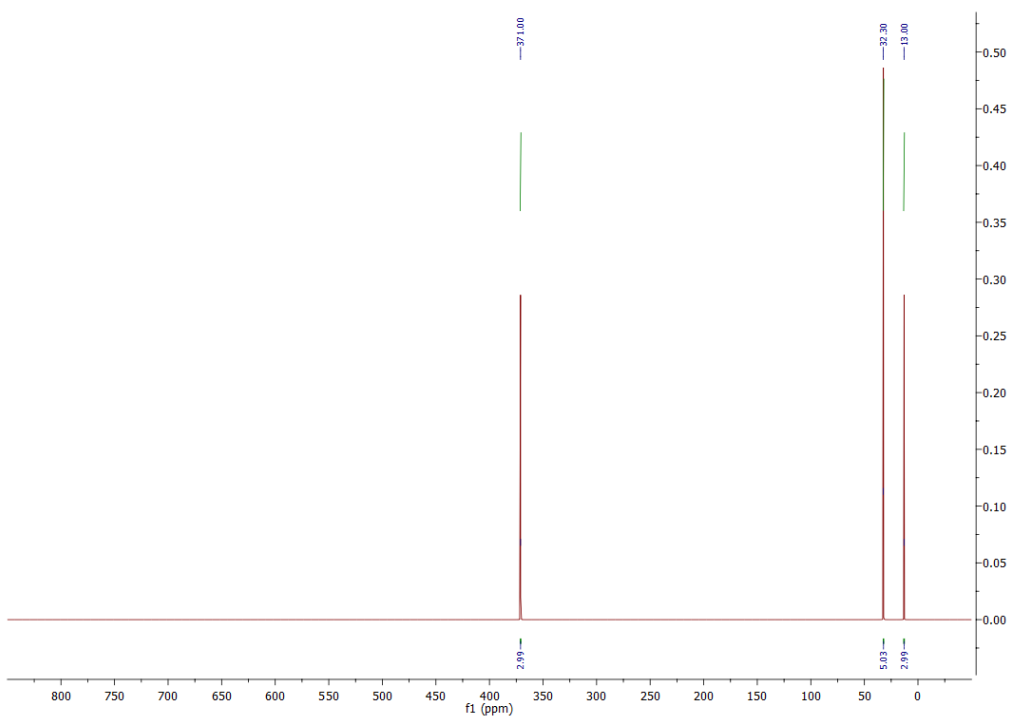
Слика ДМ19. ^1H NMR спектар једињења **СВЕ-RR2**.



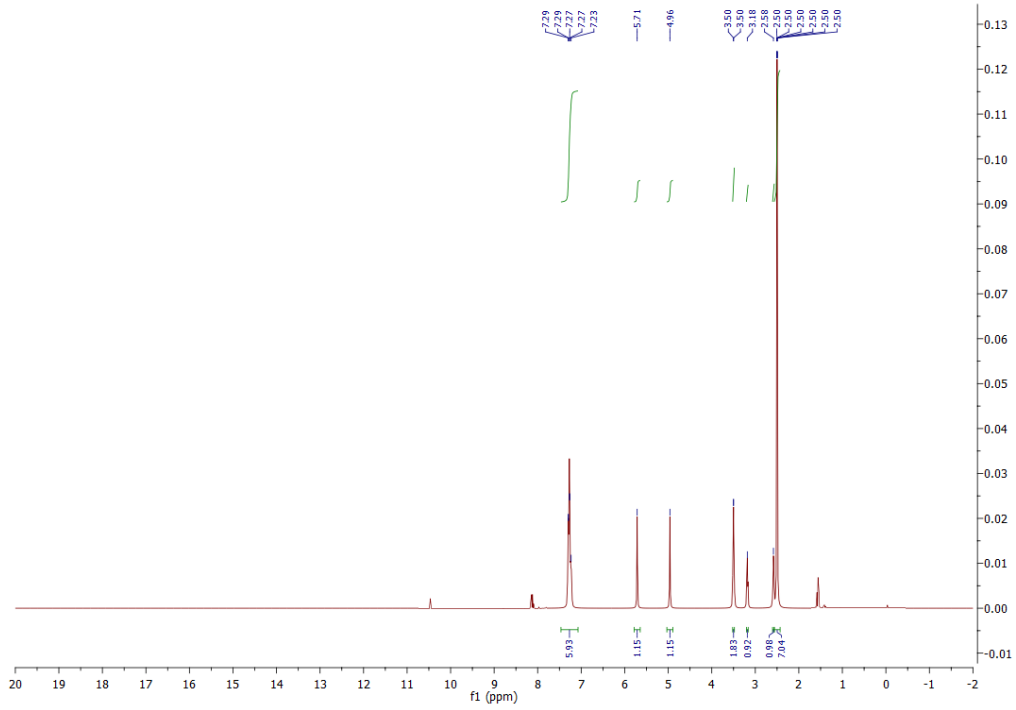
Слика ДМ20. ^{13}C NMR спектар једињења **СВЕ-RR2**.



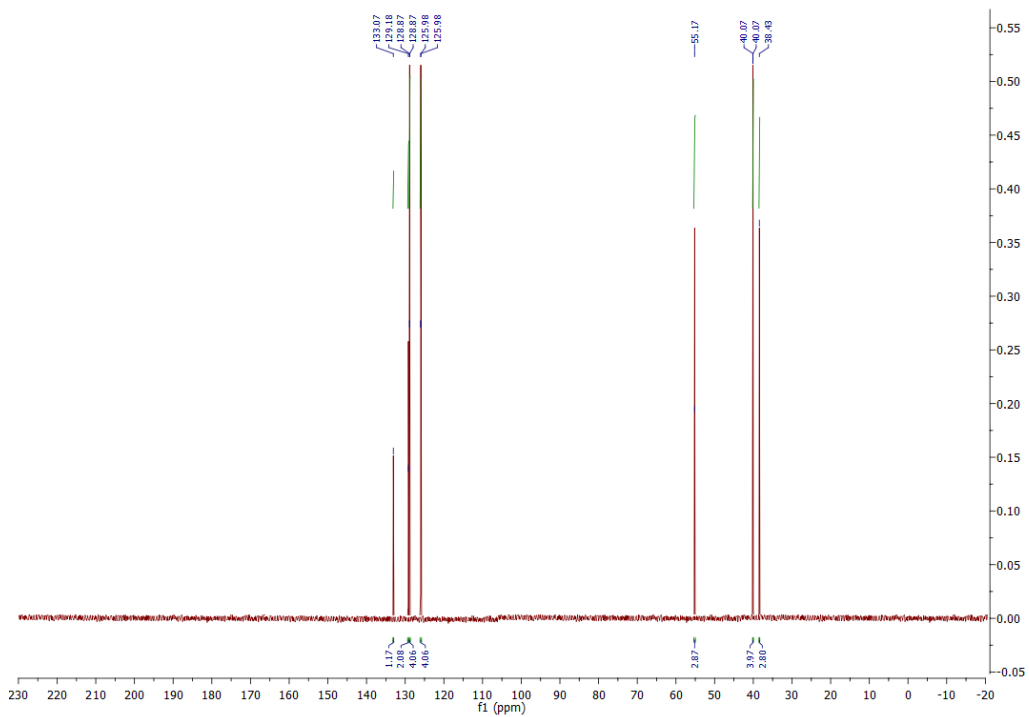
Слика ДМ21. ¹⁵N NMR спектар једињења **СВЕ-RR2**.



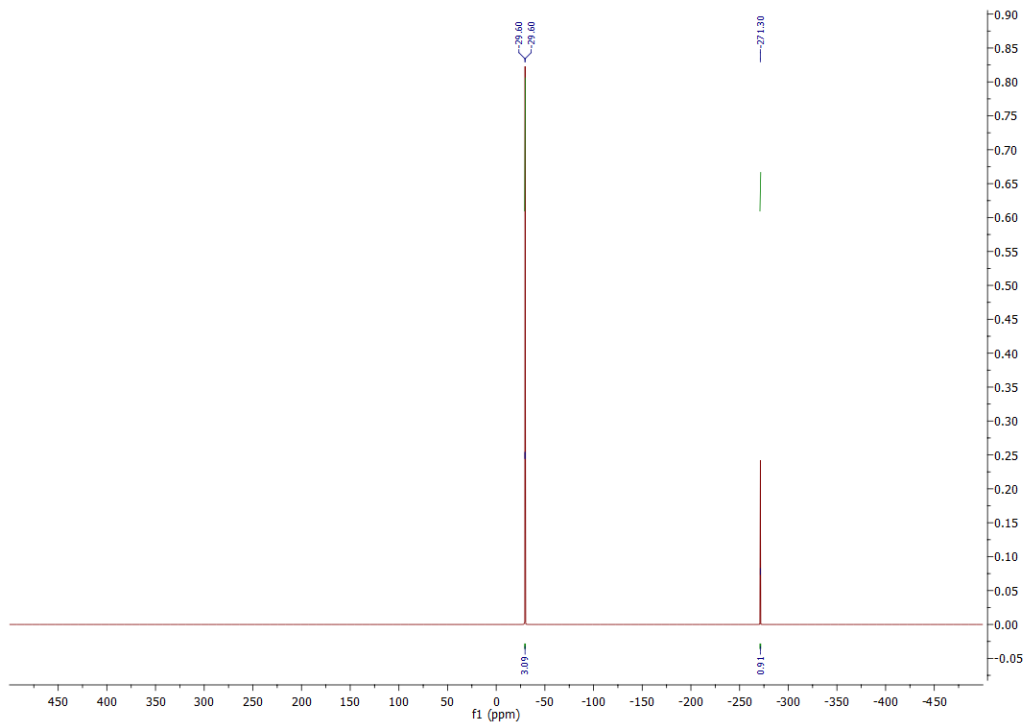
Слика ДМ22. ¹⁷O NMR спектар једињења **СВЕ-RR2**.



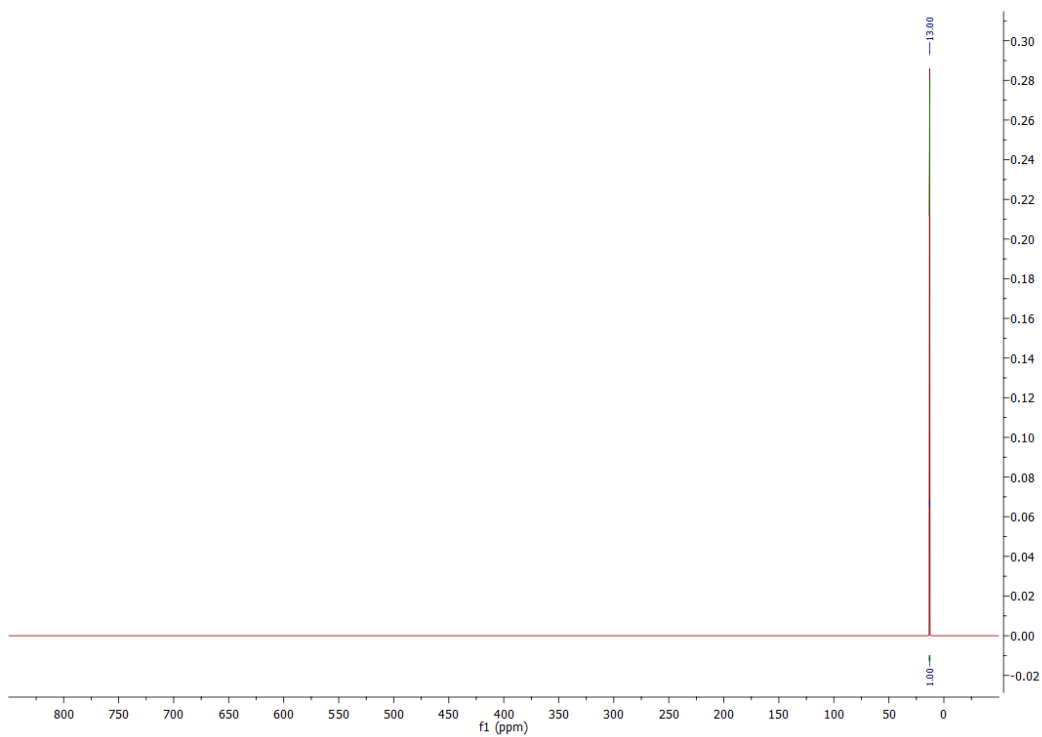
Слика ДМ23. ^1H NMR спектар једињења СВЕ-RR3.



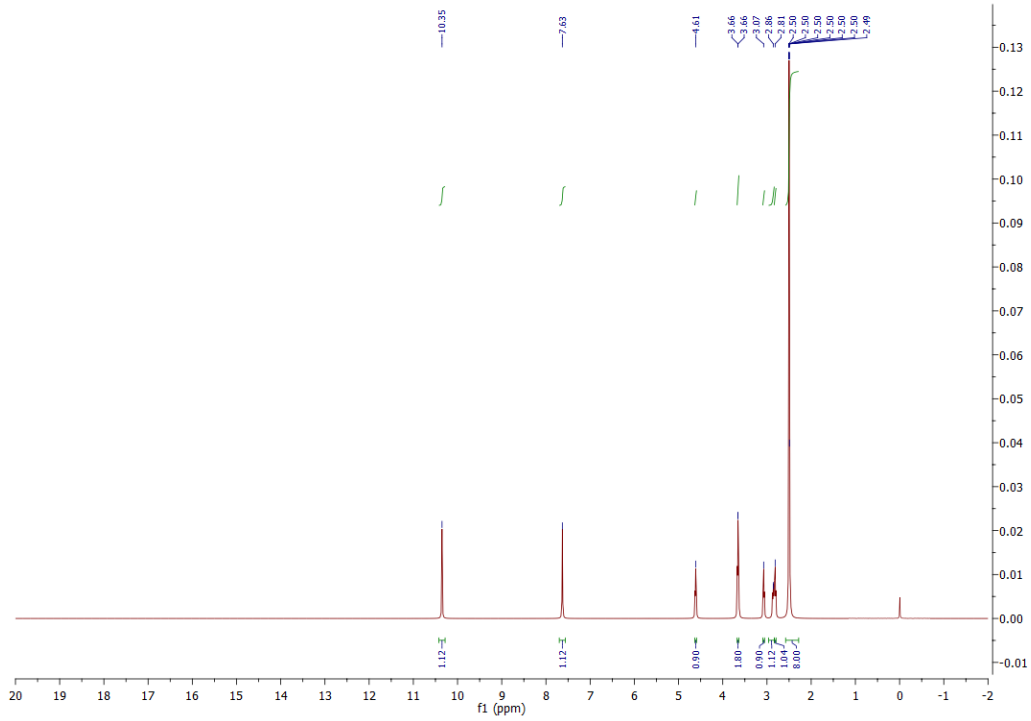
Слика ДМ24. ^{13}C NMR спектар једињења СВЕ-RR3.



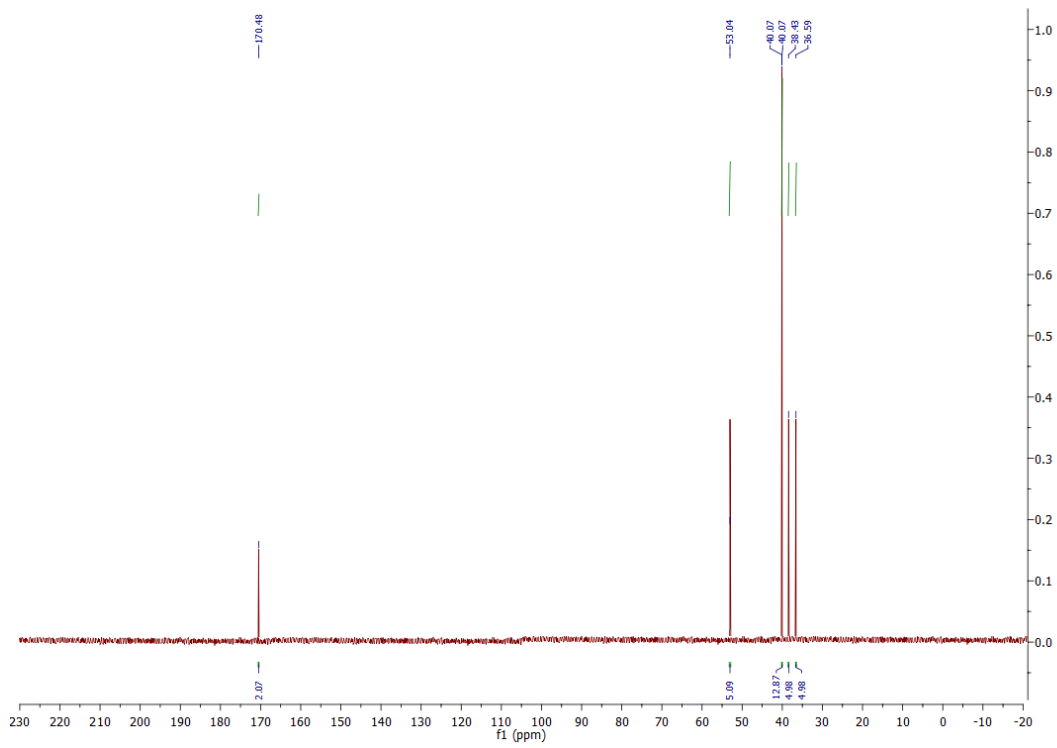
Слика ДМ25. ¹⁵N NMR спектар једињења СВЕ-RR3.



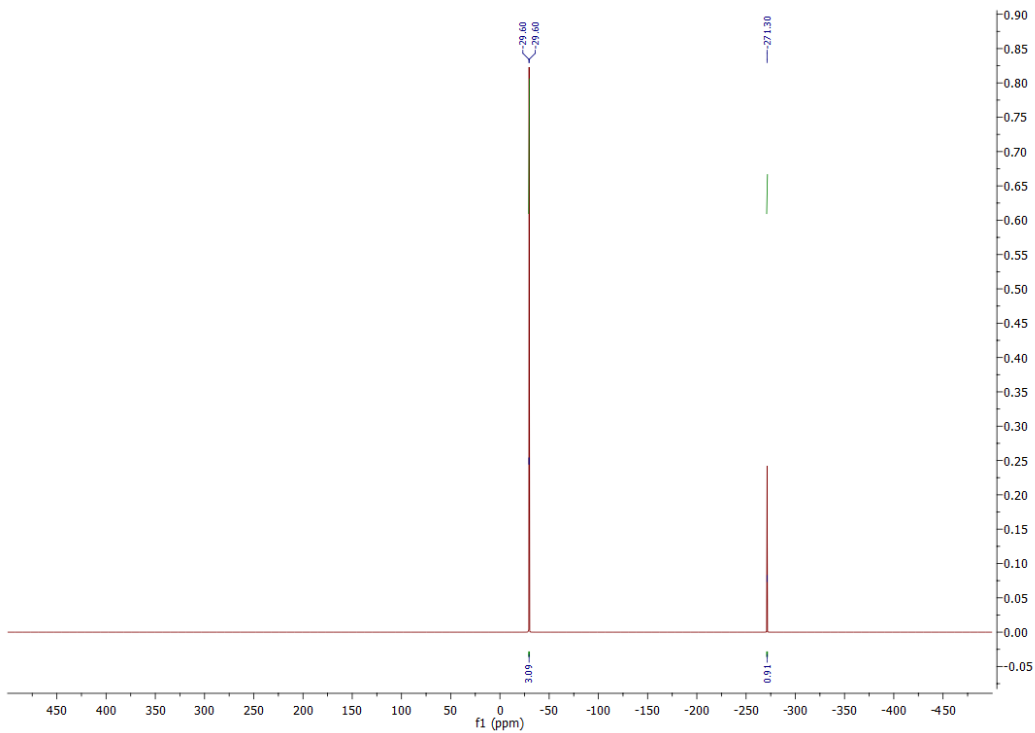
Слика ДМ26. ¹⁷O NMR спектар једињења СВЕ-RR3.



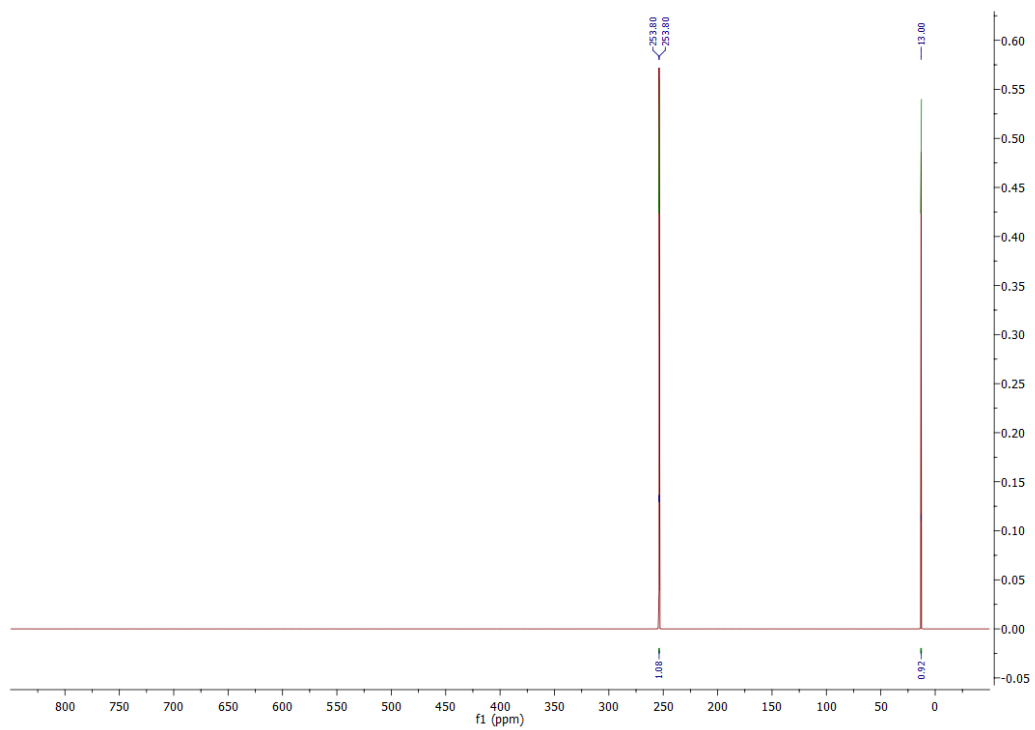
Слика ДМ27. ^1H NMR спектар једињења **СВЕ-RR1**.



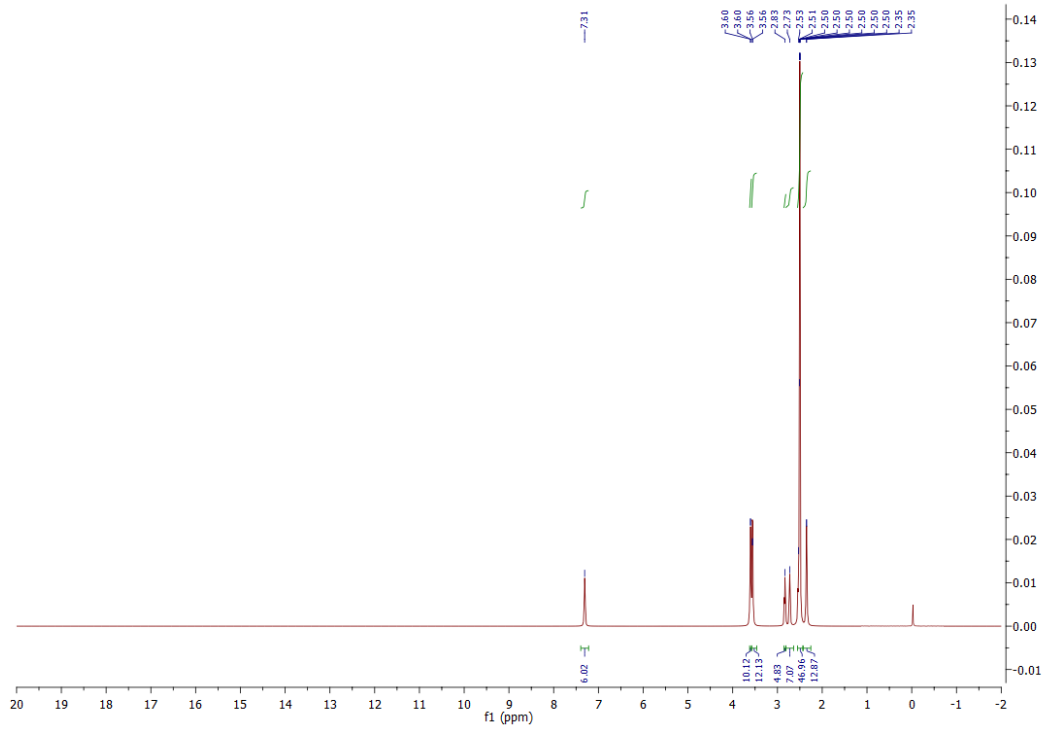
Слика ДМ28. ^{13}C NMR спектар једињења **СВЕ-RR4**.



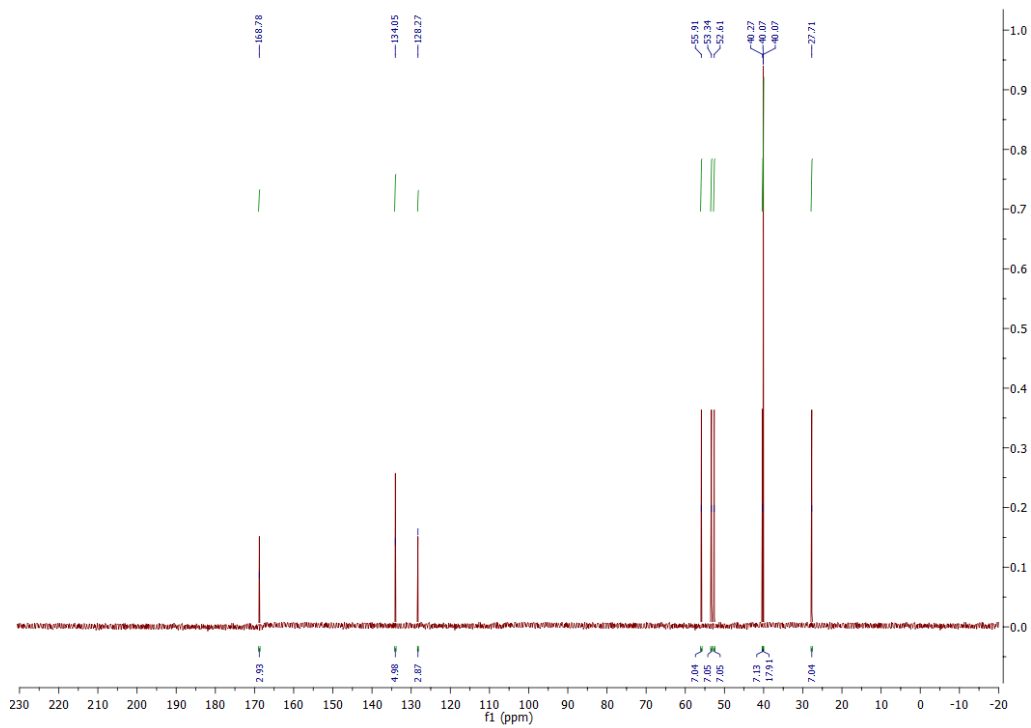
Слика ДМ29. ^{15}N NMR спектар једињења **СВЕ-RR4**.



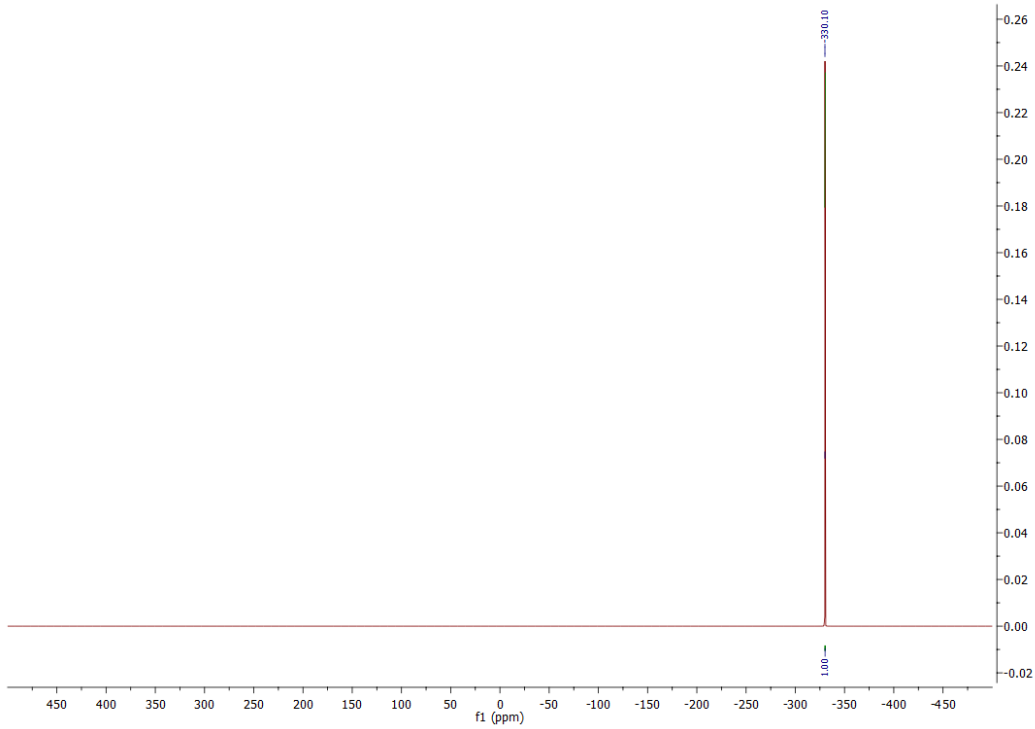
Слика ДМ30. ^{17}O NMR спектар једињења **СВЕ-RR4**.



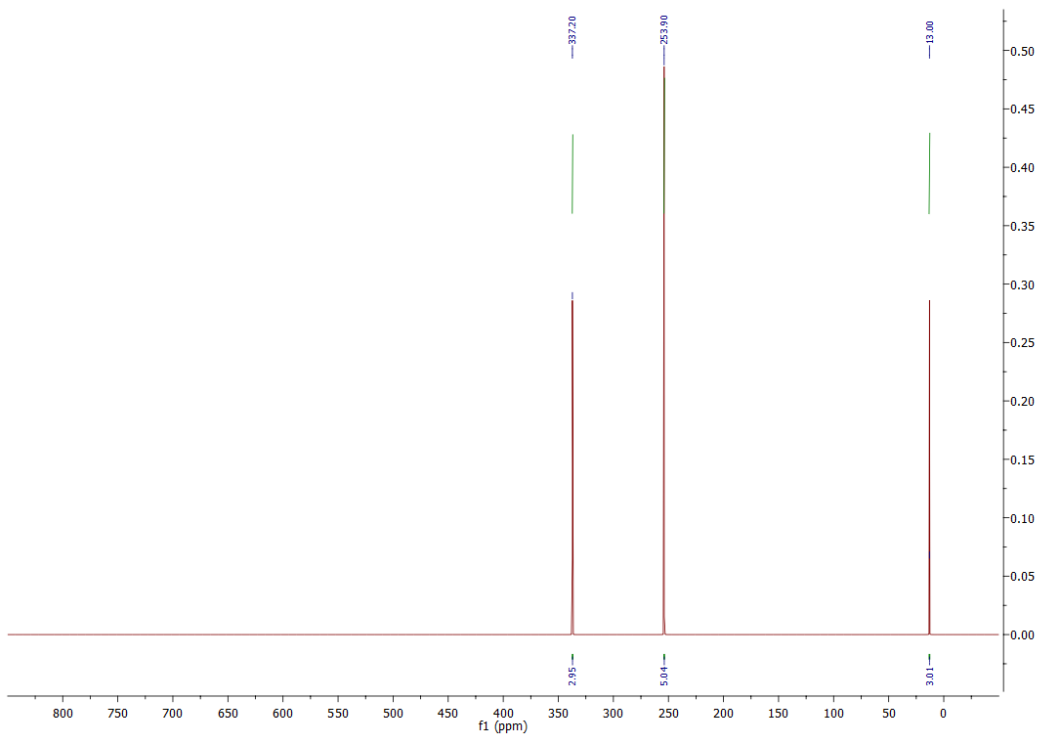
Слика ДМ31. ^1H NMR спектар једињења **СВЕ-RR5**.



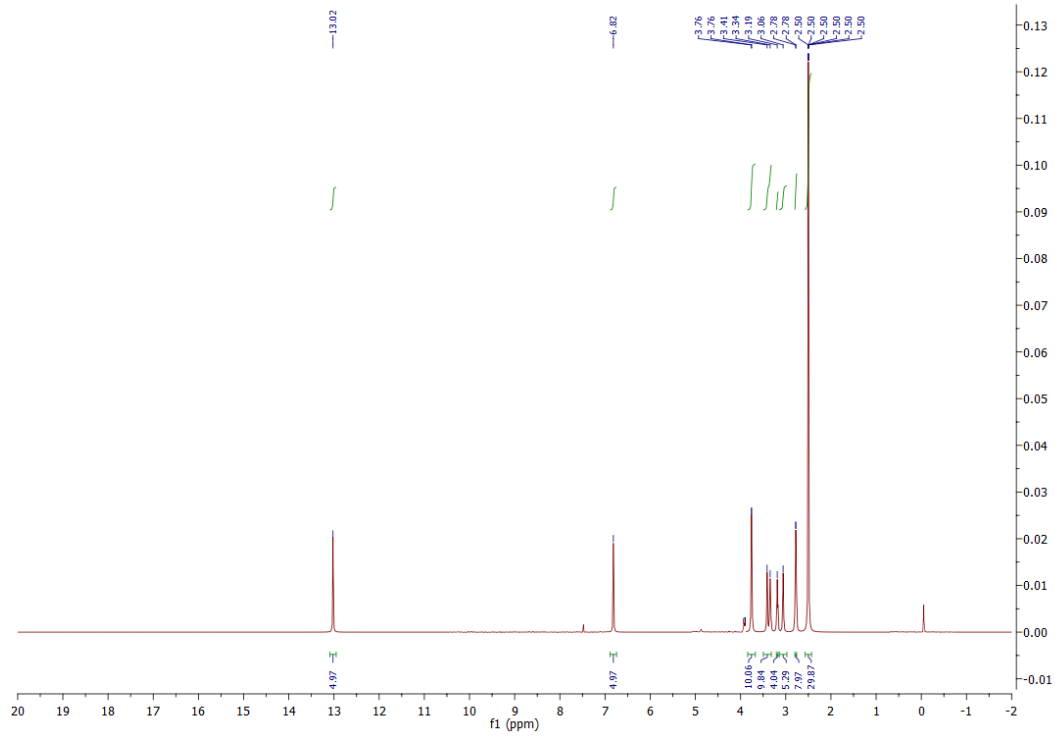
Слика ДМ32. ^{13}C NMR спектар једињења **СВЕ-RR5**.



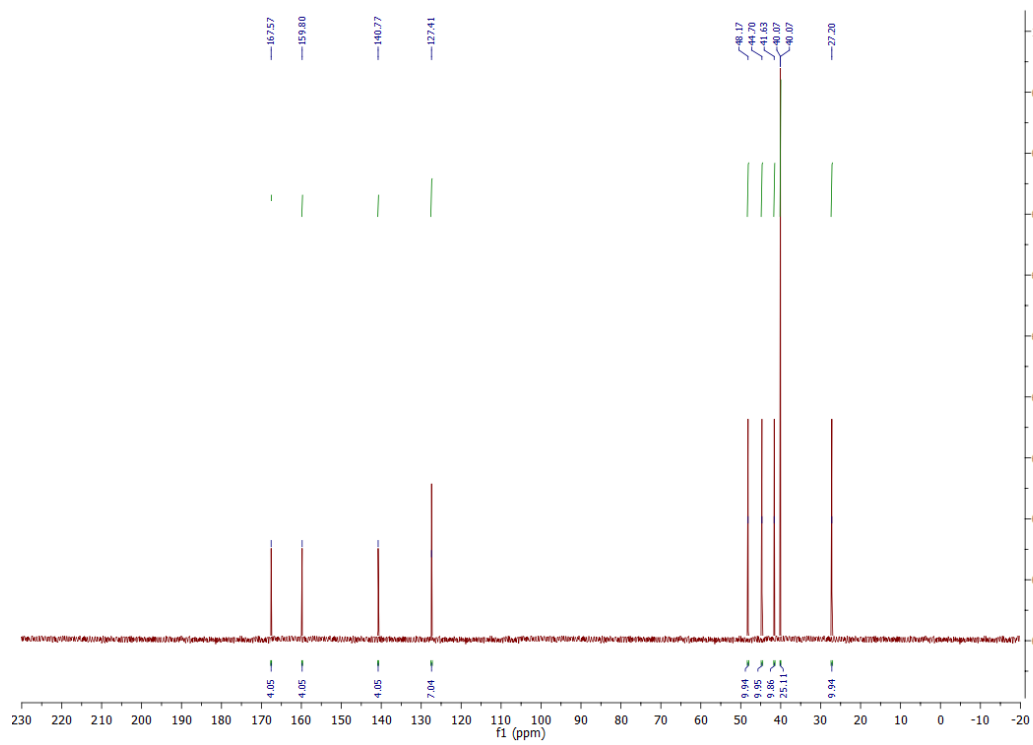
Слика ДМ33. ¹⁵N NMR спектар једињења **СВЕ-RR5**.



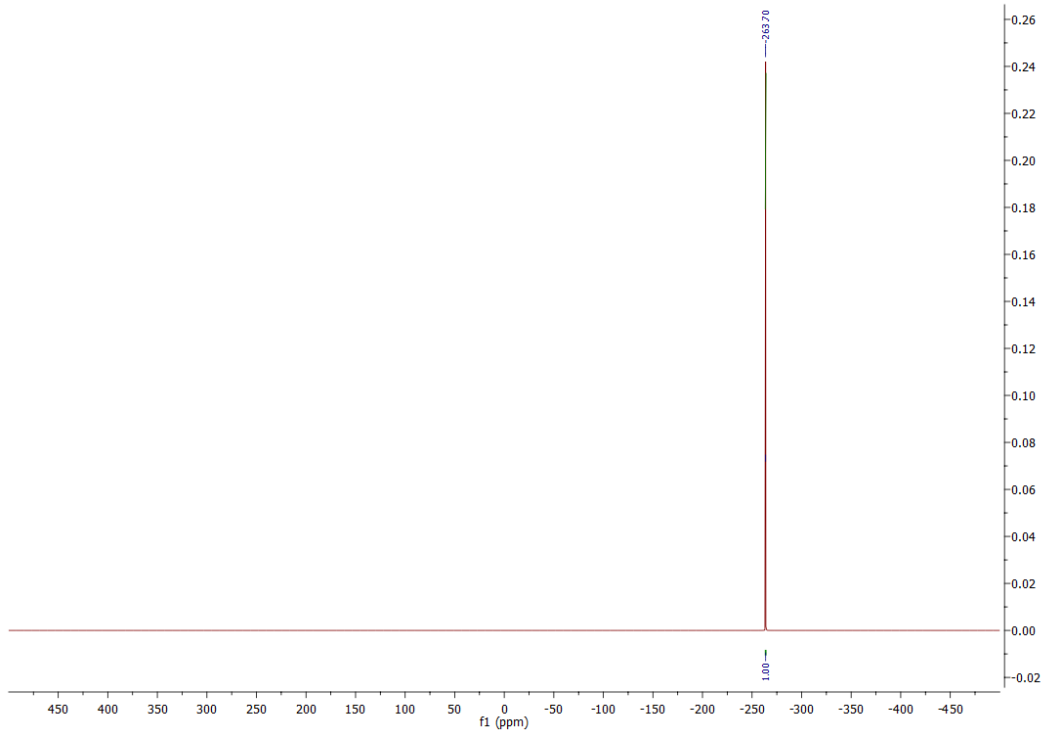
Слика ДМ34. ¹⁷O NMR спектар једињења **СВЕ-RR5**.



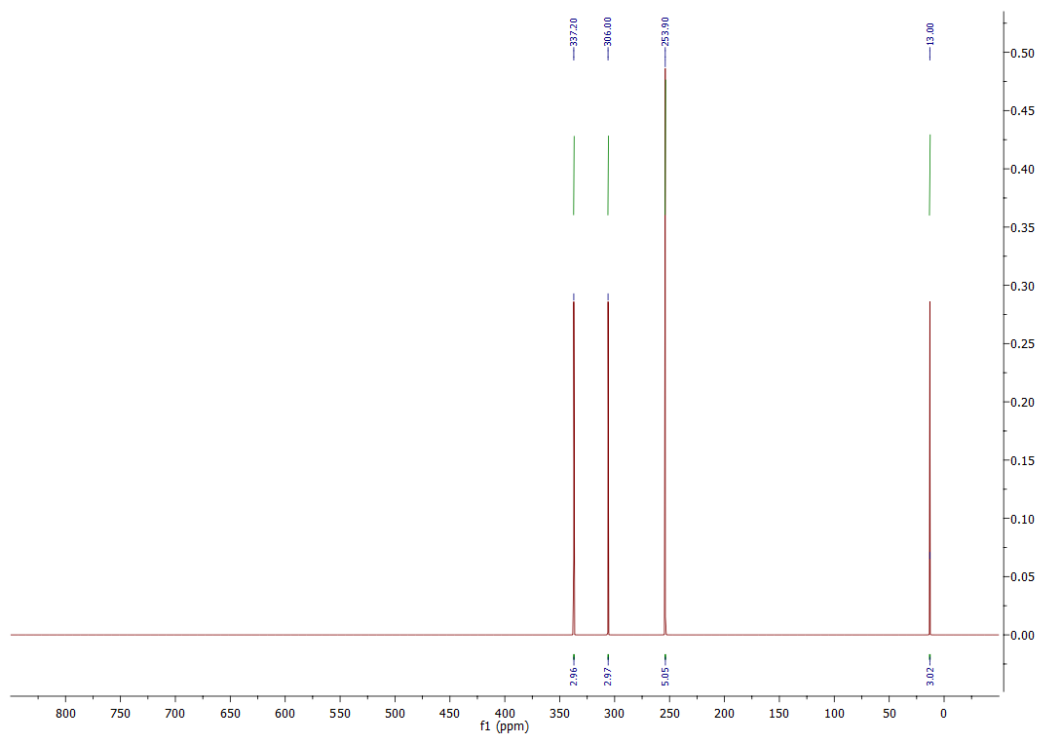
Слика ДМ35. ^1H NMR спектар једињења **СВЕ-RR6**.



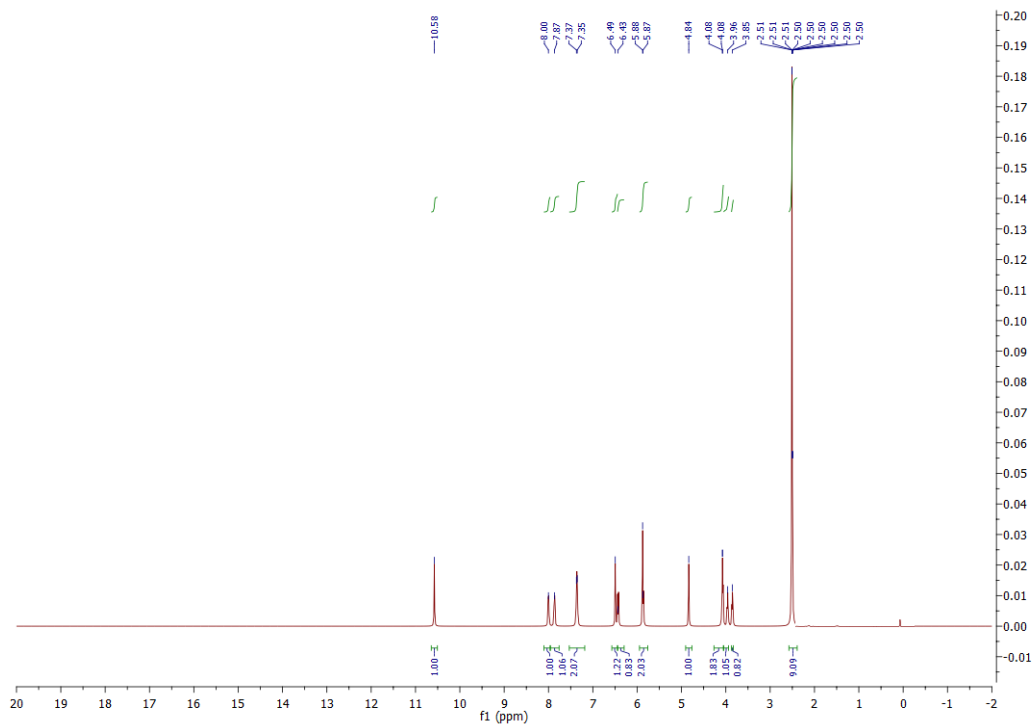
Слика ДМ36. ^{13}C NMR спектар једињења **СВЕ-RR6**.



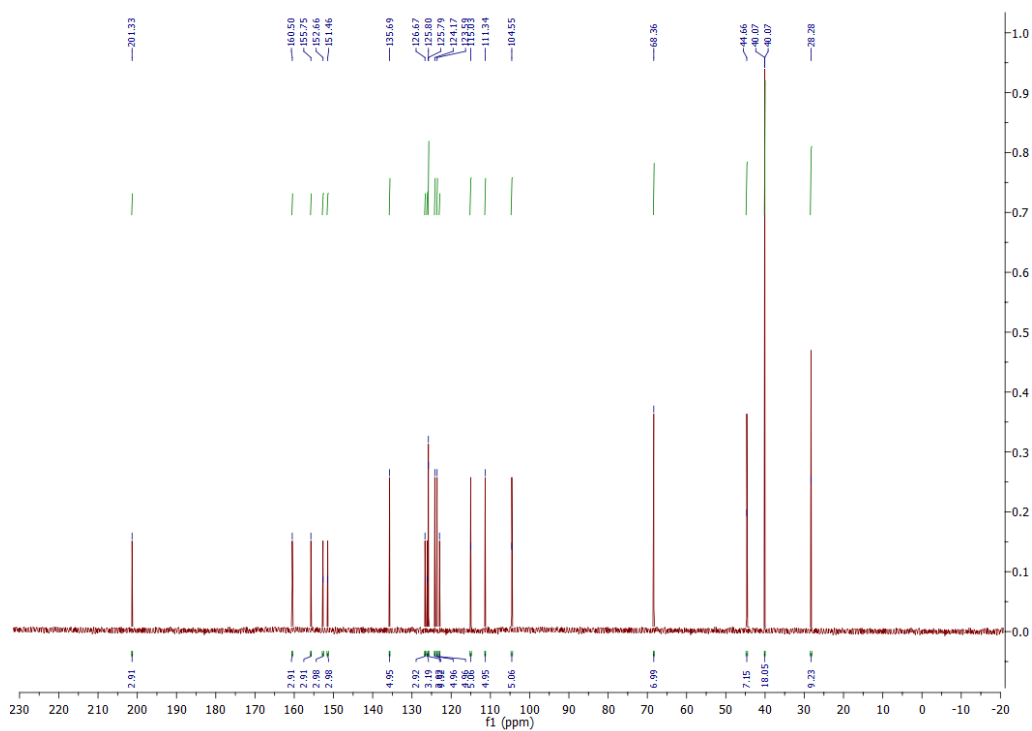
Слика ДМ37. ^{15}N NMR спектар једињења **СВЕ-RR6**.



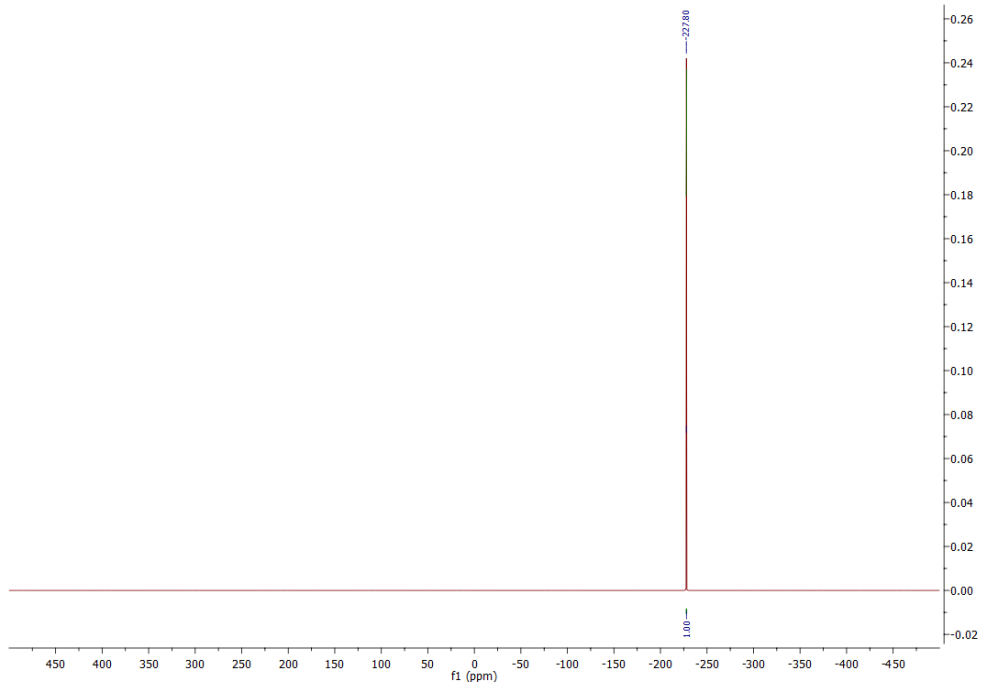
Слика ДМ38. ^{17}O NMR спектар једињења **СВЕ-RR6**.



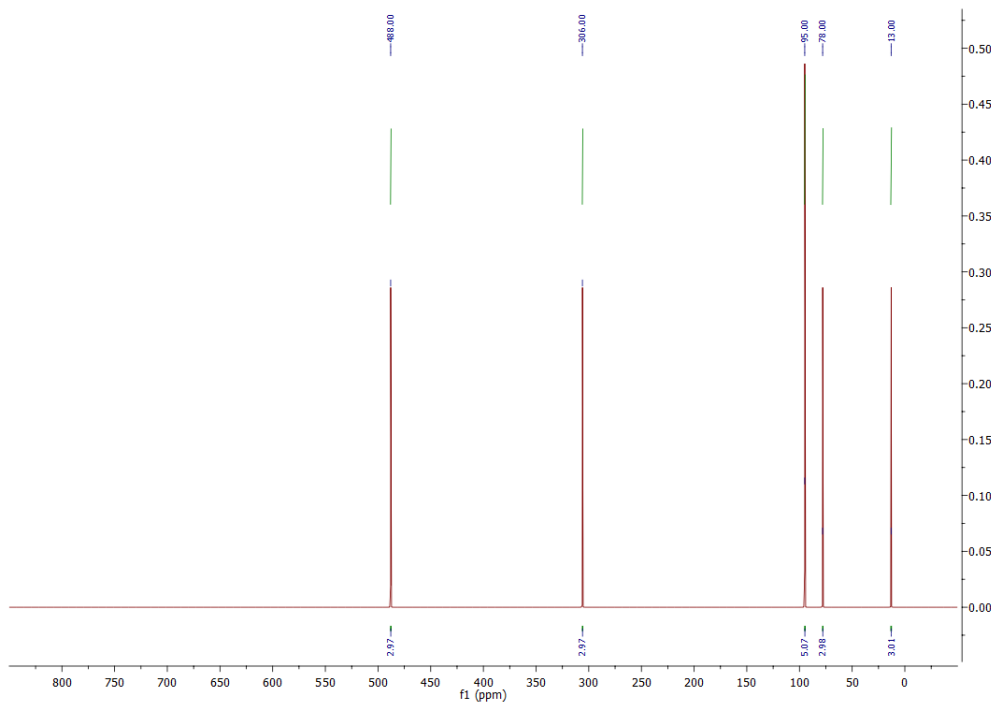
Слика ДМ39. ^1H NMR спектар једињења СВЕ-R1.



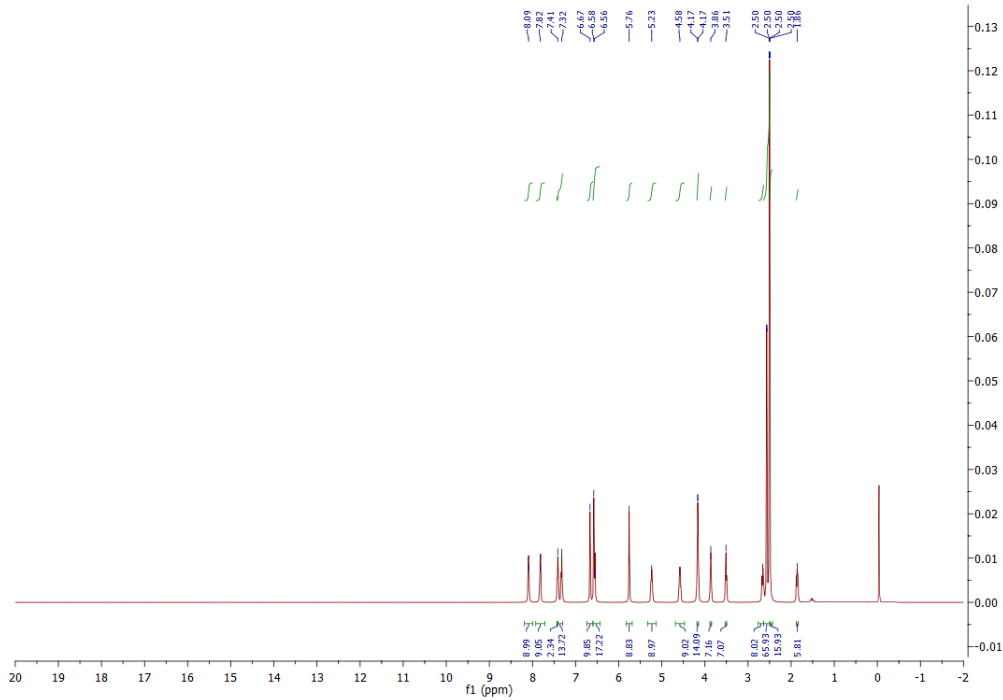
Слика ДМ40. ^{13}C NMR спектар једињења СВЕ-R1.



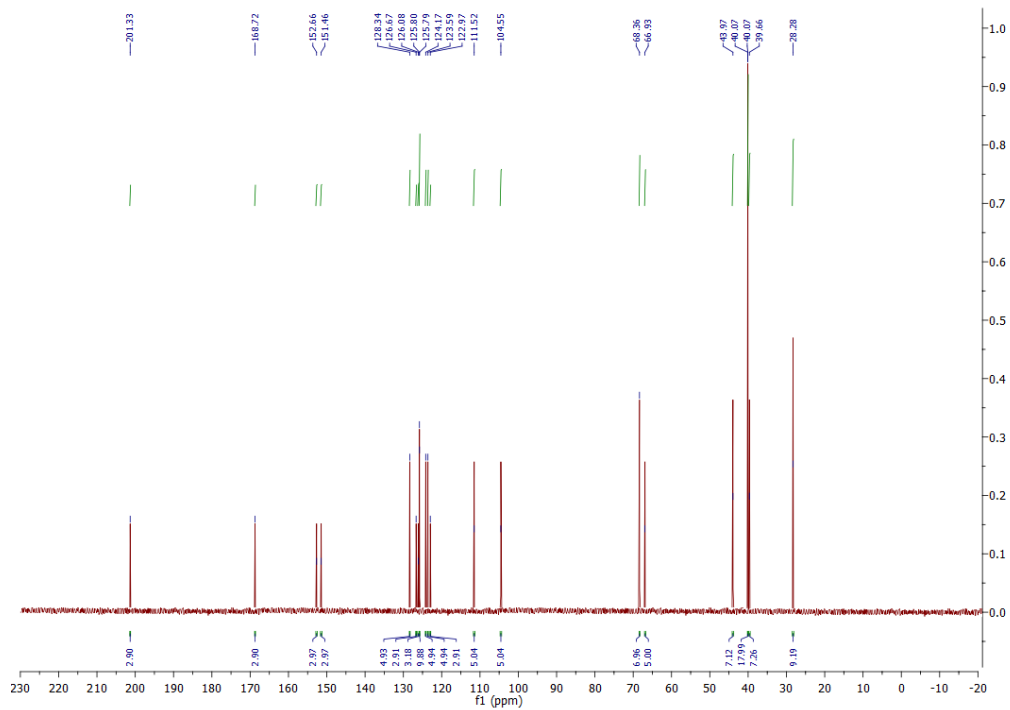
Слика ДМ41. ^{15}N NMR спектар једињења **СВЕ-R1**.



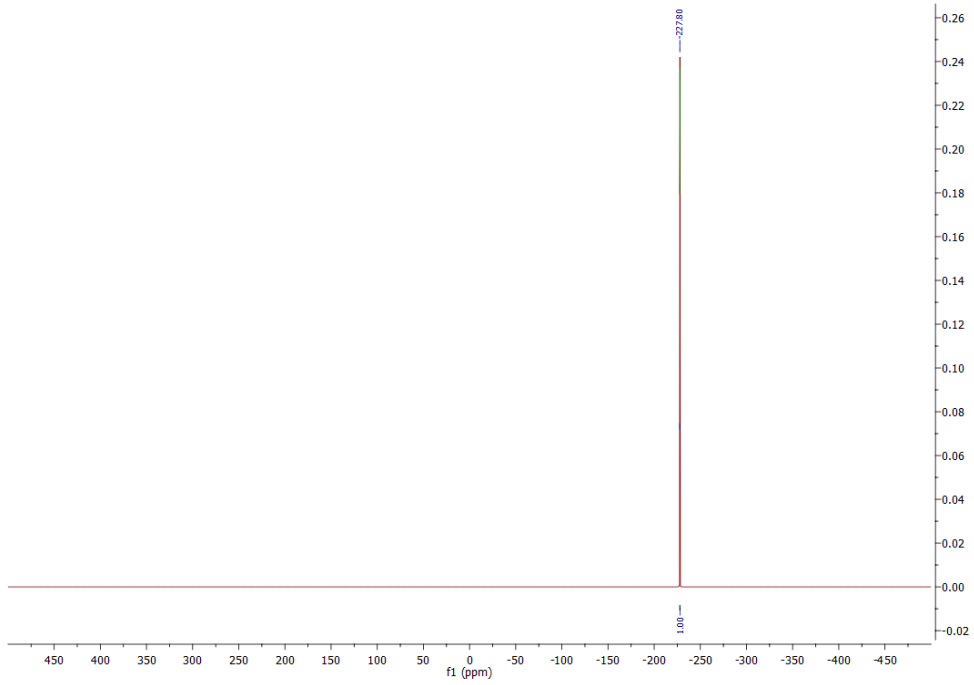
Слика ДМ42. ^{17}O NMR спектар једињења **СВЕ-R1**.



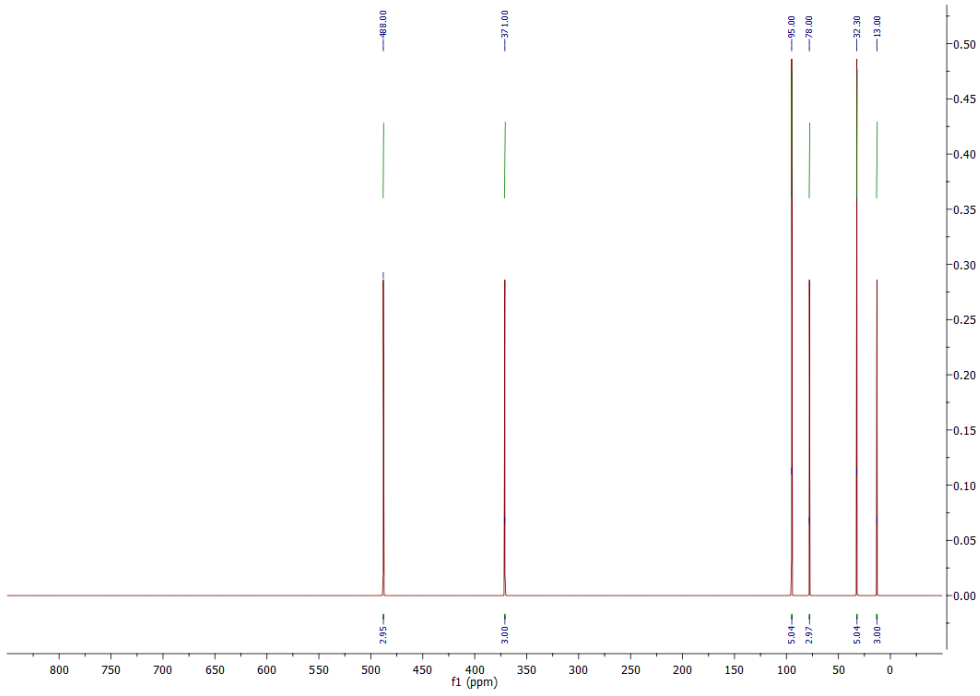
Слика ДМ43. ^1H NMR спектар једињења СВЕ-R2.



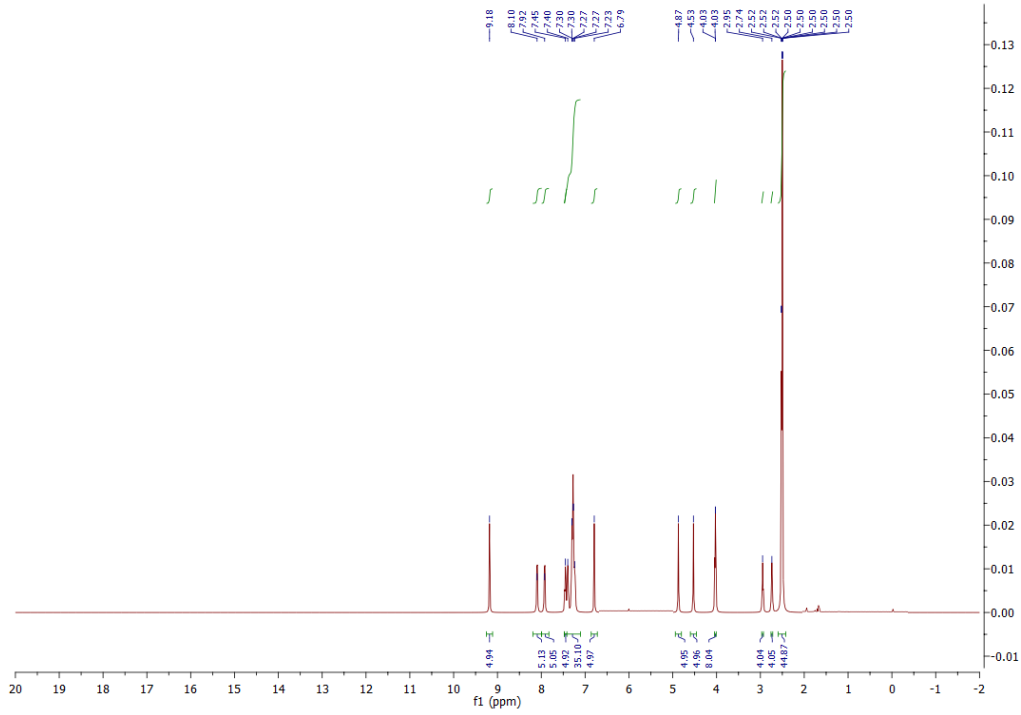
Слика ДМ44. ^{13}C NMR спектар једињења СВЕ-R2.



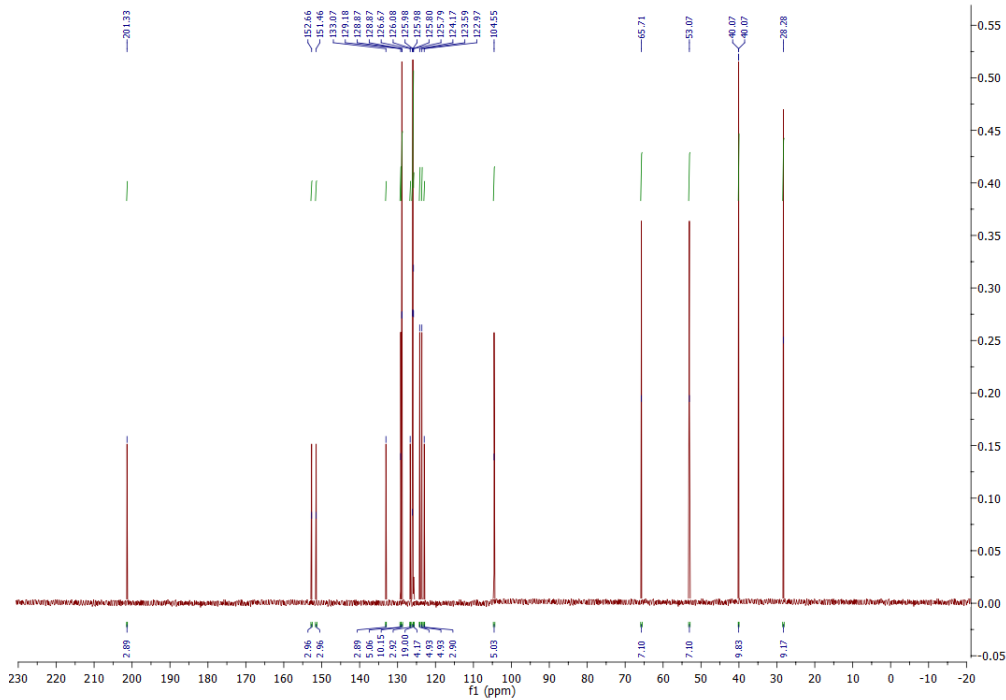
Слика ДМ45. ^{15}N NMR спектар једињења **СВЕ-R2**.



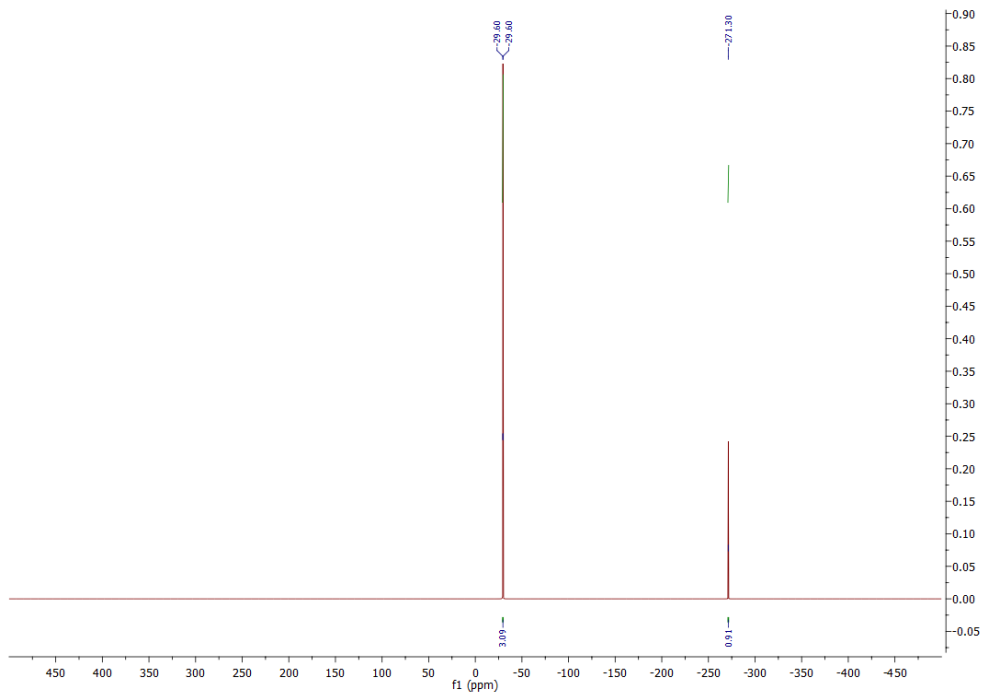
Слика ДМ46. ^{17}O NMR спектар једињења **СВЕ-R2**.



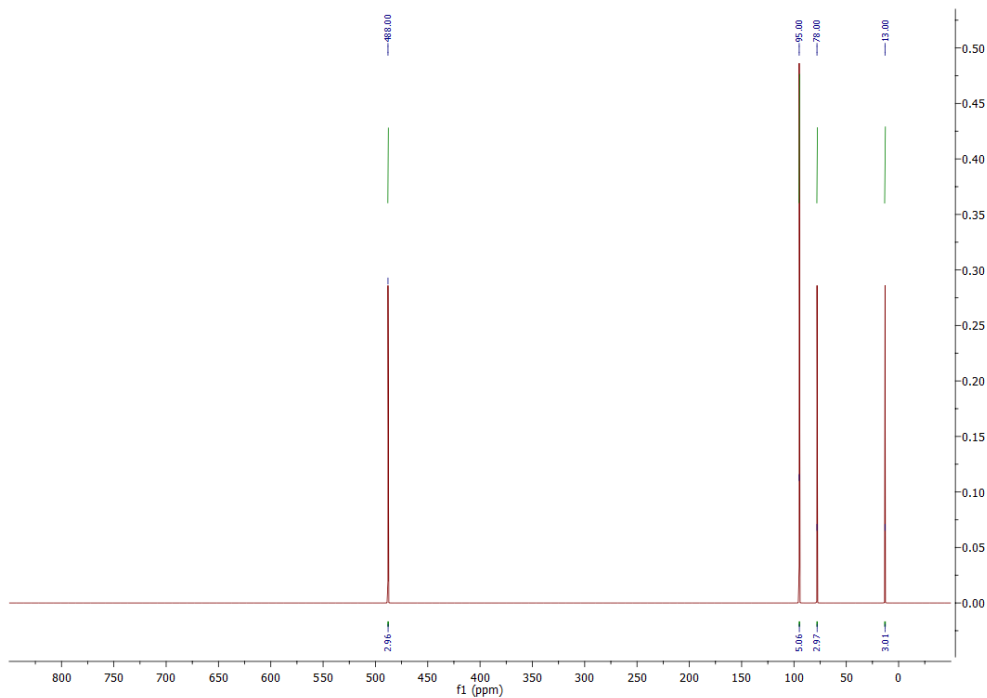
Слика ДМ47. ^1H NMR спектар једињења СВЕ-R3.



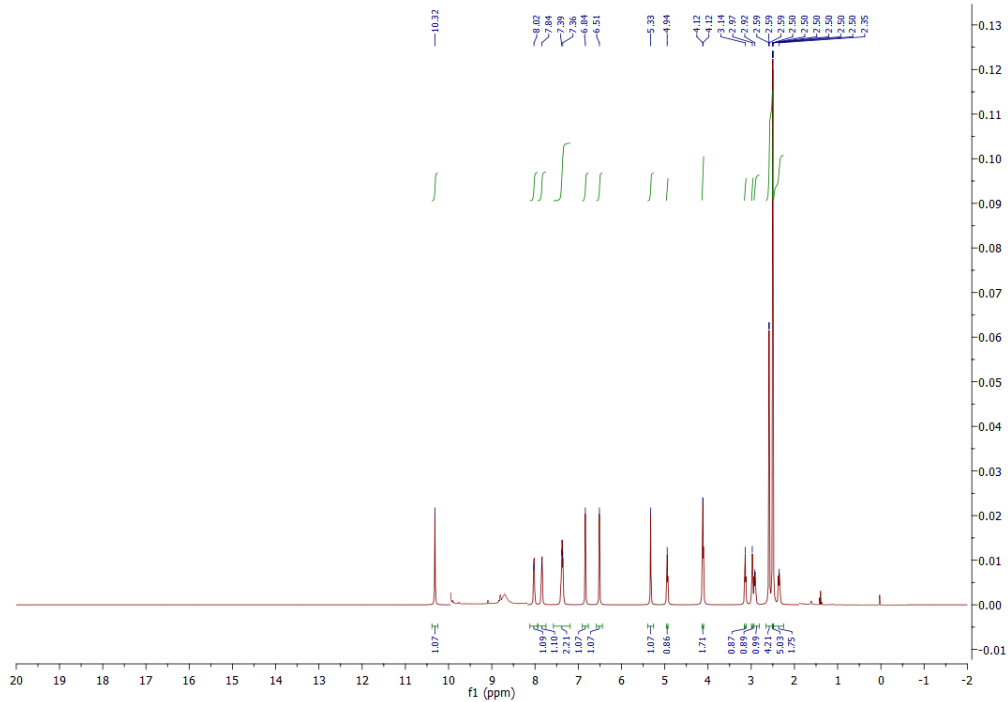
Слика ДМ48. ^{13}C NMR спектар једињења СВЕ-R3.



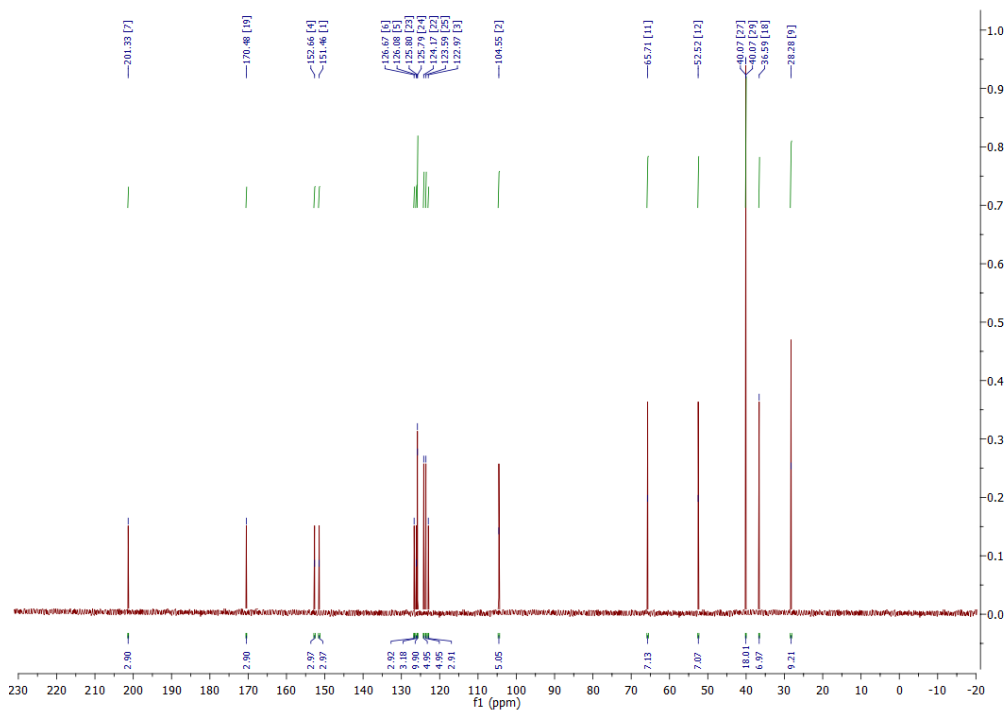
Слика ДМ49. ^{15}N NMR спектар једињења **СВЕ-R3**.



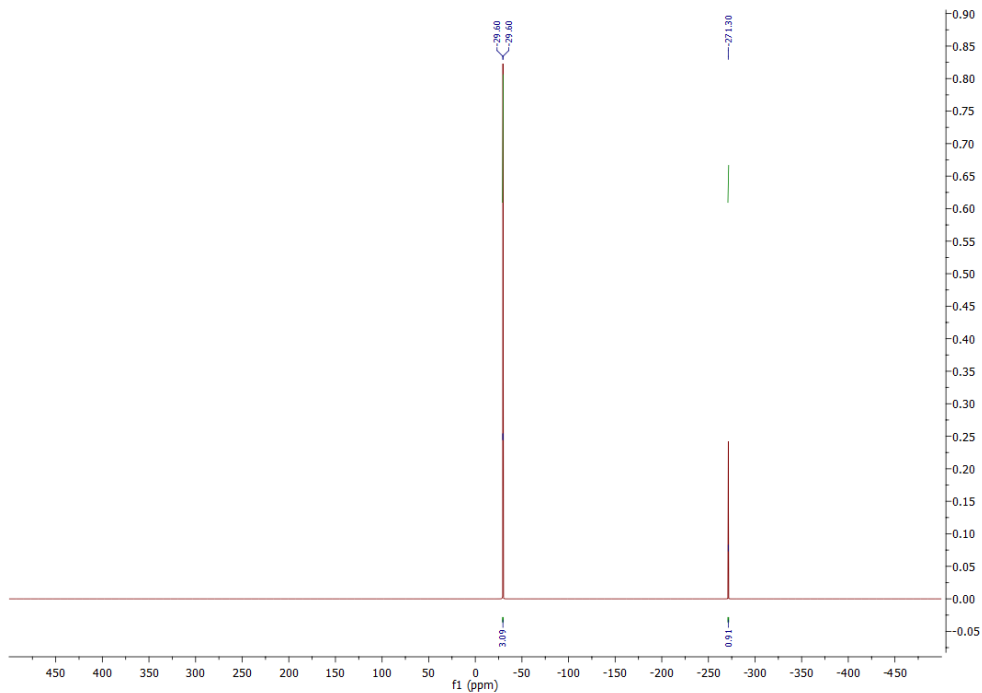
Слика ДМ50. ^{17}O NMR спектар једињења **СВЕ-R3**.



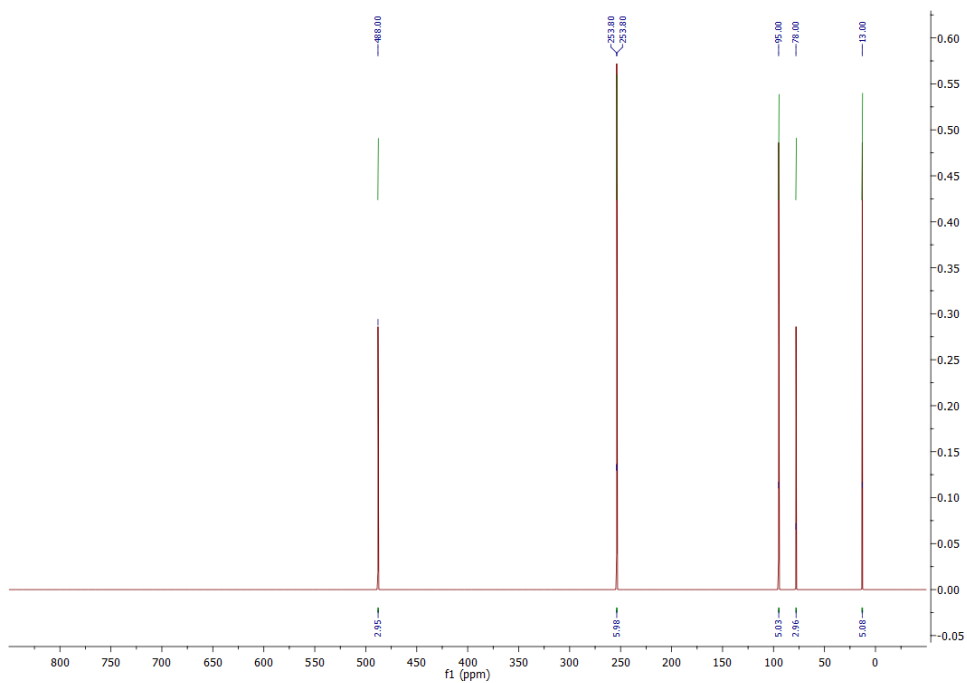
Слика ДМ51. ^1H NMR спектар једињења СВЕ-R4.



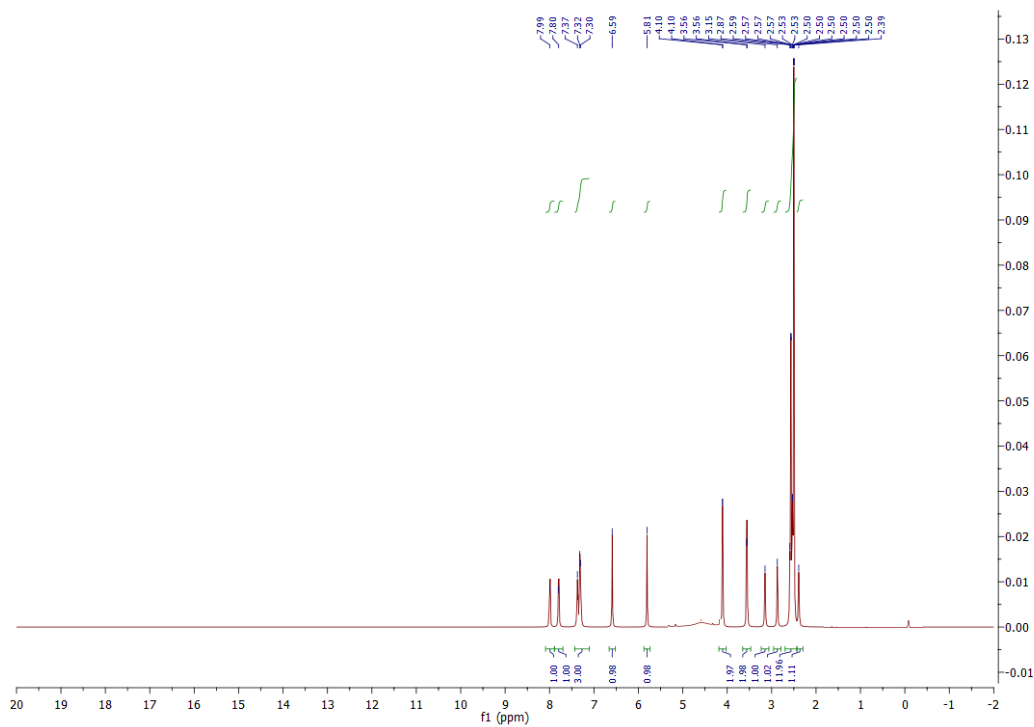
Слика ДМ52. ^{13}C NMR спектар једињења СВЕ-R4.



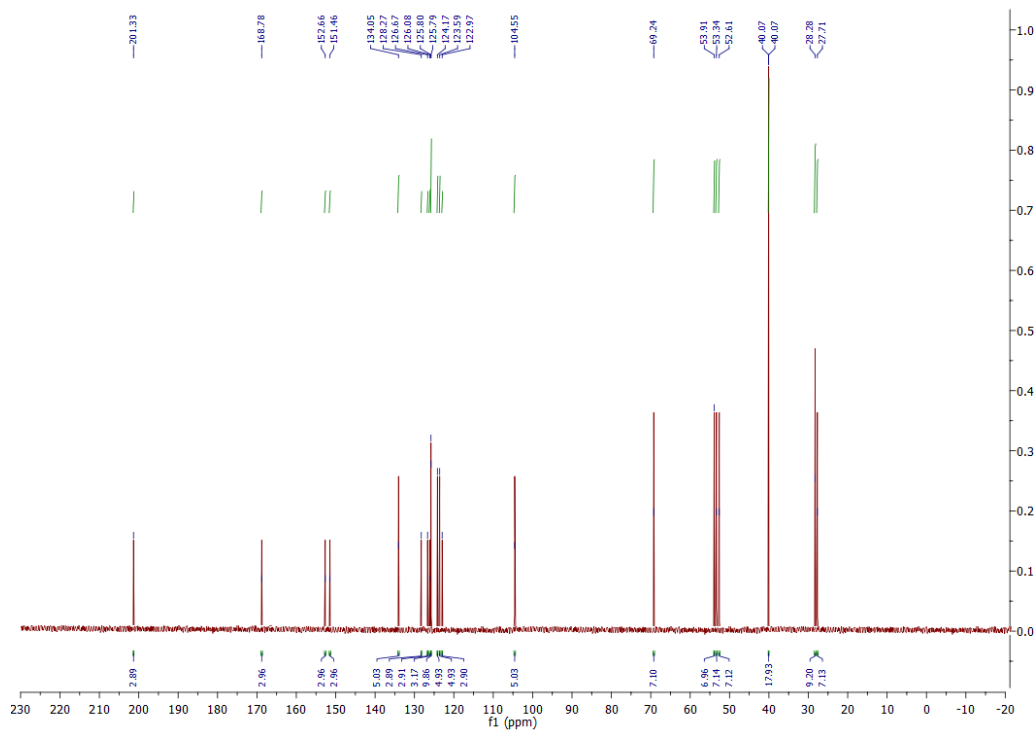
Слика ДМ53. ^{15}N NMR спектар једињења **СВЕ-R4**.



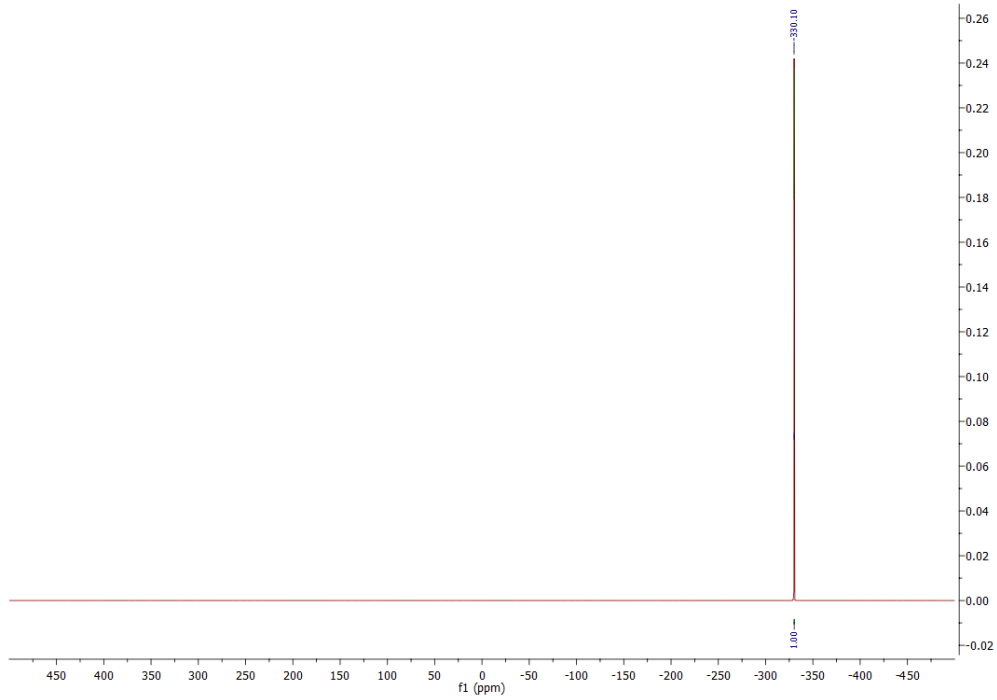
Слика ДМ54. ^{17}O NMR спектар једињења **СВЕ-R4**.



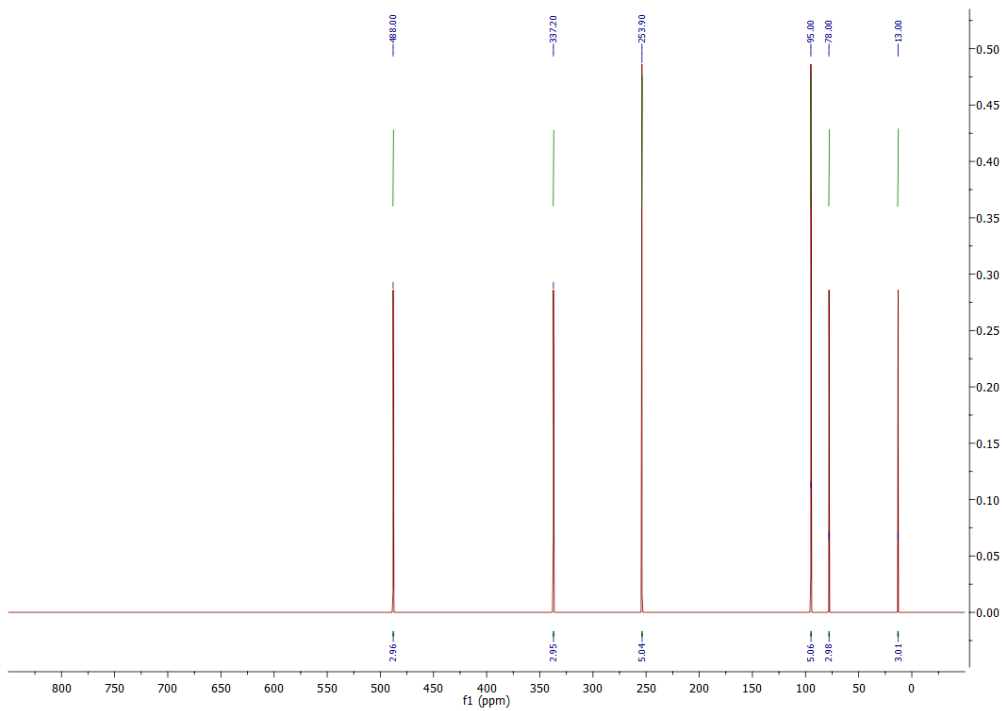
Слика ДМ55. ^1H NMR спектар једињења СВЕ-R5.



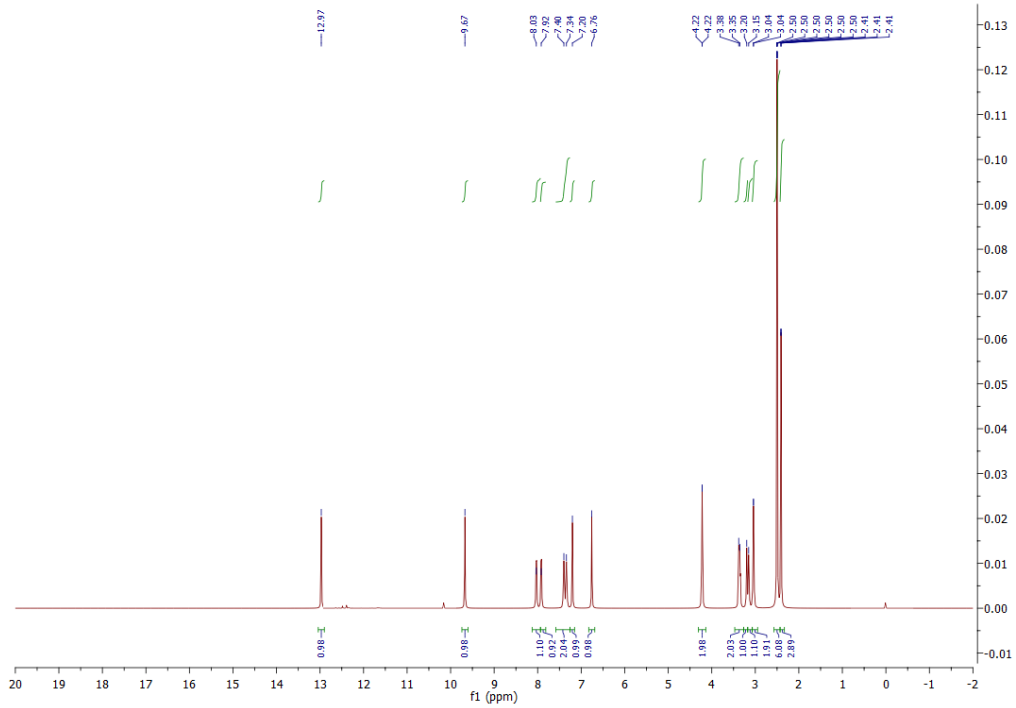
Слика ДМ56. ^{13}C NMR спектар једињења СВЕ-R5.



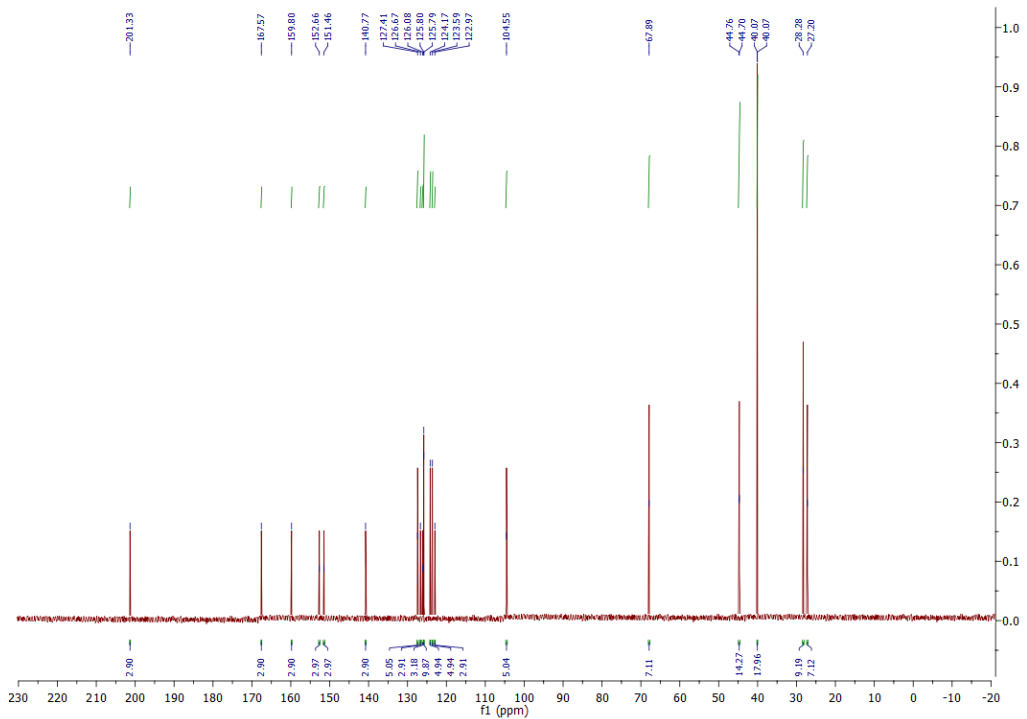
Слика ДМ57. ^{15}N NMR спектар једињења **СВЕ-R5**.



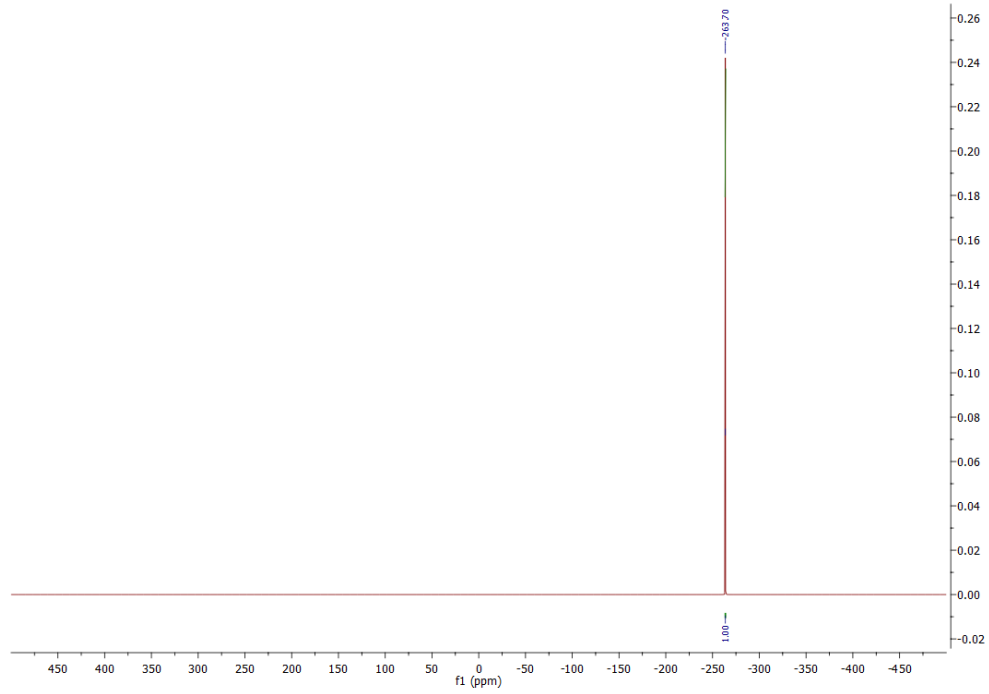
Слика ДМ58. ^{17}O NMR спектар једињења **СВЕ-R5**.



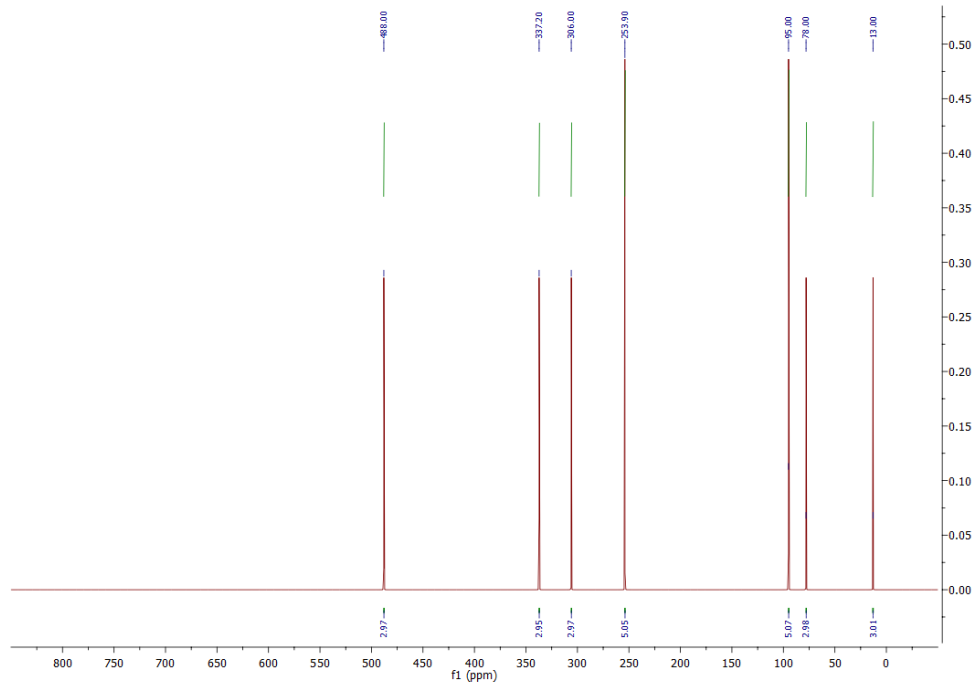
Слика ДМ59. ^1H NMR спектар једињења СВЕ-R6.



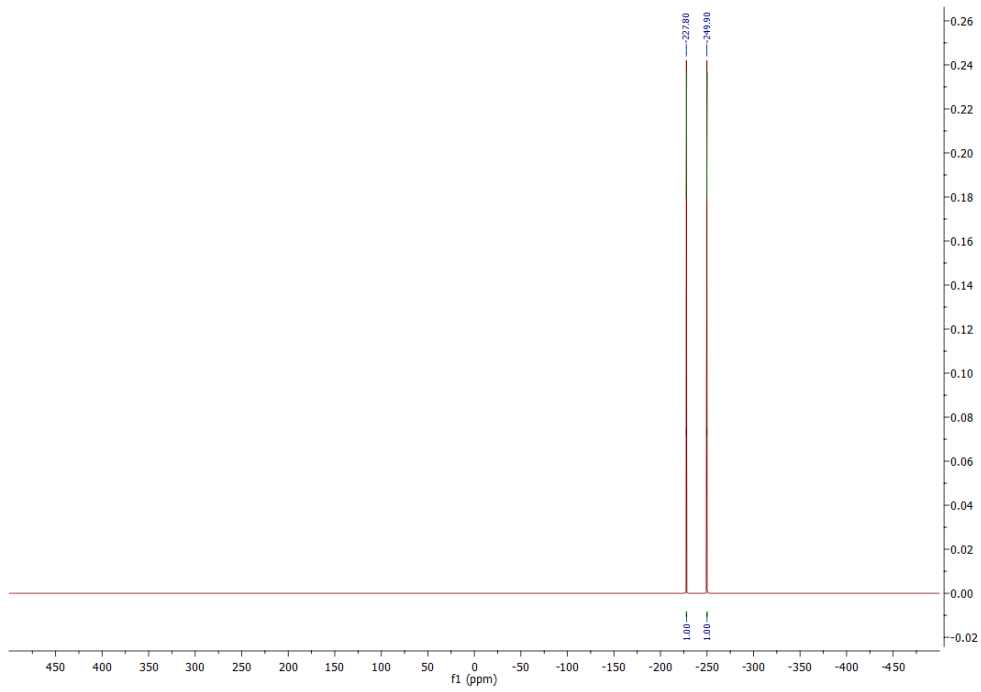
Слика ДМ60. ^{13}C NMR спектар једињења СВЕ-R6.



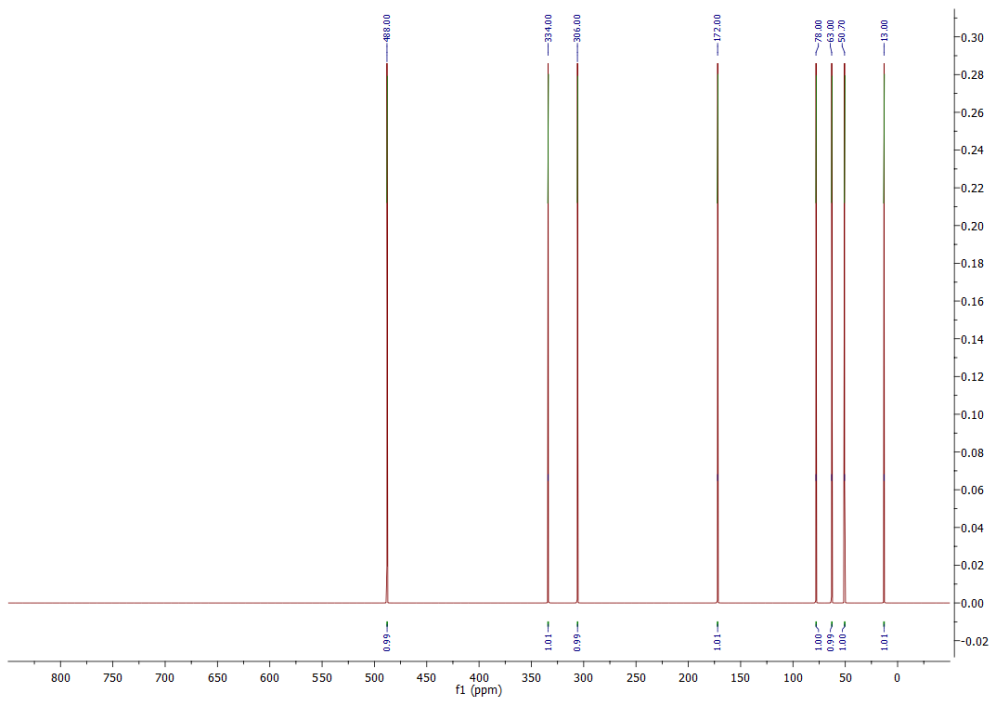
Слика ДМ61. ^{15}N NMR спектар једињења **СВЕ-R6**.



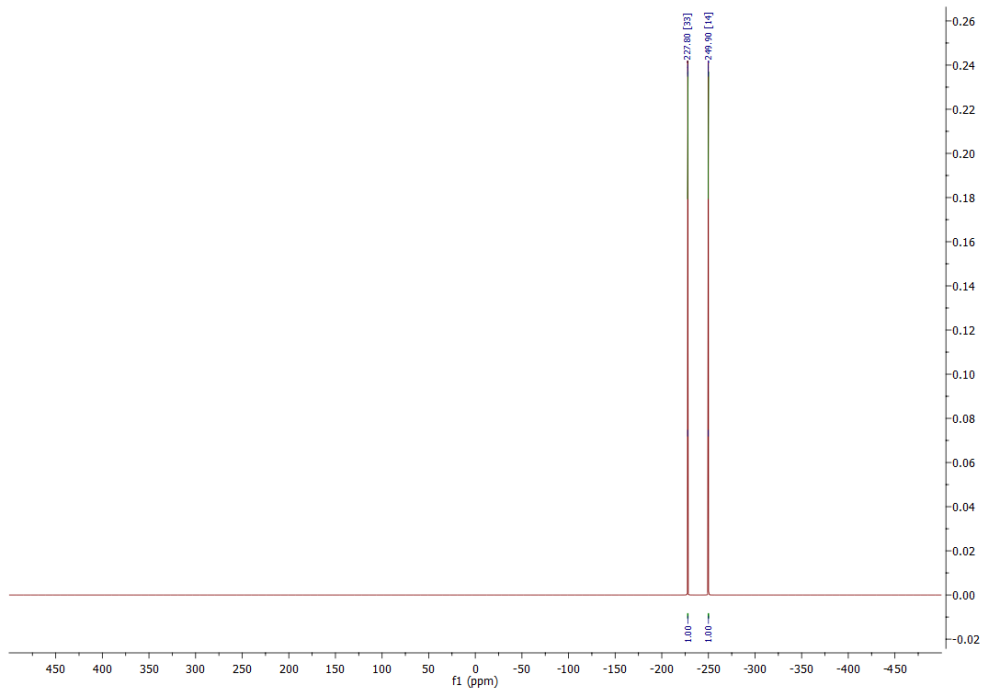
Слика ДМ62. ^{17}O NMR спектар једињења **СВЕ-R6**.



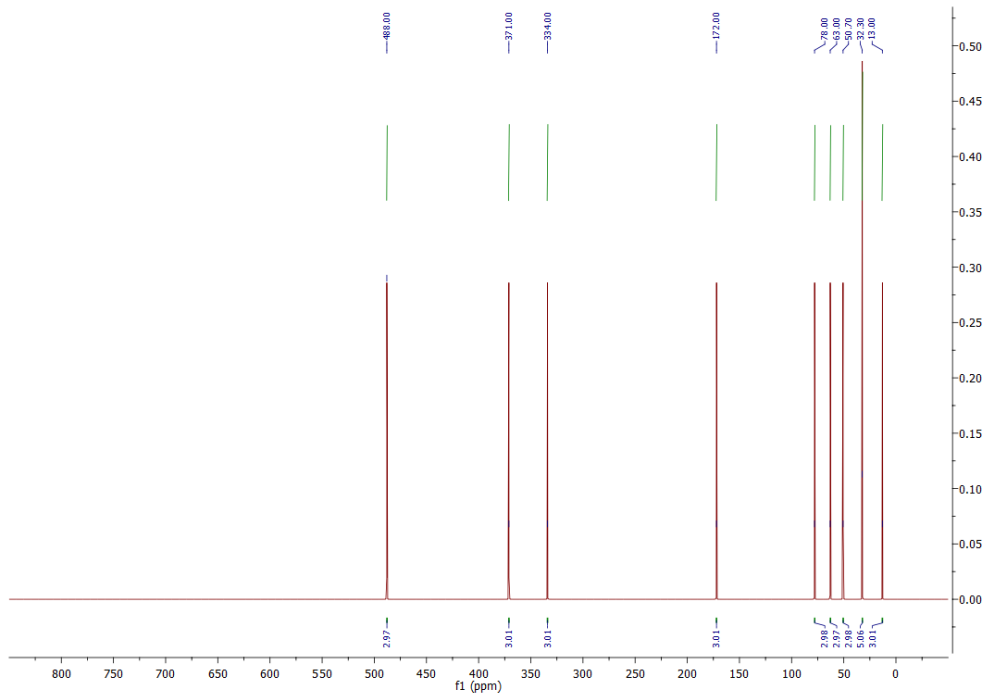
Слика ДМ65. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-SBE-1**.



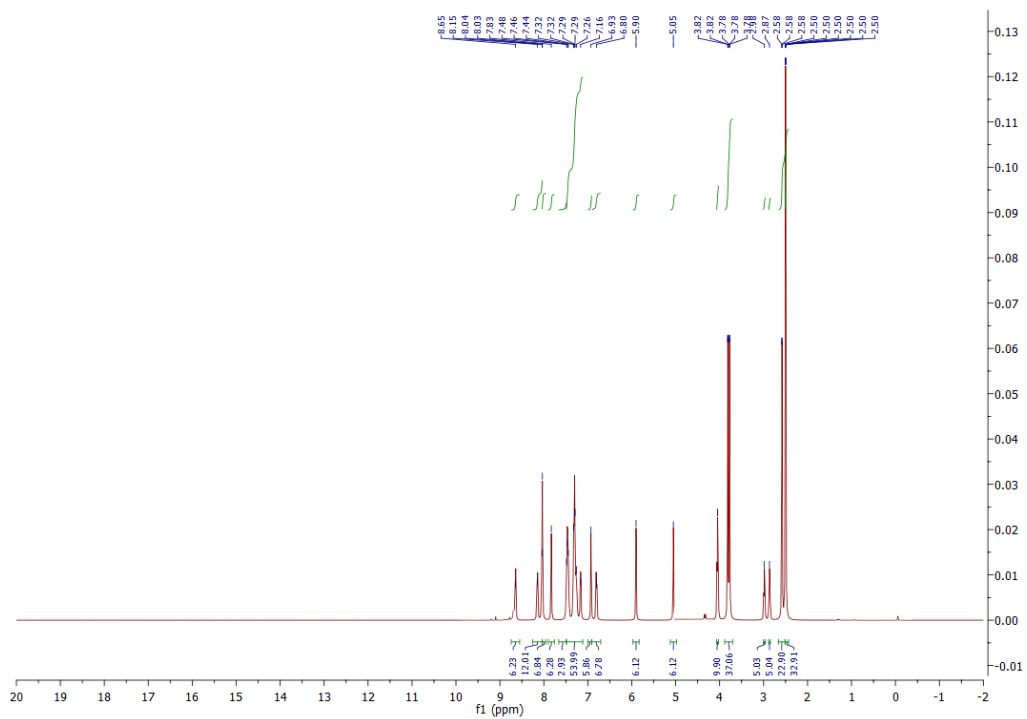
Слика ДМ66. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-SBE-1**.



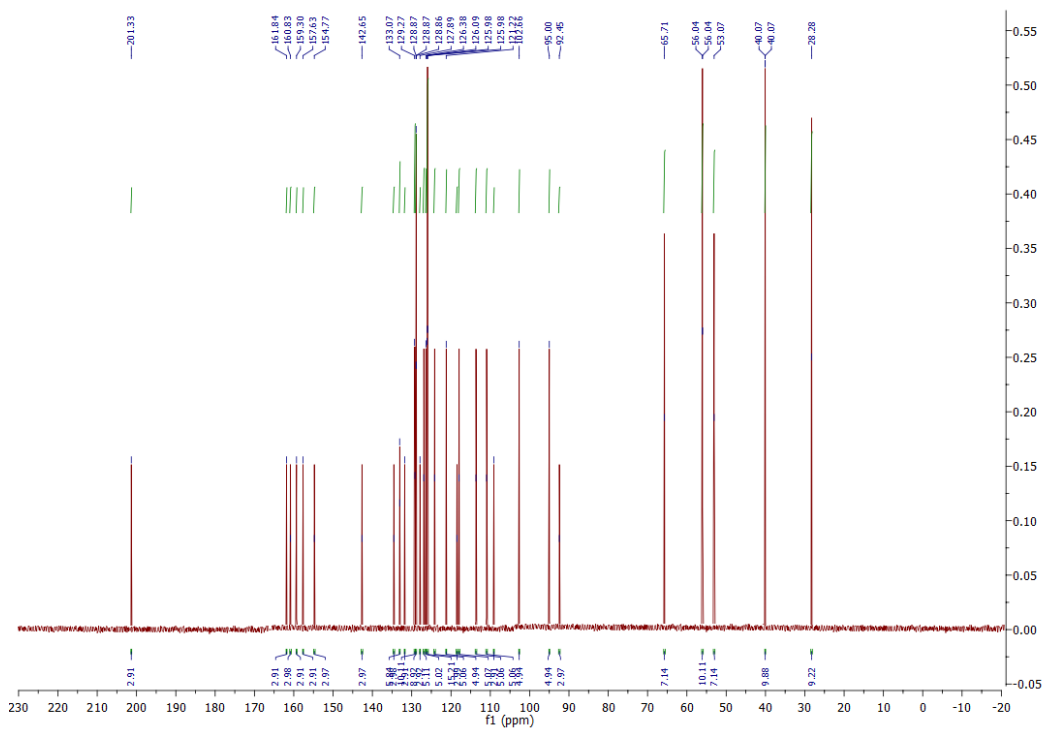
Слика ДМ69. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-SBE-2**.



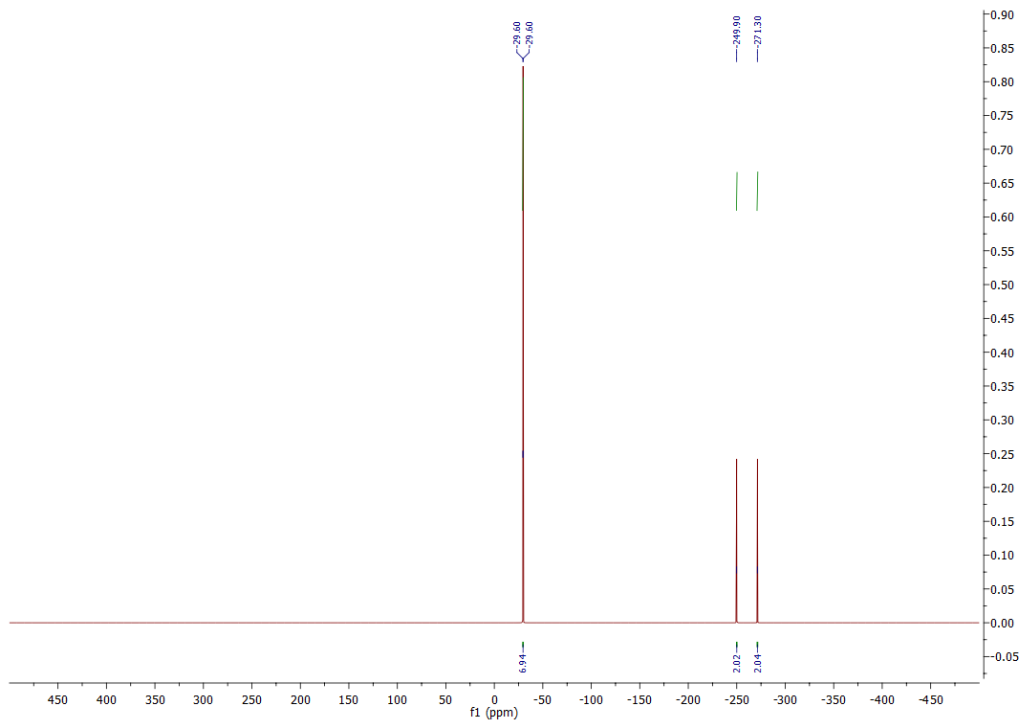
Слика ДМ70. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-SBE-2**.



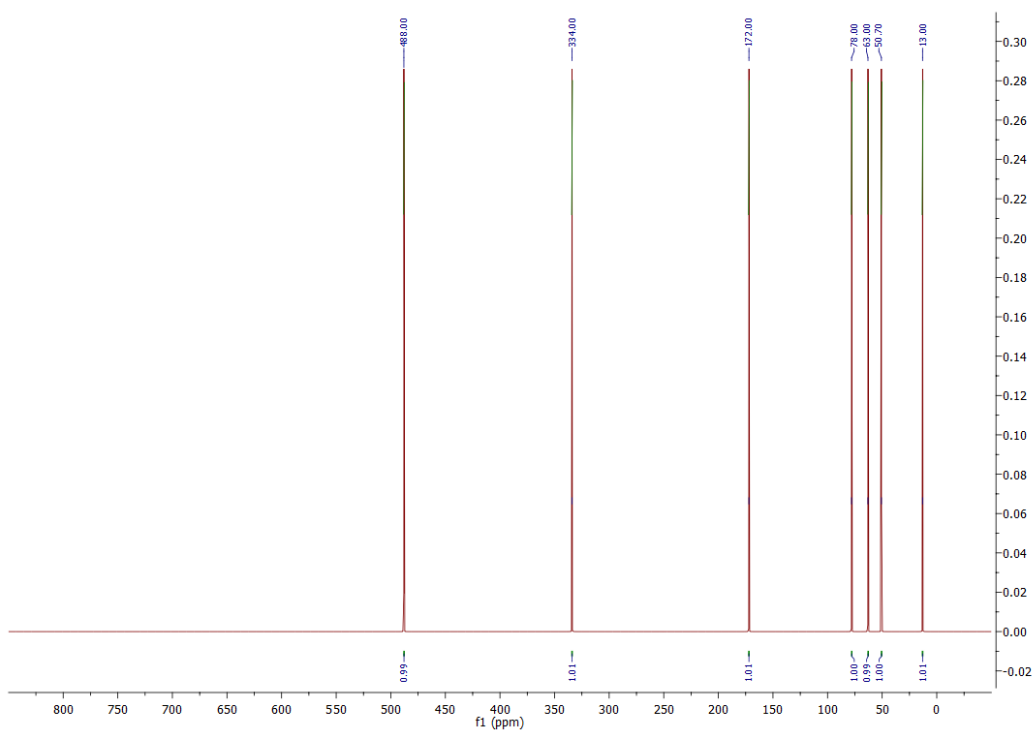
Слика ДМ71. ^1H NMR спектар једињења Pro-SBE-3.



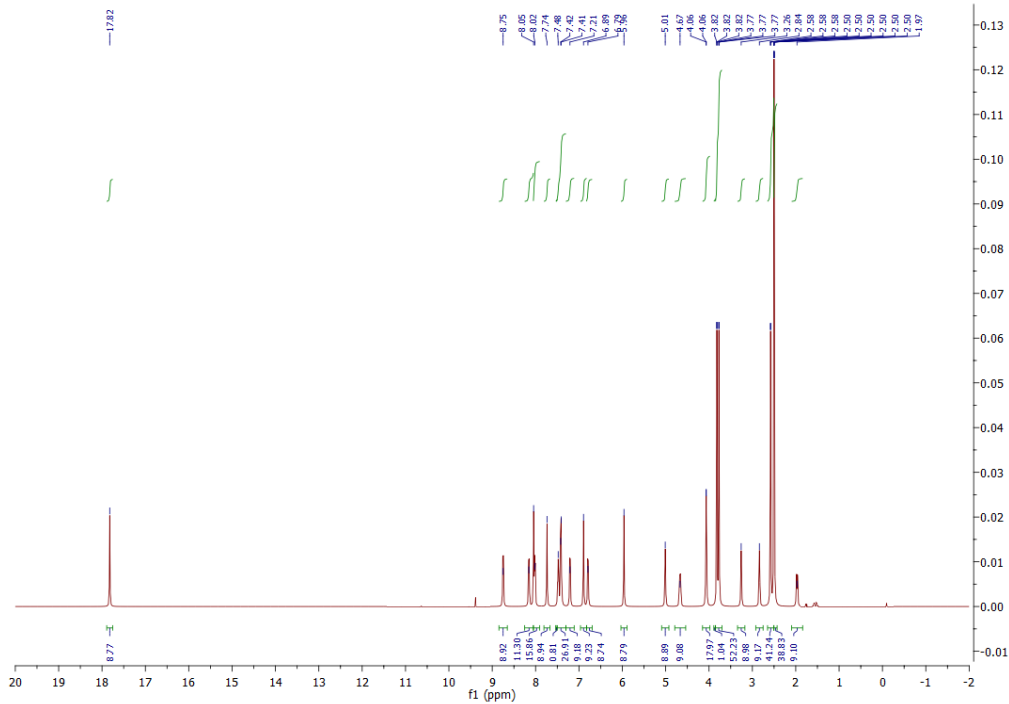
Слика ДМ72. ^{13}C NMR спектар једињења Pro-SBE-3.



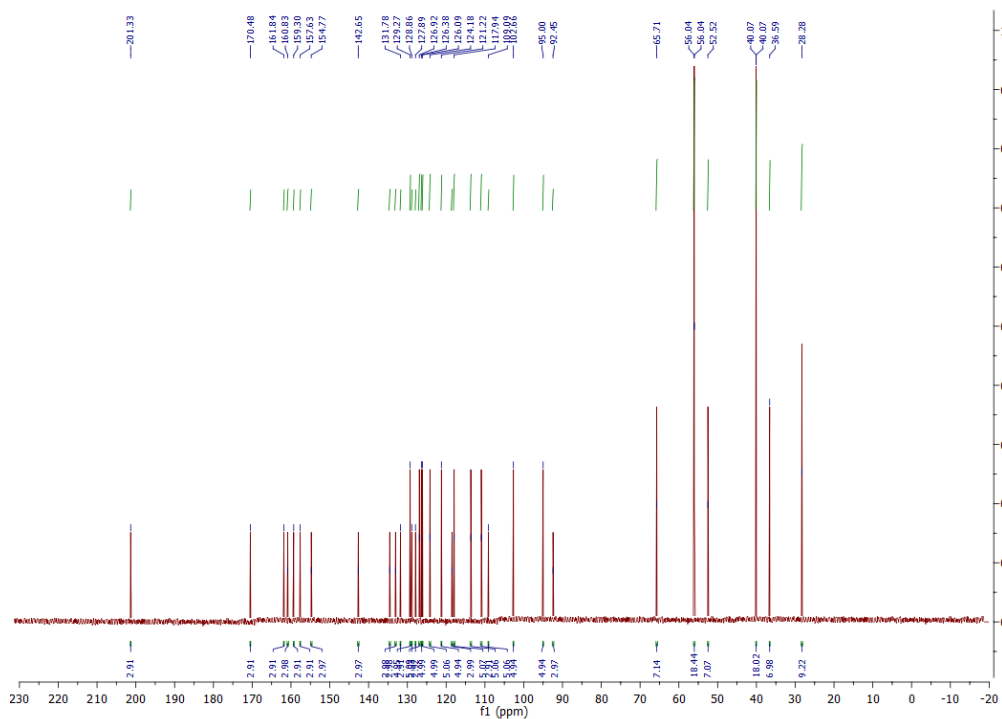
Слика ДМ73. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-SBE-3**.



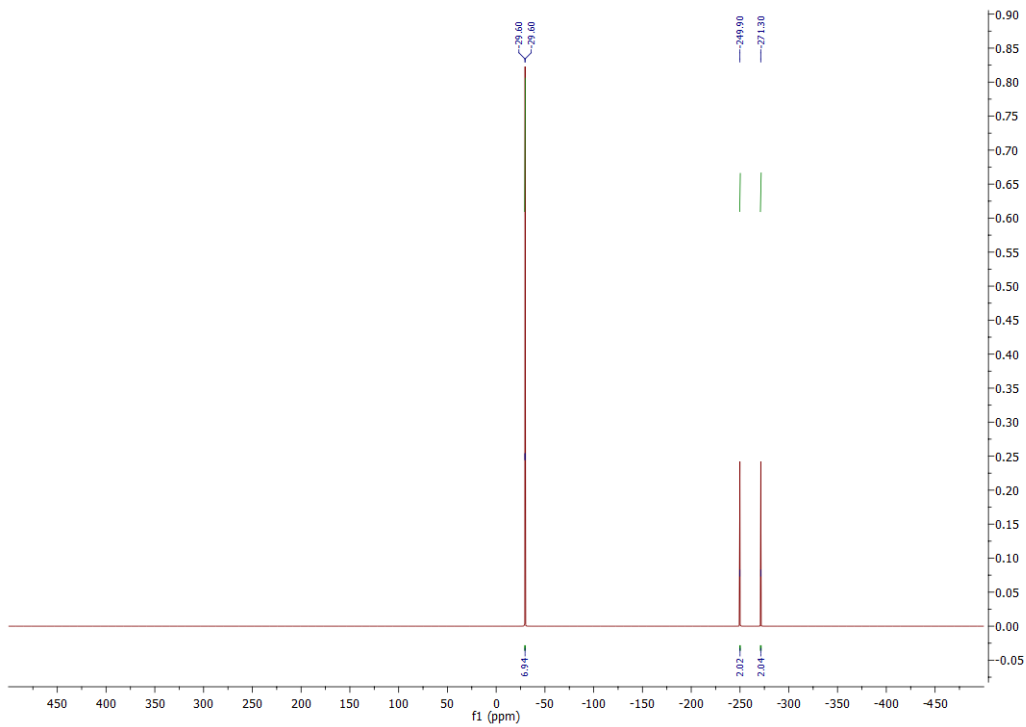
Слика ДМ74. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-SBE-3**.



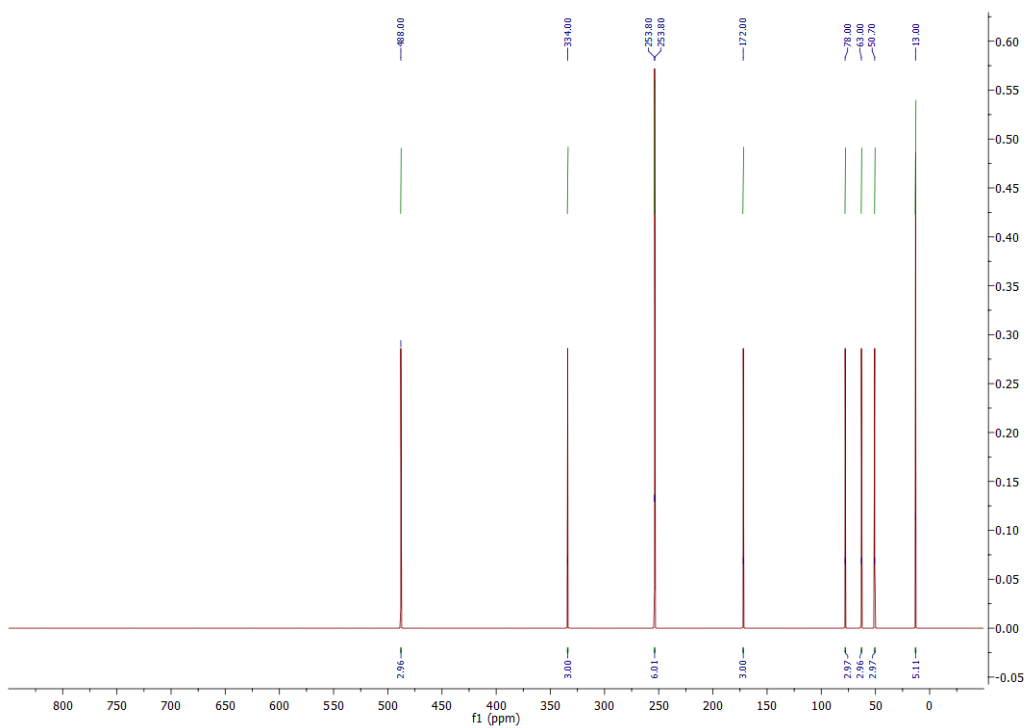
Слика ДМ75. ^1H NMR спектар једињења **Pro-SBE-4**



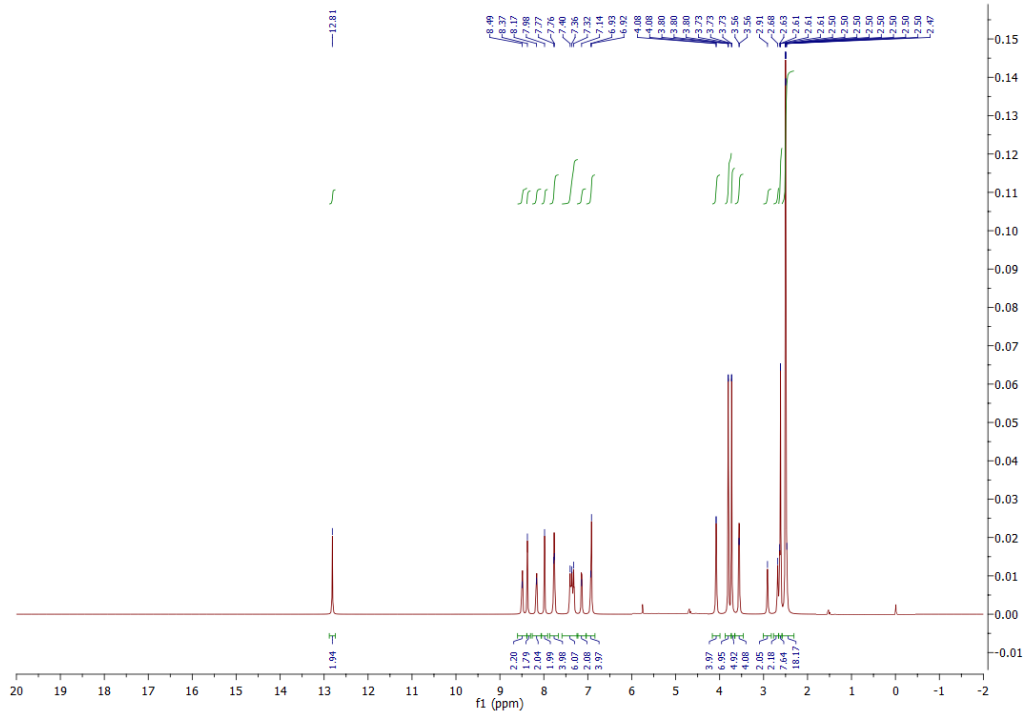
Слика ДМ76. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-SBE-4**.



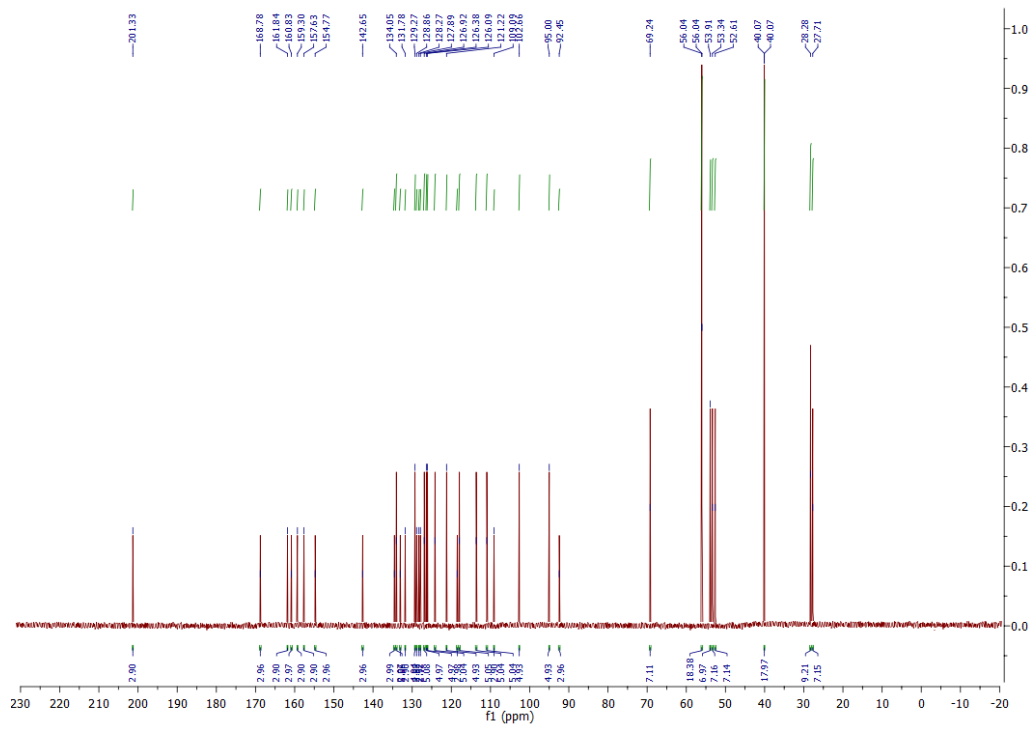
Слика ДМ77. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-SBE-4**.



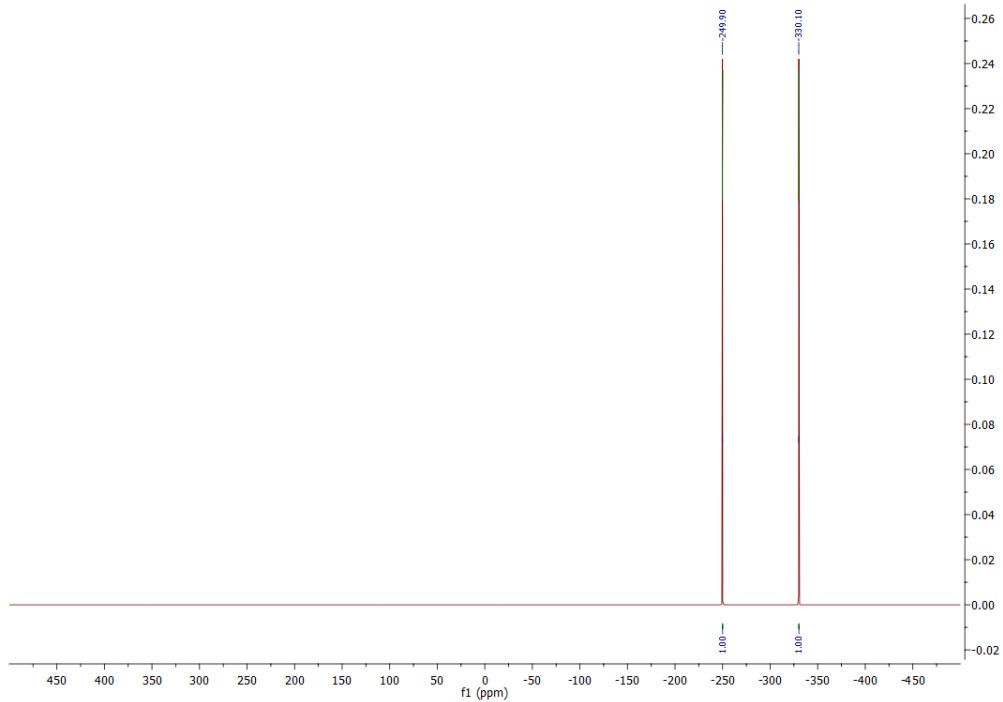
Слика ДМ78. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-SBE-4**.



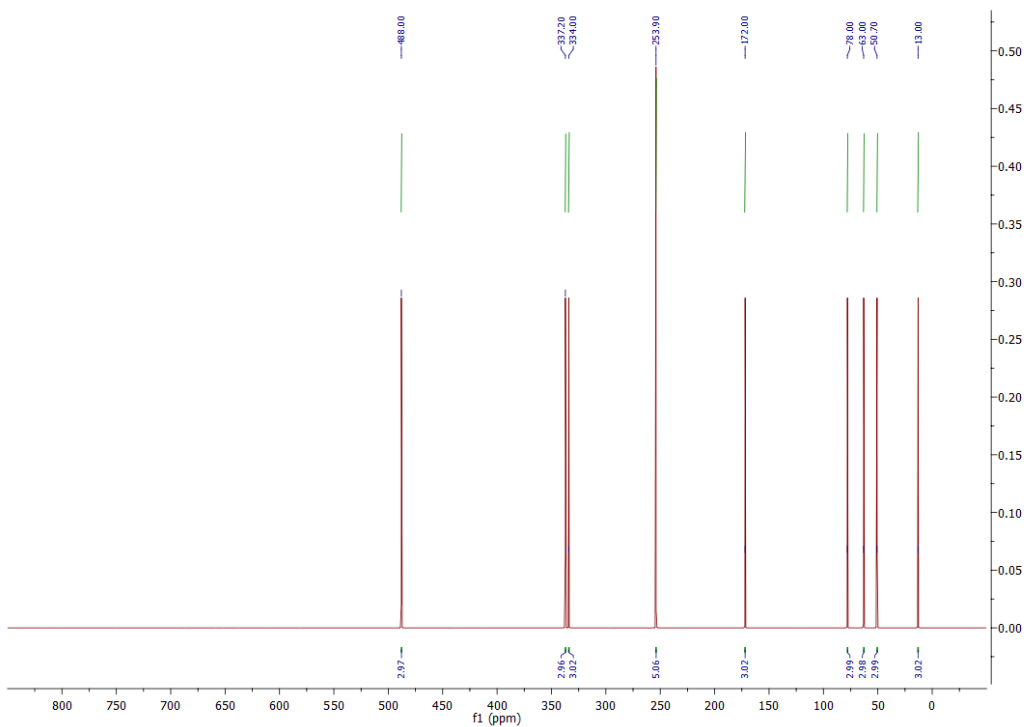
Слика ДМ79. ^1H NMR спектар једињења **Pro-SBE-5**.



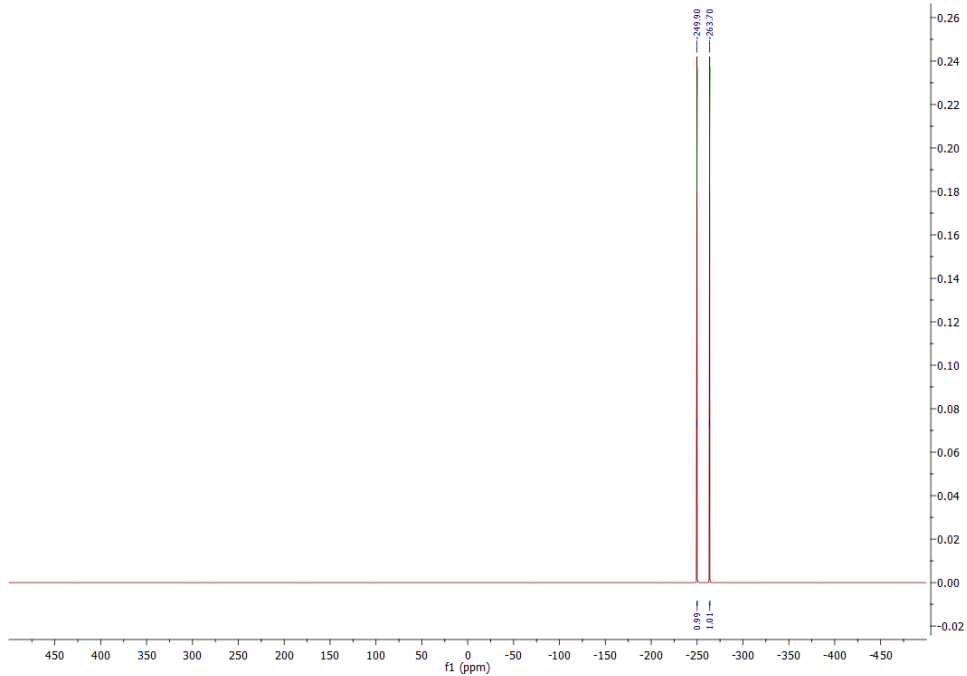
Слика ДМ80. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-SBE-5**.



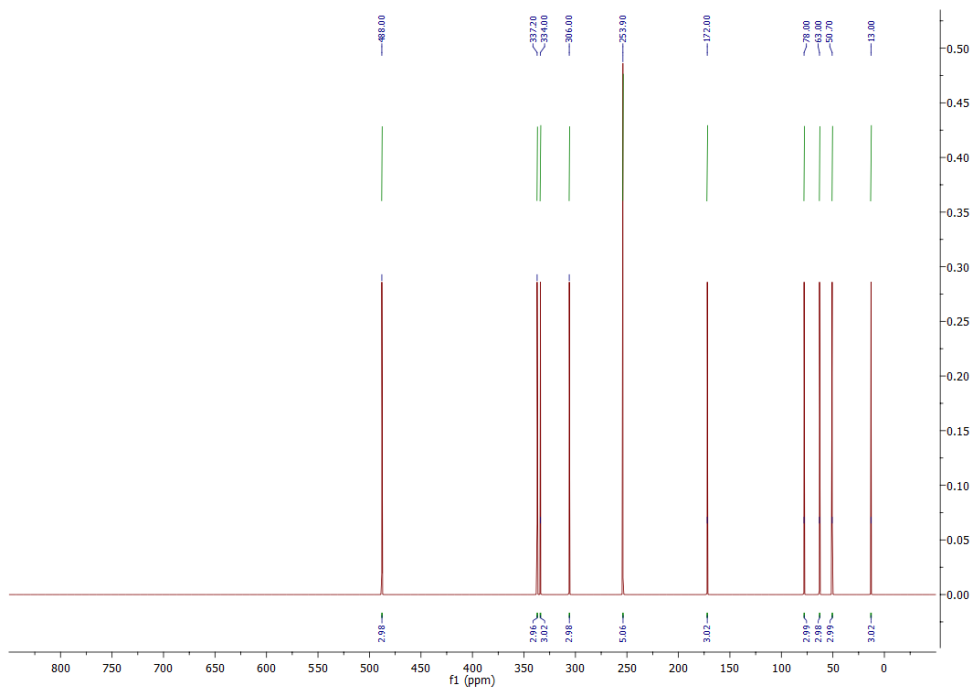
Слика ДМ81. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-CBE-5**.



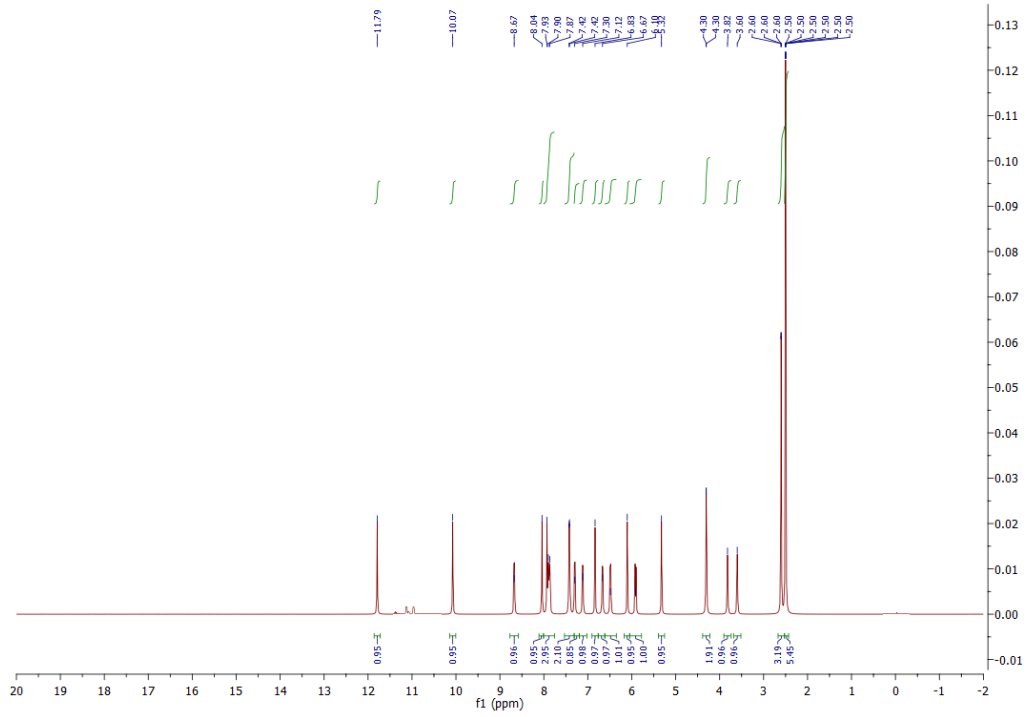
Слика ДМ82. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-CBE-5**.



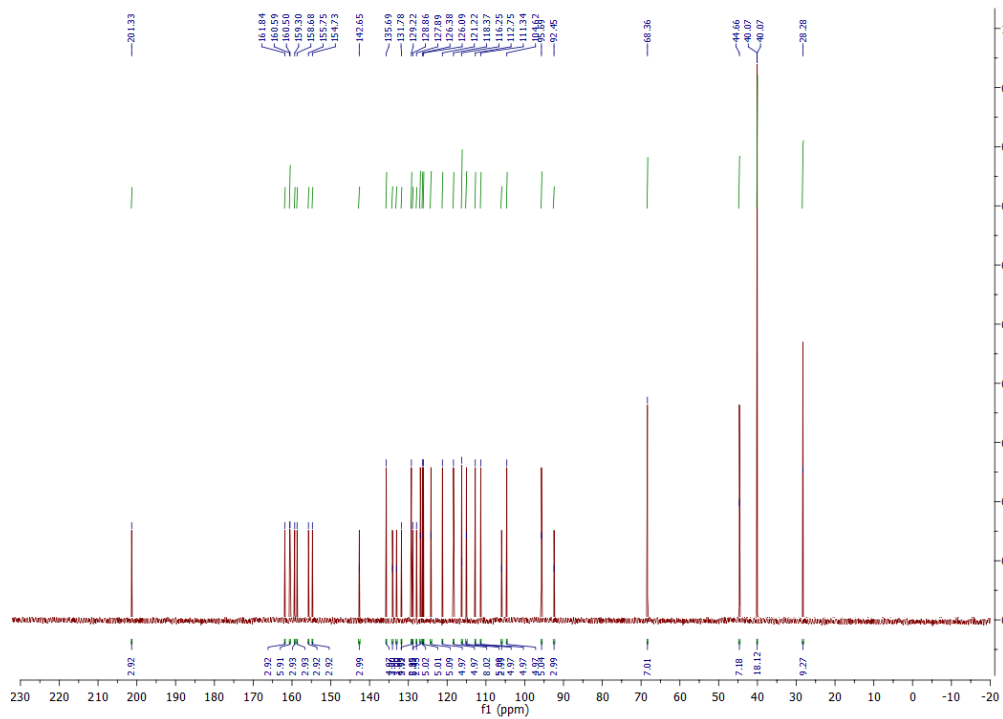
Слика ДМ85. ¹⁵N NMR спектар једињења **Pro-SBE-6**.



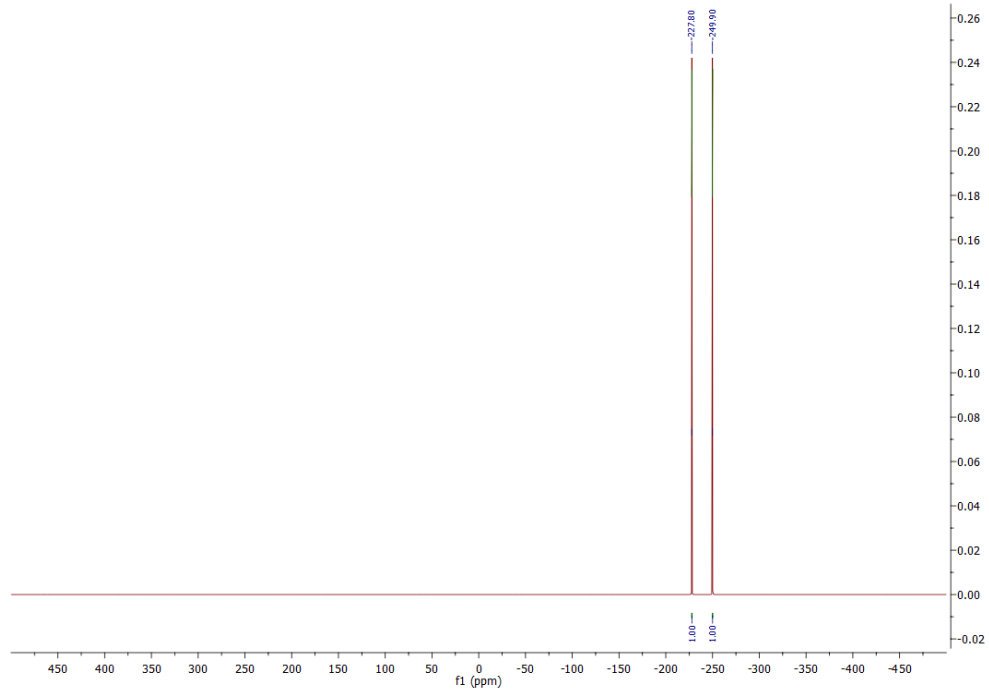
Слика ДМ86. ¹⁷O NMR спектар једињења **Pro-SBE-6**.



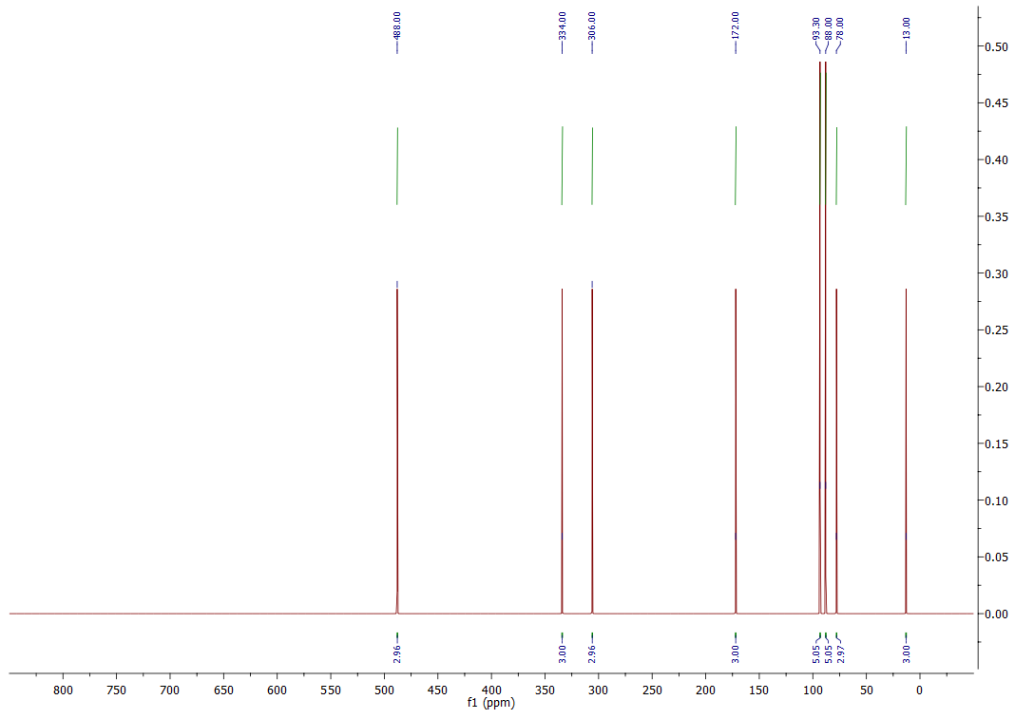
Слика ДМ87. ^1H NMR спектар једињења **СВЕ-1**.



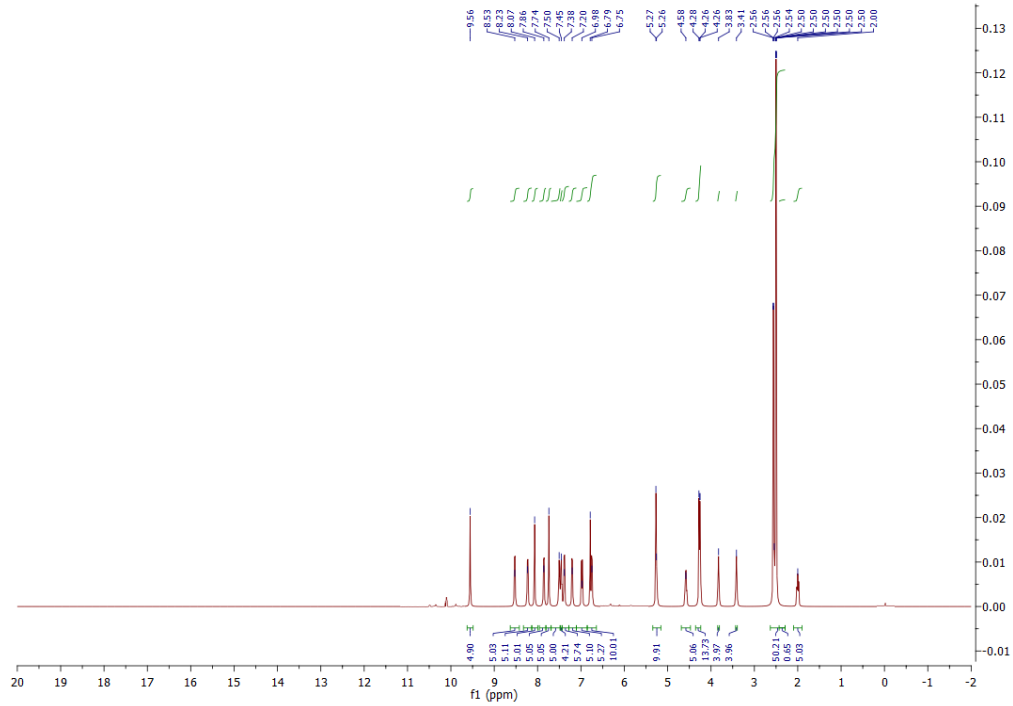
Слика ДМ88. ^{13}C NMR спектар једињења **СВЕ-1**.



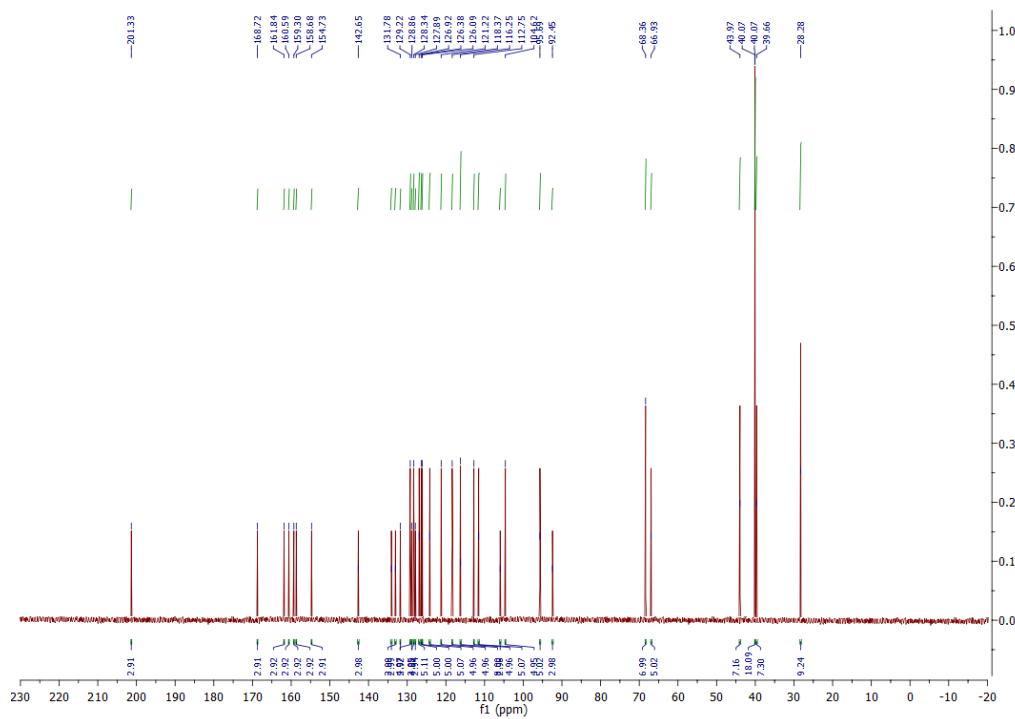
Слика ДМ89. ^{15}N NMR спектар једињења СВЕ-1.



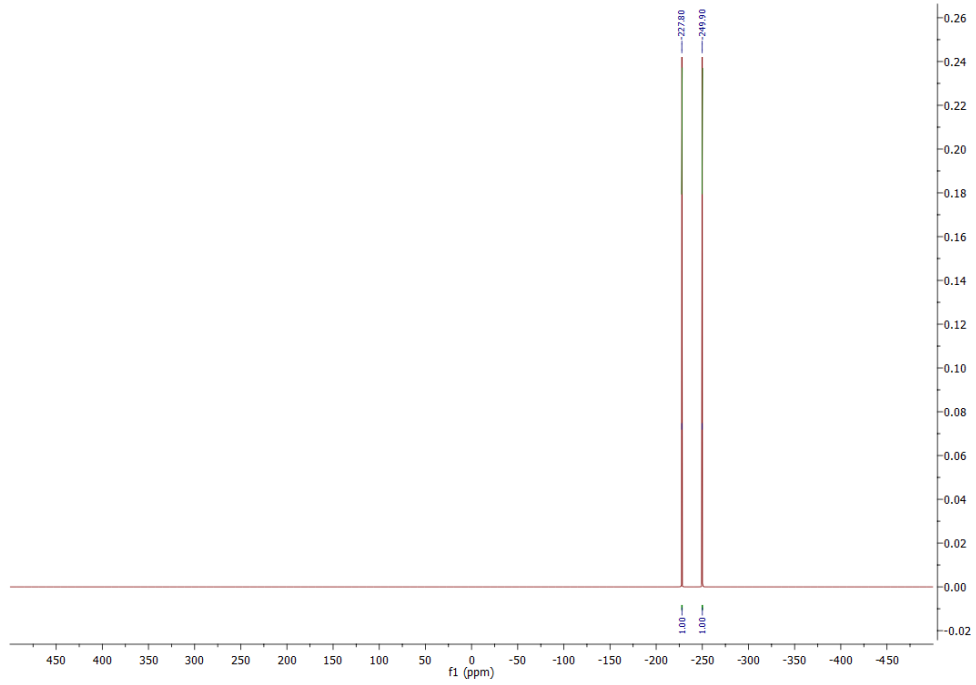
Слика ДМ90. ^{17}O NMR спектар једињења СВЕ-1.



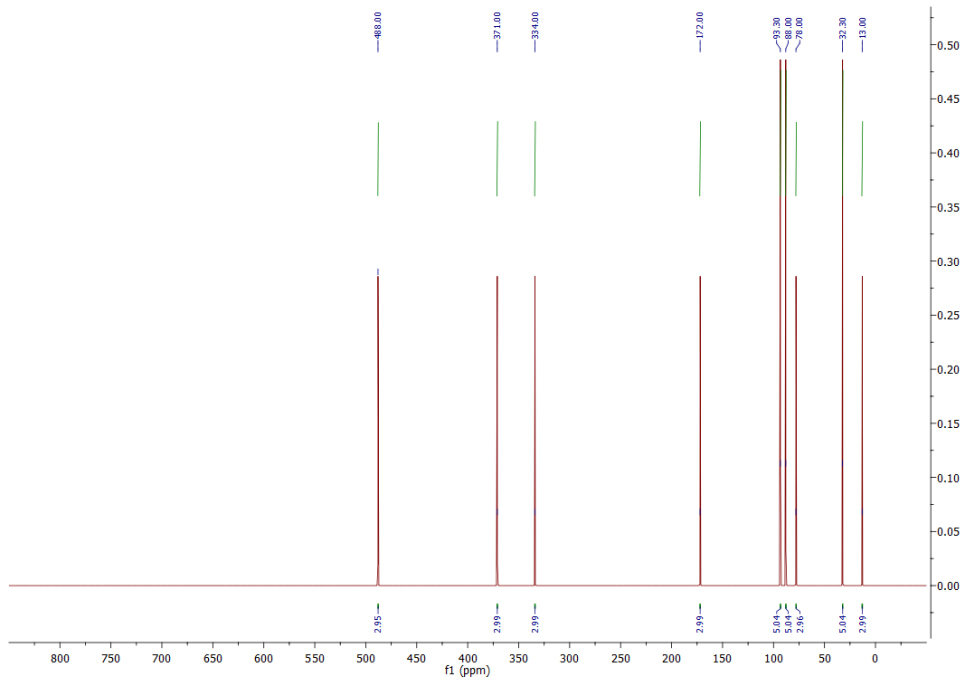
Слика ДМ91. ^1H NMR спектар једињења СВЕ-2.



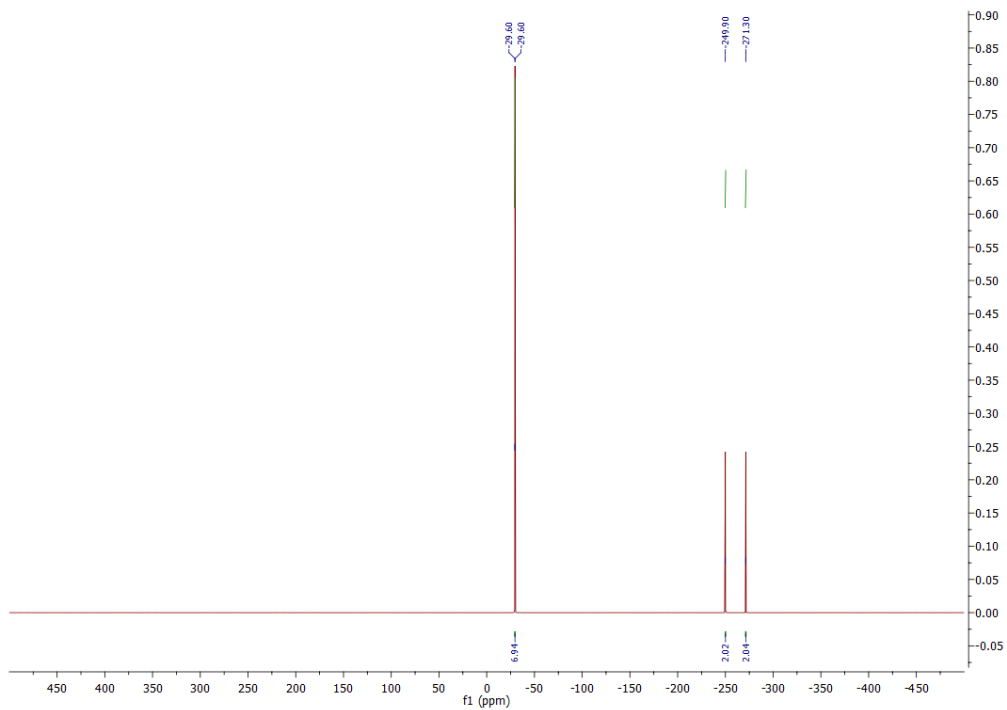
Слика ДМ92. ^{13}C NMR спектар једињења СВЕ-2.



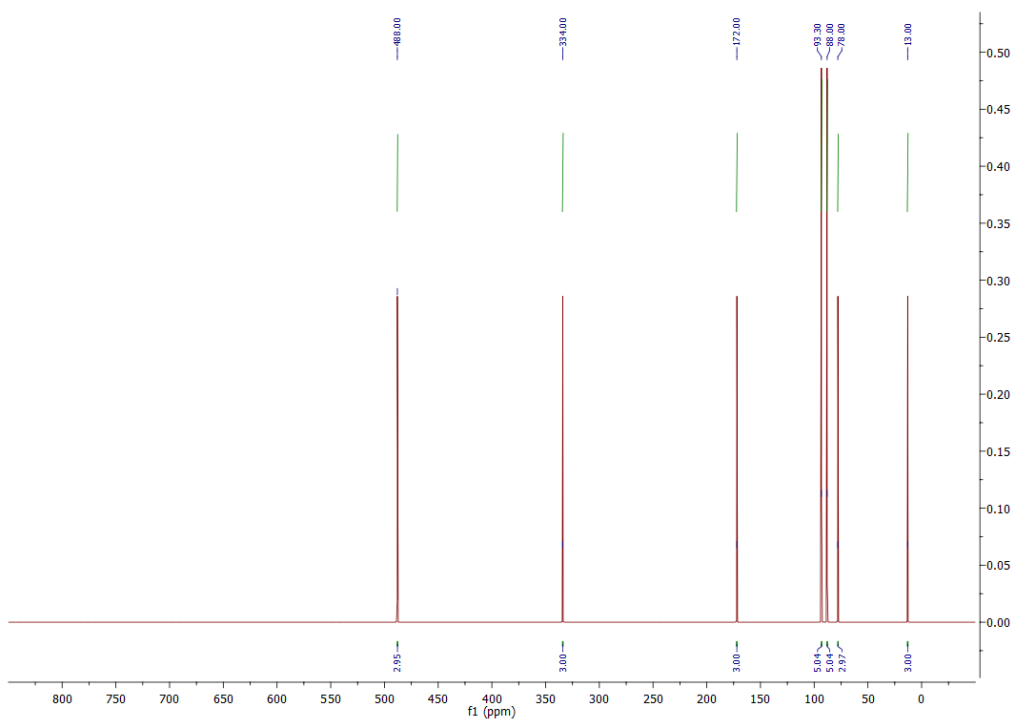
Слика ДМ93. ¹⁵N NMR спектар једињења **СВЕ-2**.



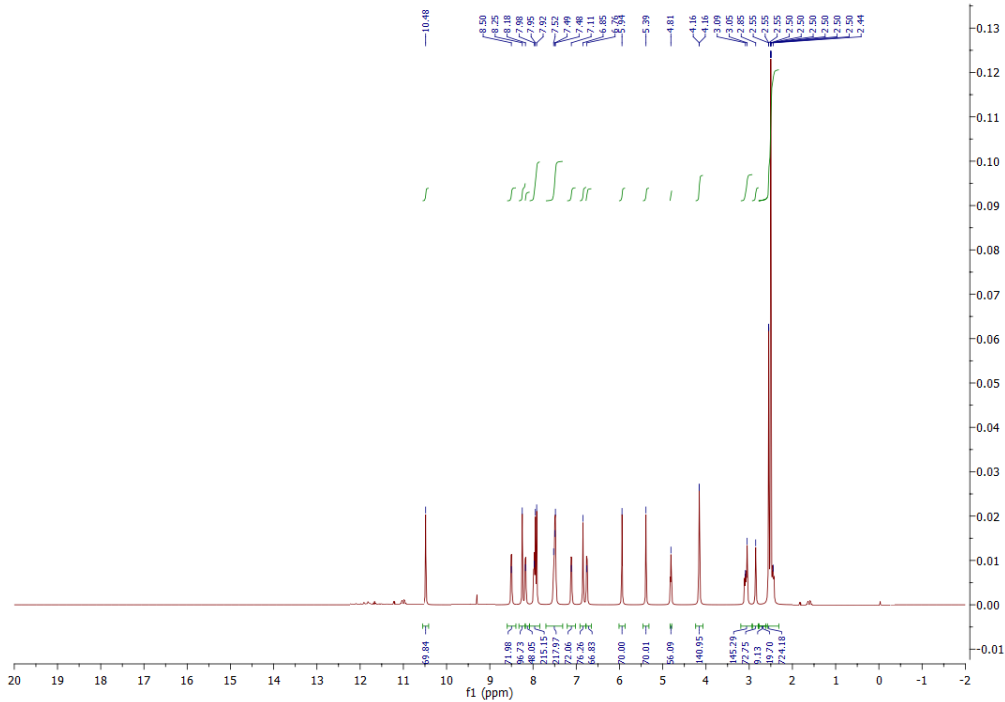
Слика ДМ94. ¹⁷O NMR спектар једињења **СВЕ-2**.



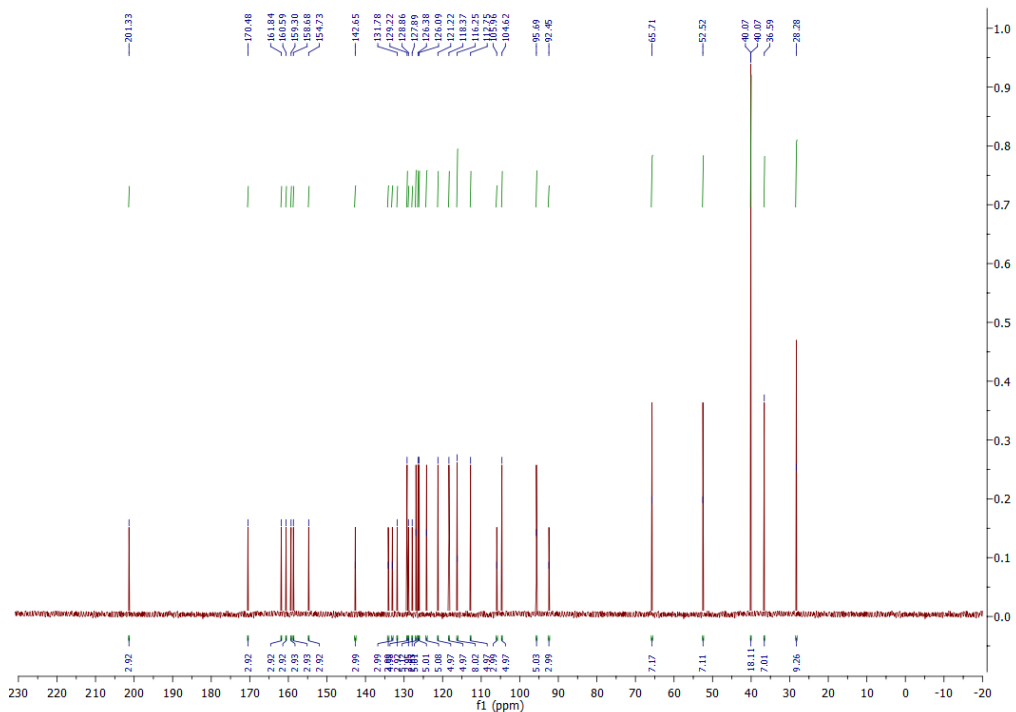
Слика ДМ97. ^{15}N NMR спектар једињења **СВЕ-3**.



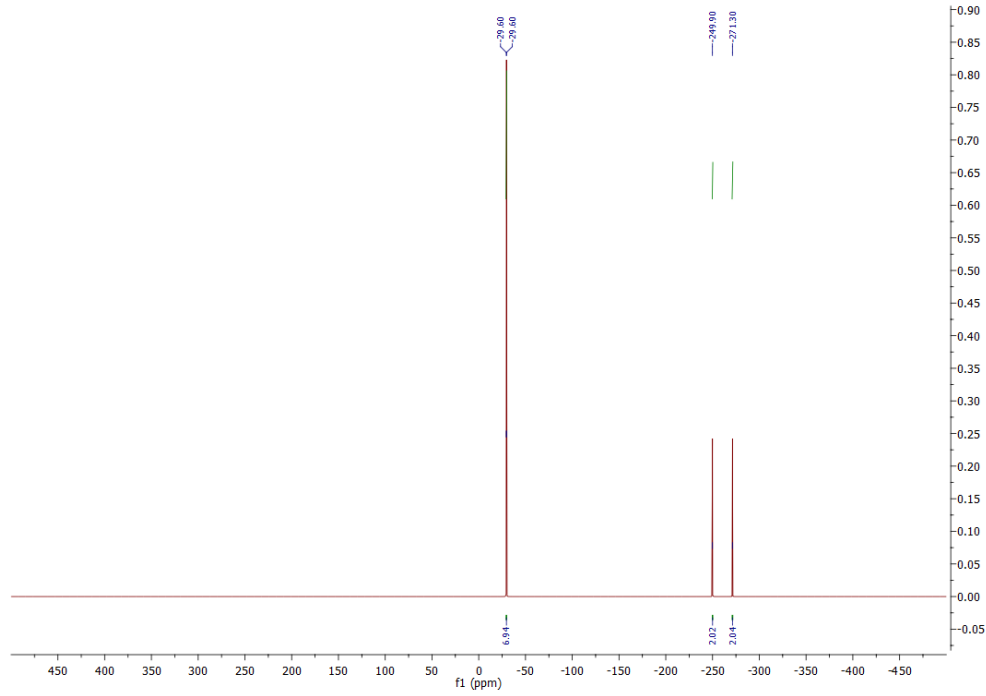
Слика ДМ98. ^{17}O NMR спектар једињења **СВЕ-3**.



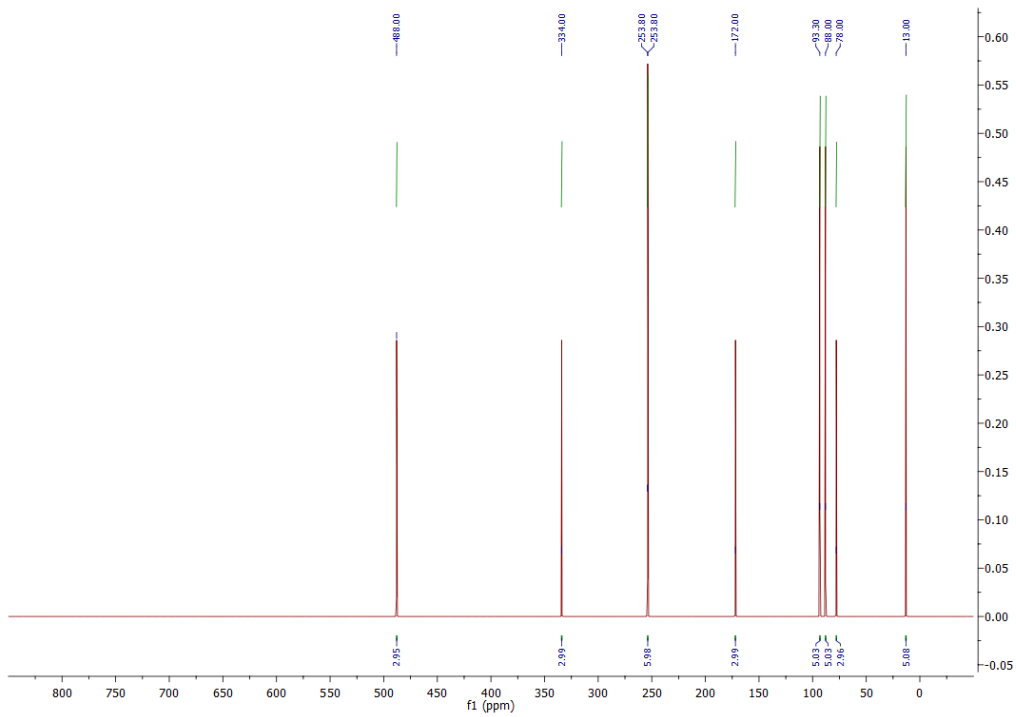
Слика ДМ99. ^1H NMR спектар једињења **СВЕ-4**.



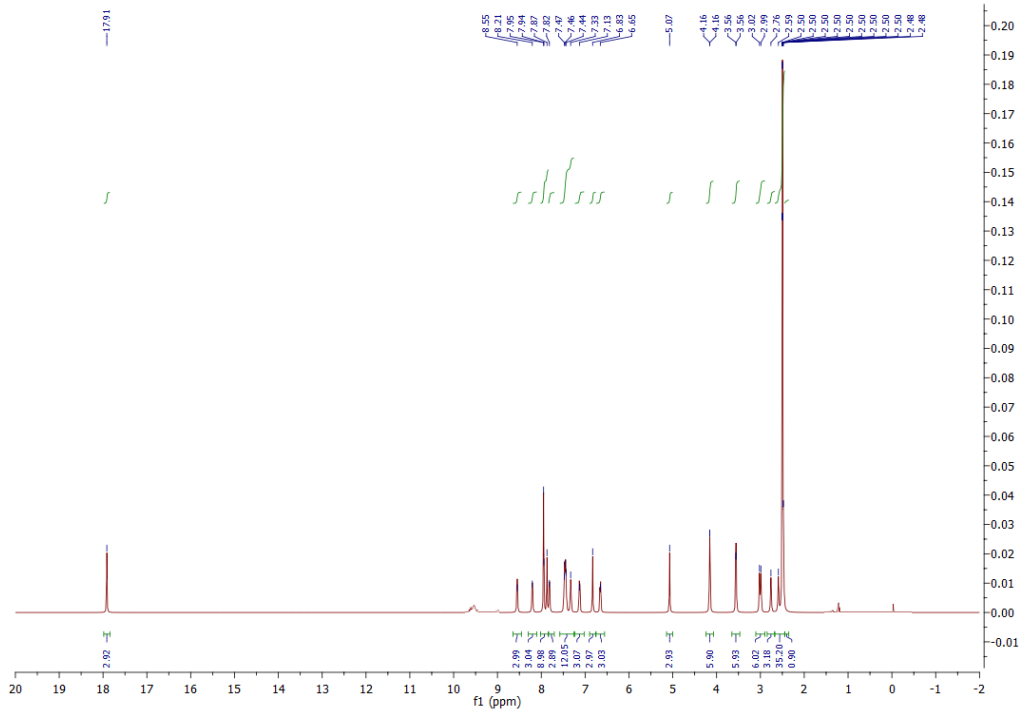
Слика ДМ100. ^{13}C NMR спектар једињења **СВЕ-4**.



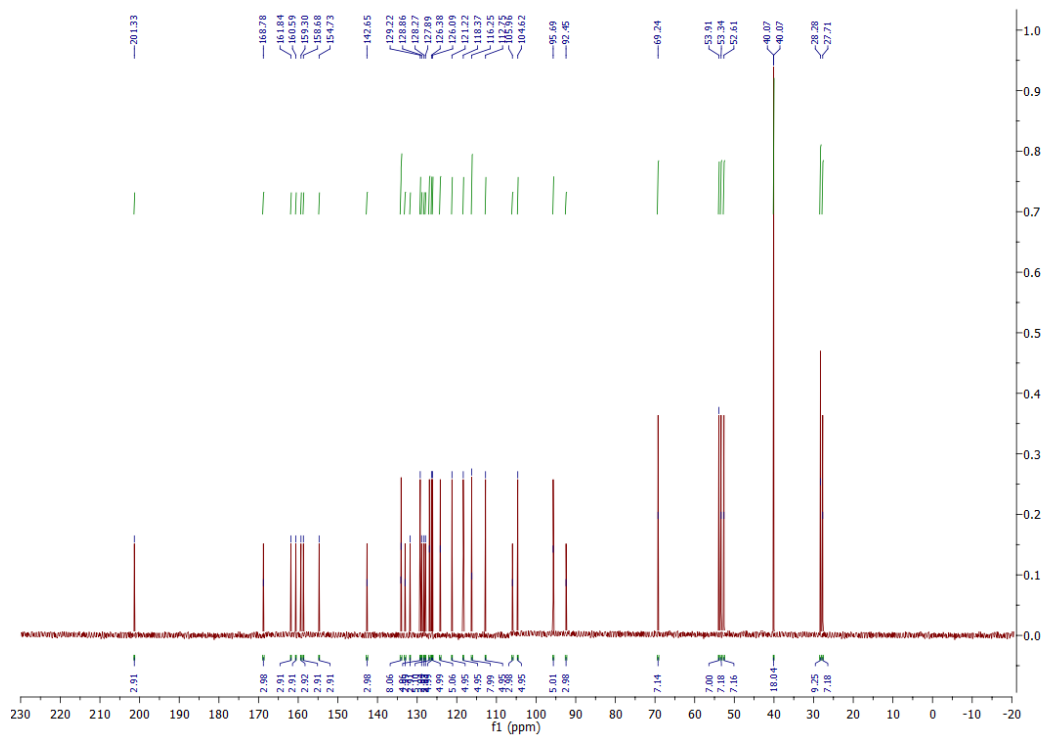
Слика ДМ101. ^{15}N NMR спектар једињења **СВЕ-4**.



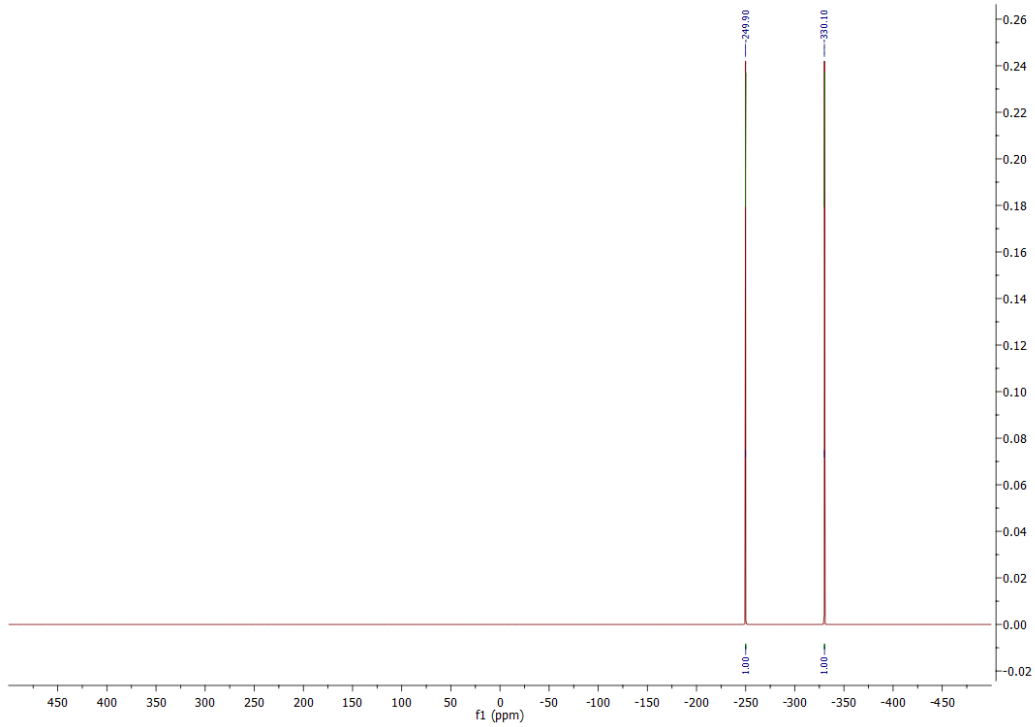
Слика ДМ102. ^{17}O NMR спектар једињења **СВЕ-4**.



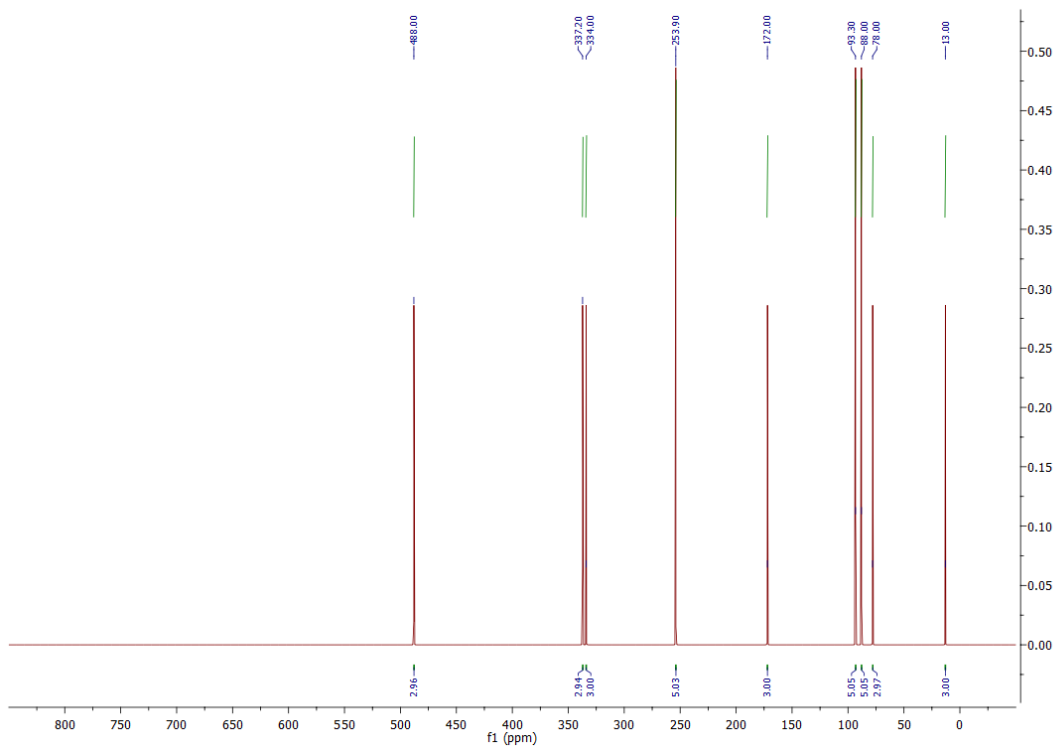
Слика ДМ103. ^1H NMR спектар једињења СВЕ-5.



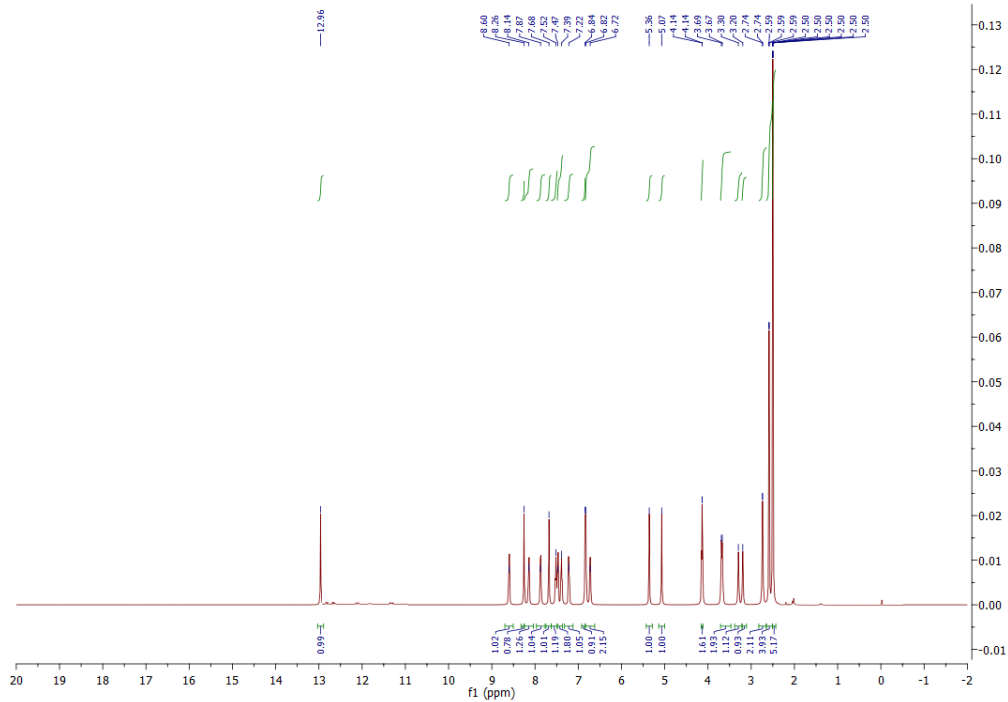
Слика ДМ104. ^{13}C NMR спектар једињења СВЕ-5.



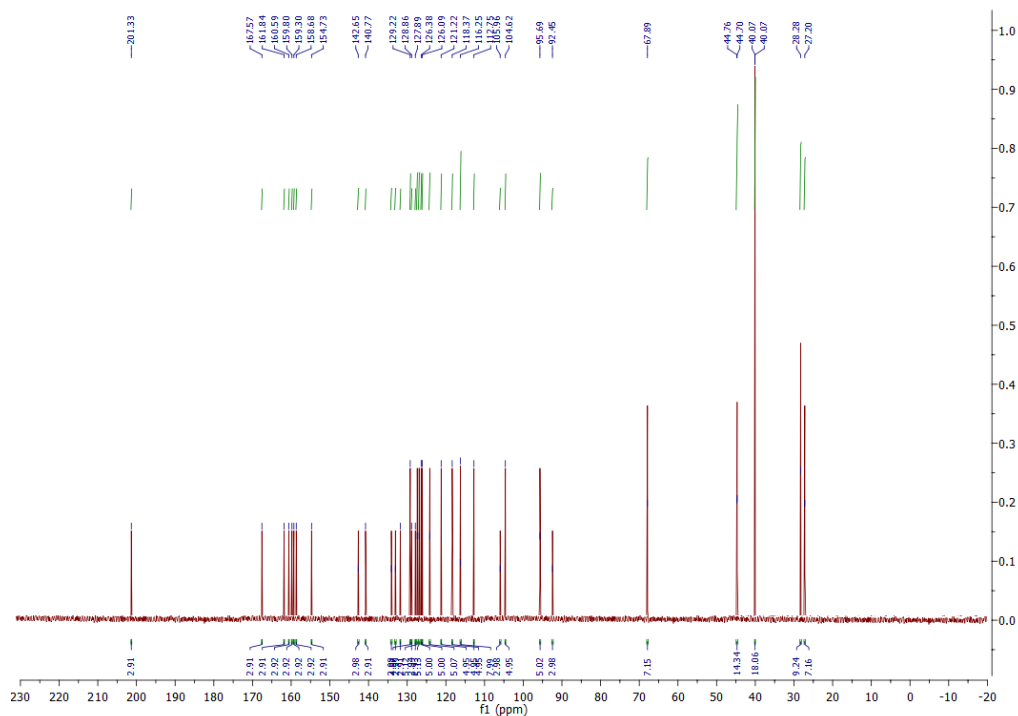
Слика ДМ105. ¹⁵N NMR спектар једињења **СВЕ-5**.



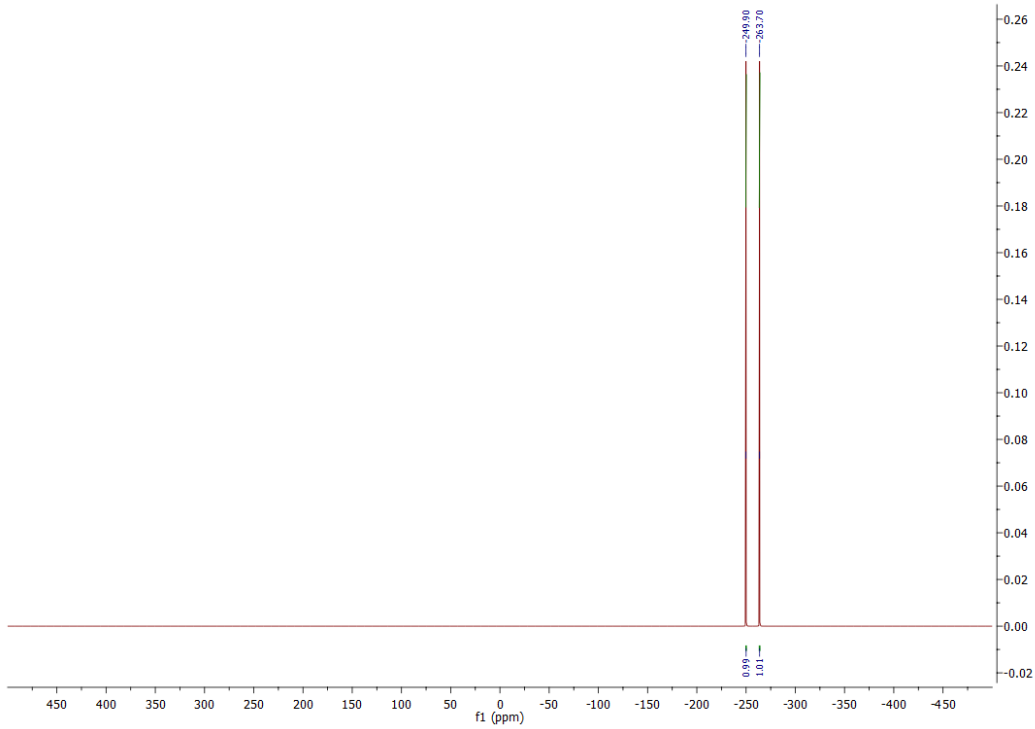
Слика ДМ106. ¹⁷O NMR спектар једињења **СВЕ-5**.



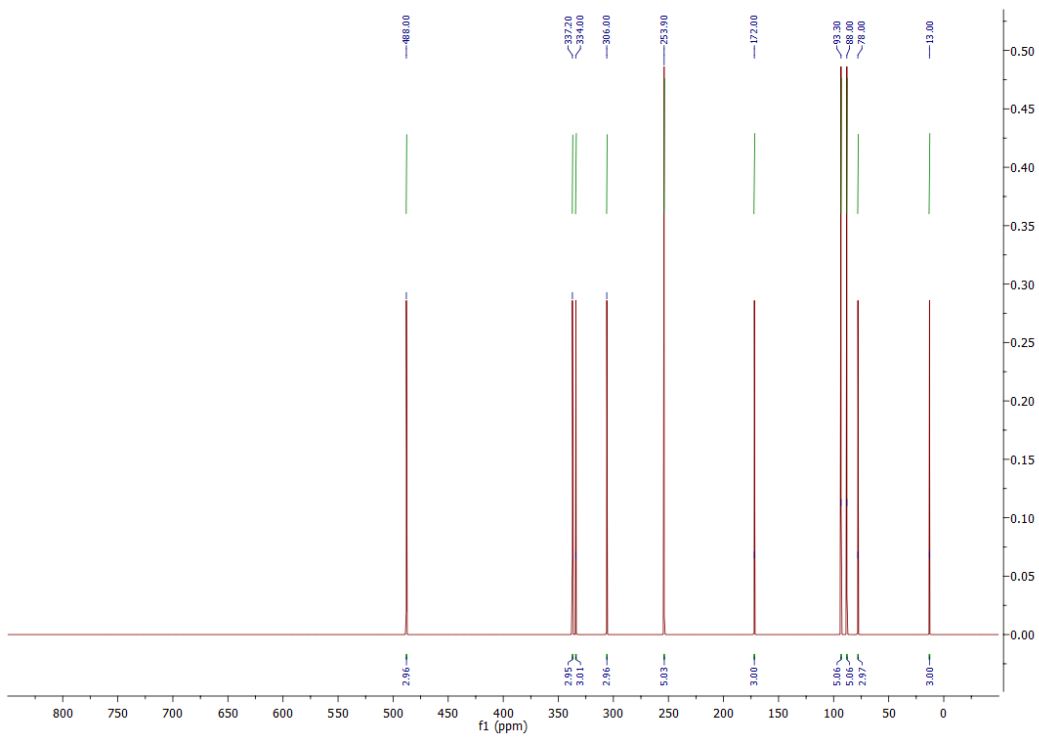
Слика ДМ107. ^1H NMR спектар једињења **СВЕ-6**.



Слика ДМ108. ^{13}C NMR спектар једињења **СВЕ-6**.



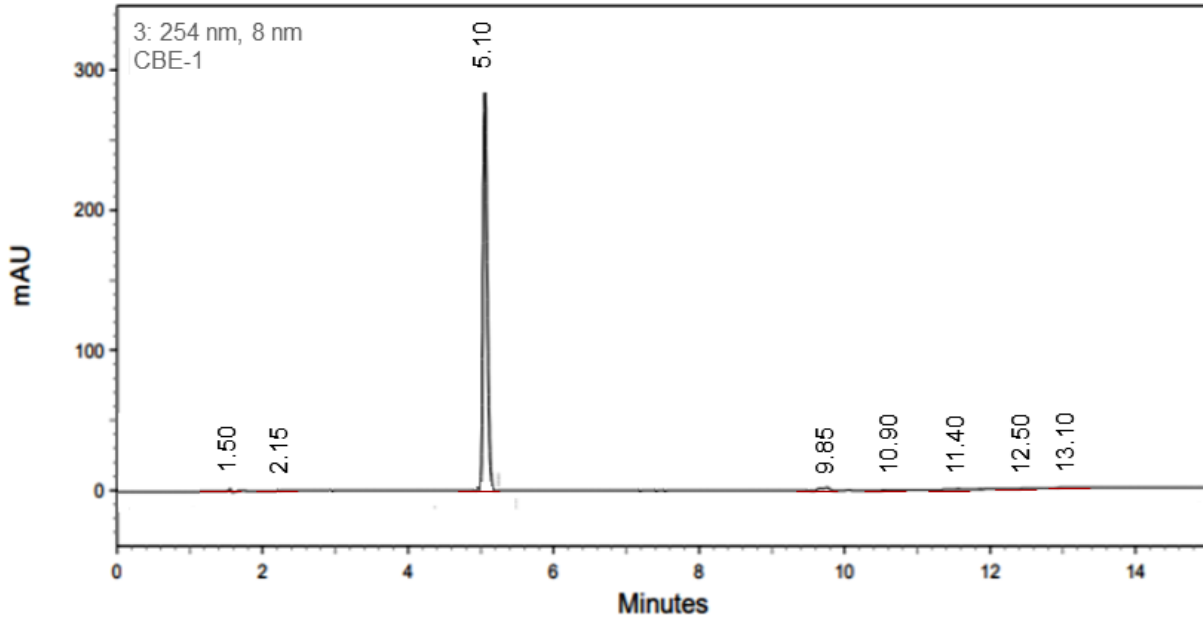
Слика ДМ109. ¹⁵N NMR спектар једињења СВЕ-6.



Слика ДМ110. ¹⁷O NMR спектар једињења СВЕ-6.

HPLC REPORT

Compound ID : CBE-1
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\October\CBE-1
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 10/11/2022/08:00:38



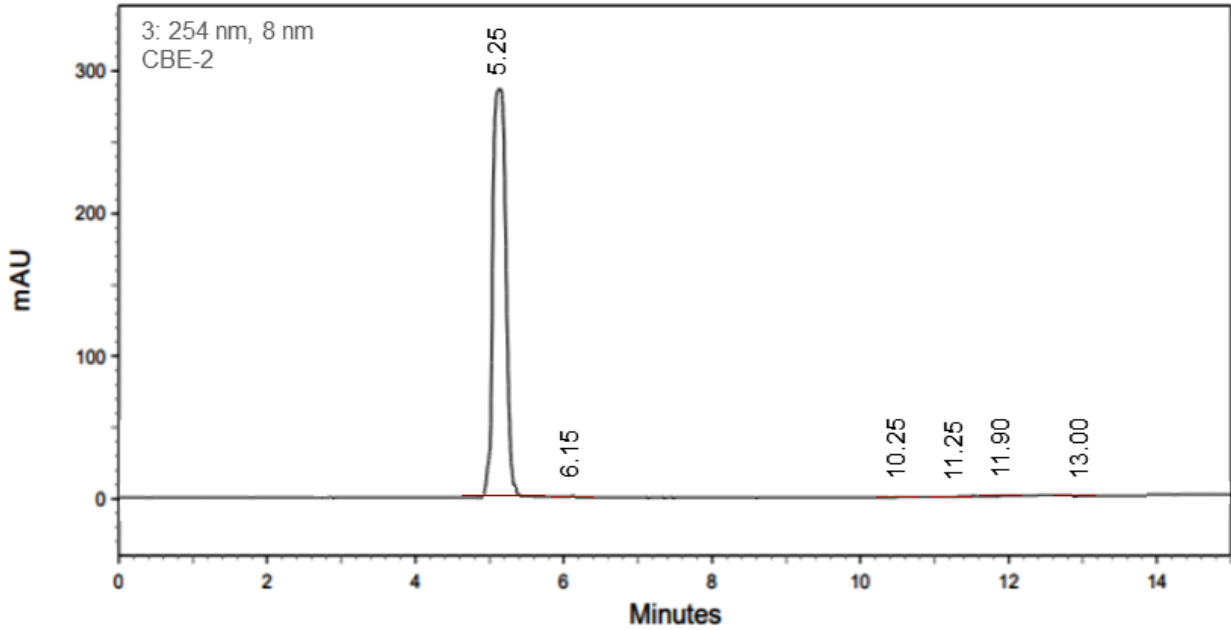
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.50	1954	5744	0.31
2.15	1746	5654	0.23
5.10	512481	1199854	98.43
9.85	1862	5586	0.32
10.90	1684	5333	0.21
11.40	1381	5165	0.22
12.50	1574	5312	0.28
13.10	1954	5376	0.21

Слика ДМ111. HPLC спектар једињења **СВЕ-1**.

HPLC REPORT

Compound ID : CBE-2
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\October\CBE-2
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 10/11/2022/08:20:11



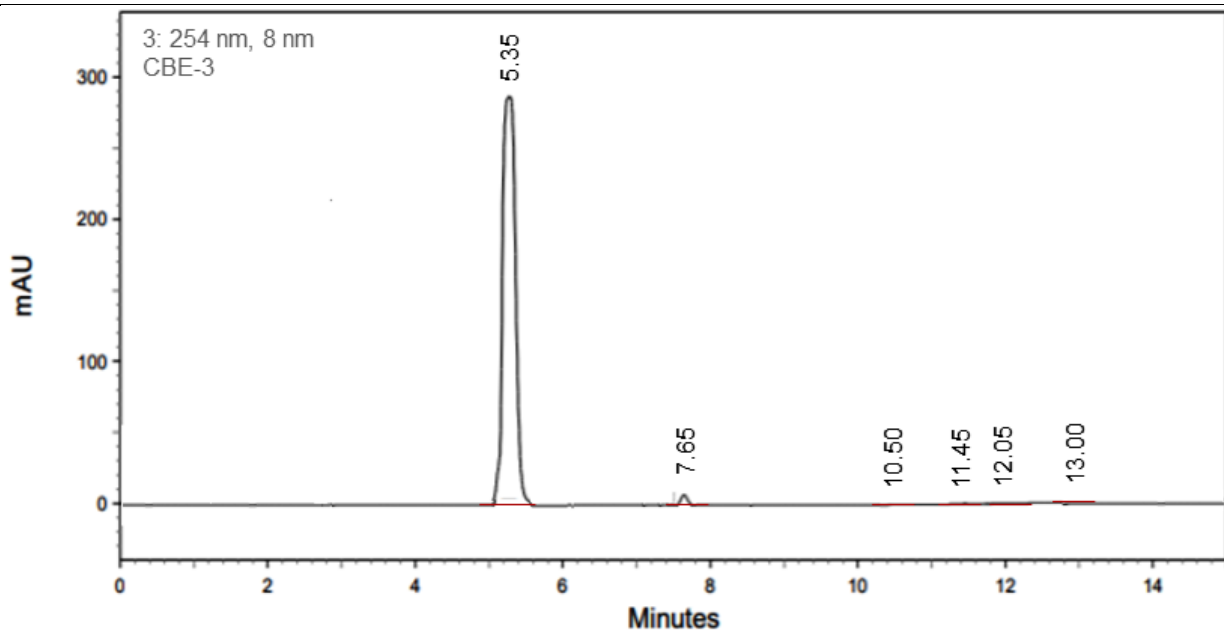
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
5.25	512324	1285463	98.35
6.15	1723	5324	0.61
10.25	1845	5432	0.27
11.25	1611	5432	0.28
11.90	1332	5133	0.22
13.00	1924	5134	0.28

Слика ДМ112. HPLC спектар једињења **СВЕ-2**.

HPLC REPORT

Compound ID : CBE-3
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\October\CBE-3
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 10/11/2022/08:40:37



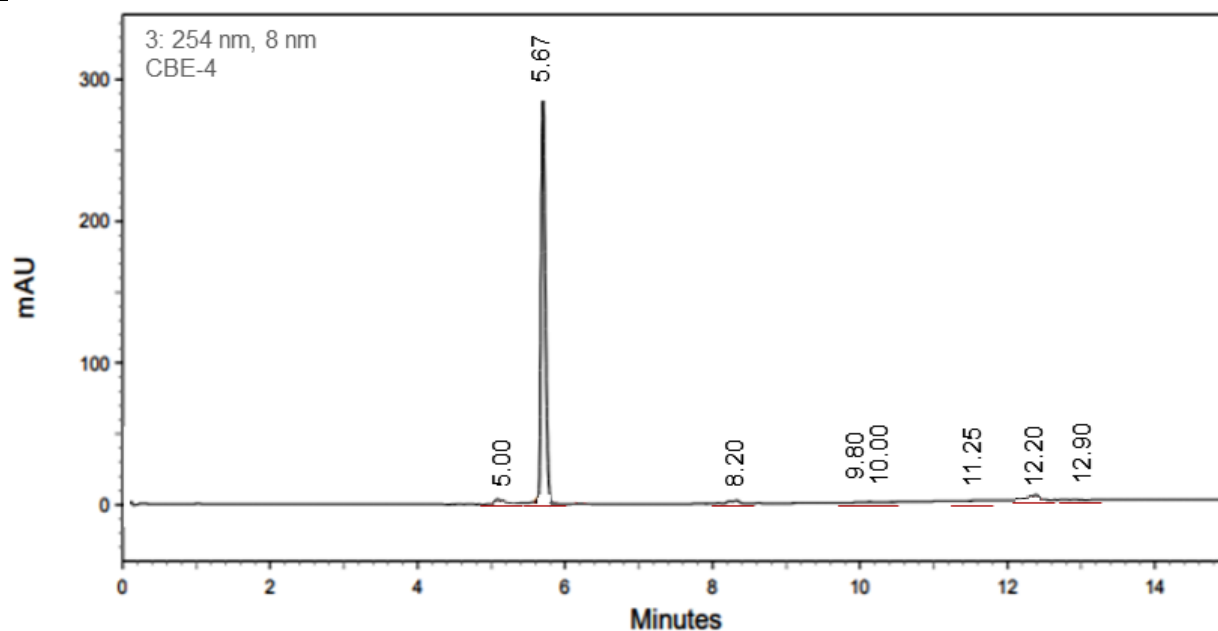
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
5.35	482659	1469532	98.80
7.65	1425	5265	0.21
10.50	1438	4521	0.24
11.45	1362	4365	0.17
12.05	1351	4597	0.22
13.00	1351	4457	0.36

Слика ДМ113. HPLC спектар једињења **СВЕ-3**.

HPLC REPORT

Compound ID : CBE-4
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\October\CBE-4
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 10/11/2022/09:02:34



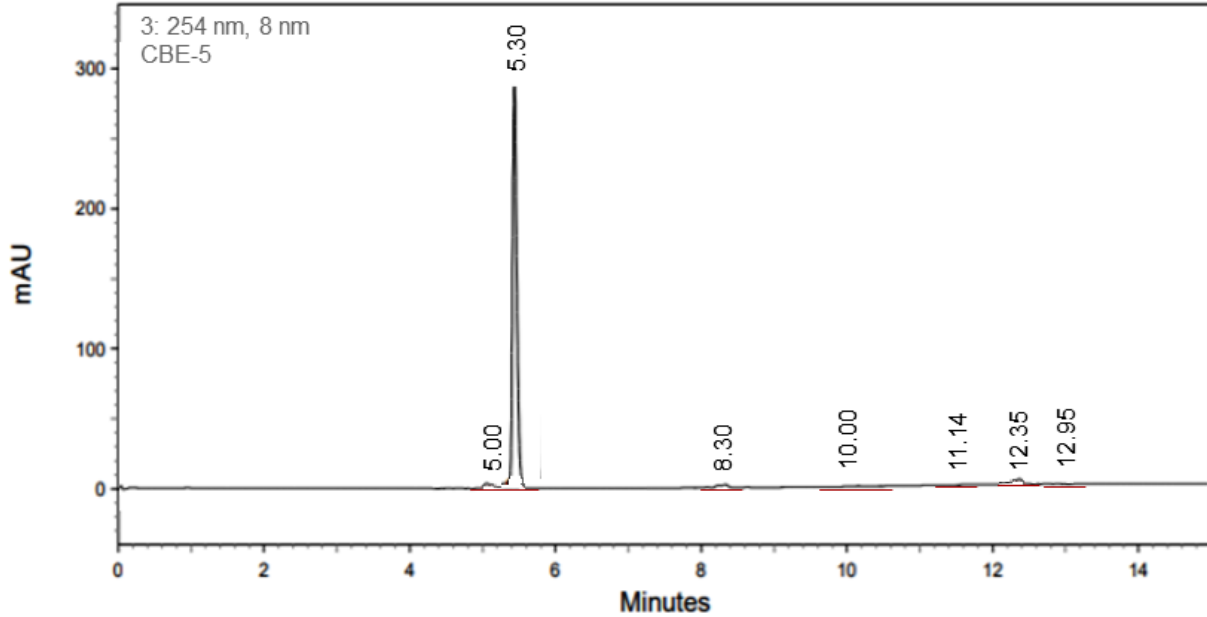
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
5.00	1756	5514	0.27
5.67	415235	1263518	97.45
8.20	2459	5512	0.56
9.80	1753	5556	0.34
10.00	1890	5666	0.31
11.26	1795	5895	0.35
12.20	1456	5235	0.32
12.90	1856	5845	0.27

Слика ДМ114. HPLC спектар једињења **СВЕ-4**.

HPLC REPORT

Compound ID : CBE-5
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\October\CBE-5
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 10/11/2022/09:30:11



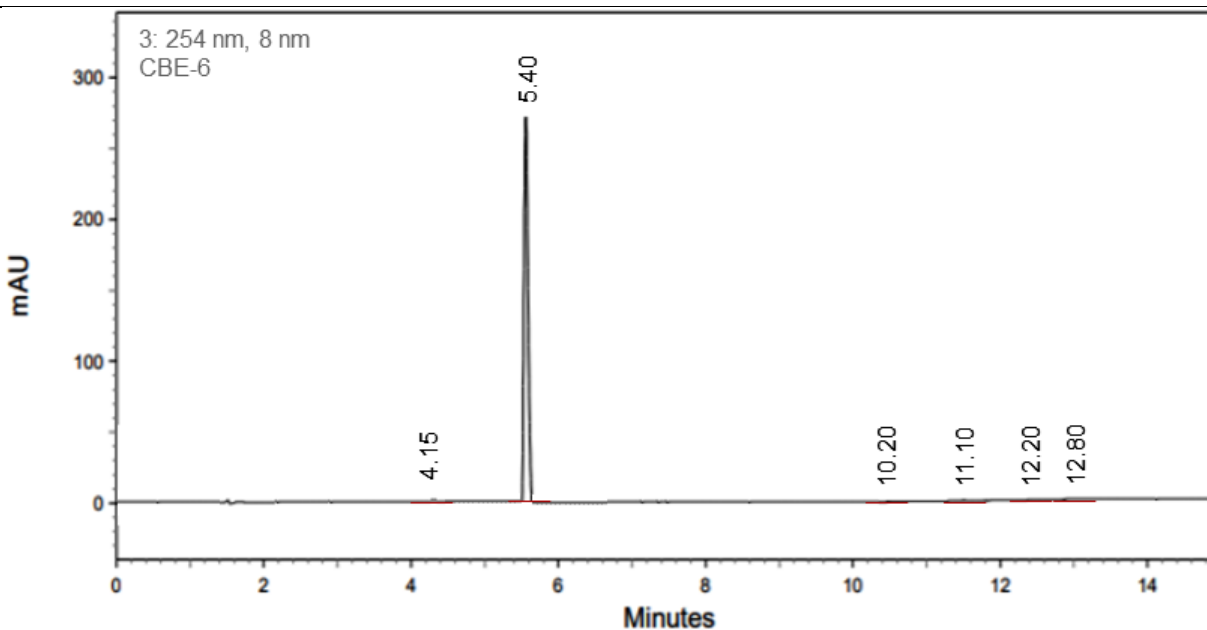
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
5.00	1186	4952	0.18
5.30	496235	1562951	98.78
8.30	1235	4956	0.15
10.00	1541	5523	0.14
11.14	1581	5874	0.26
12.35	1325	5265	0.31
12.95	1854	5652	0.18

Слика ДМ115. HPLC спектар једињења **СВЕ-5**

HPLC REPORT

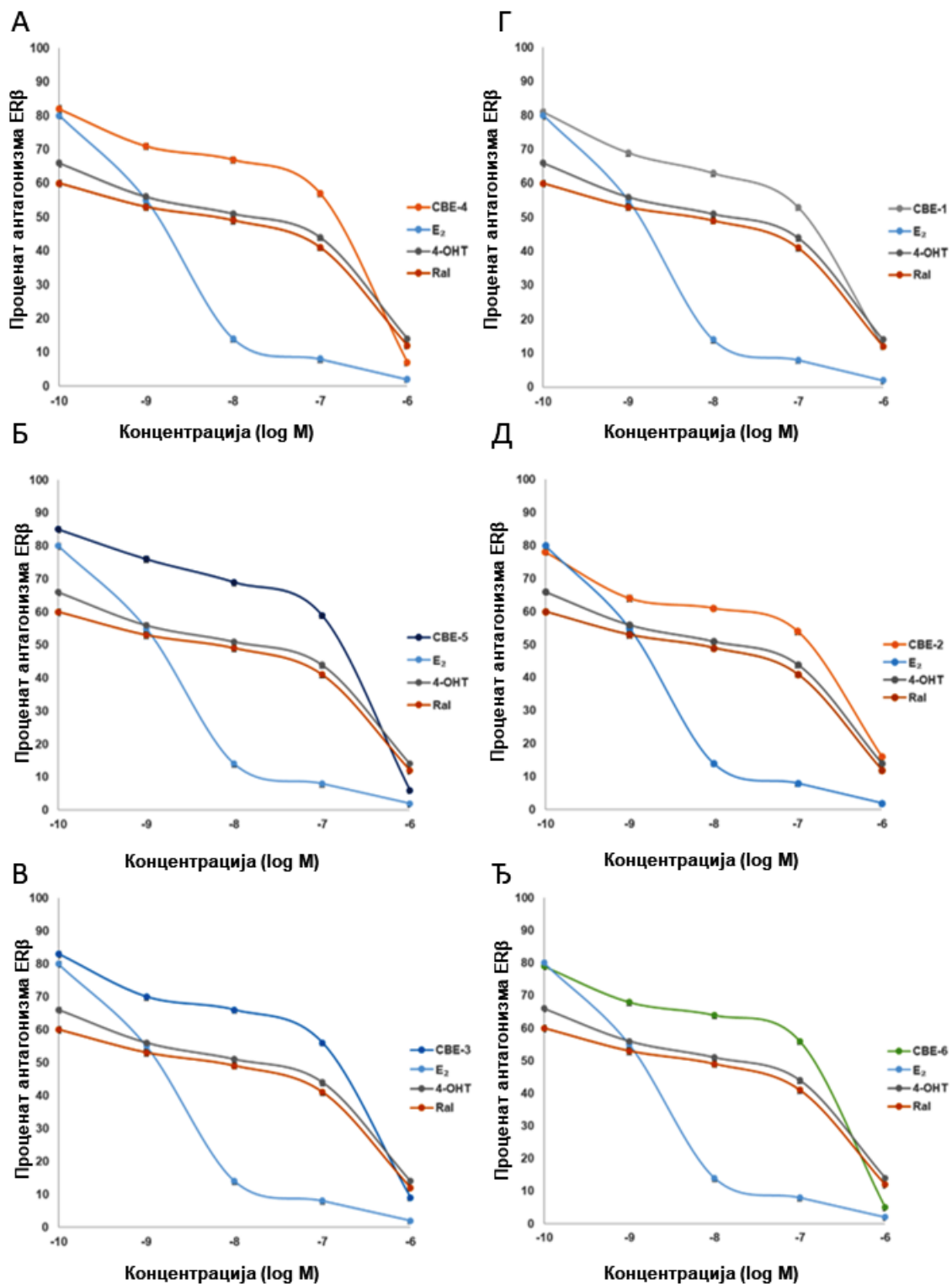
Compound ID : CBE-6
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\October\CBE-6
Method Name : D:\method\2021\MILAN.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 10/11/2022/09:52:35



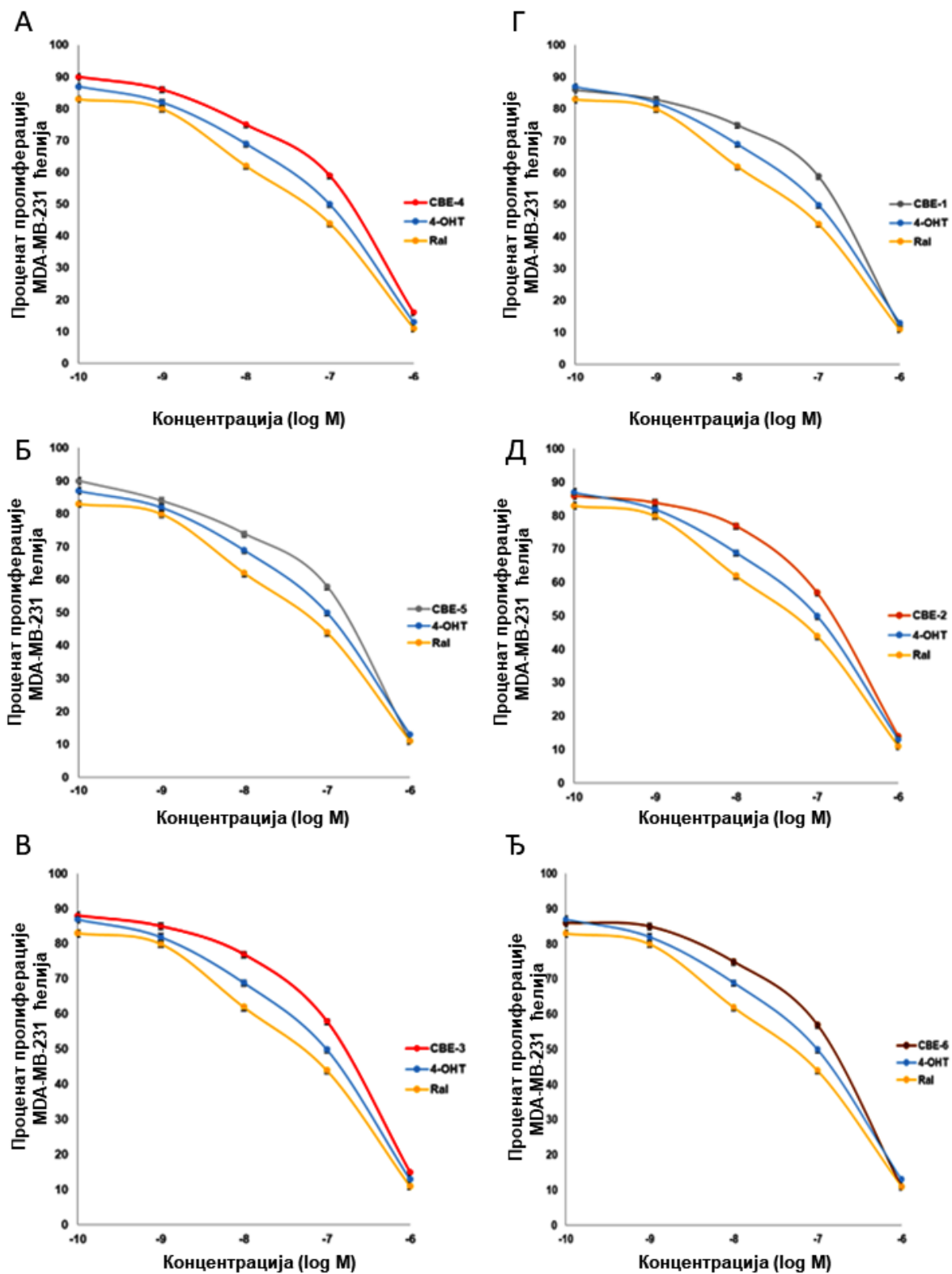
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
4.15	2658	5621	0.24
5.40	495626	1569512	98.86
10.20	1894	5568	0.26
11.10	1523	5523	0.22
12.20	1265	5495	0.23
13.80	1459	5591	0.19

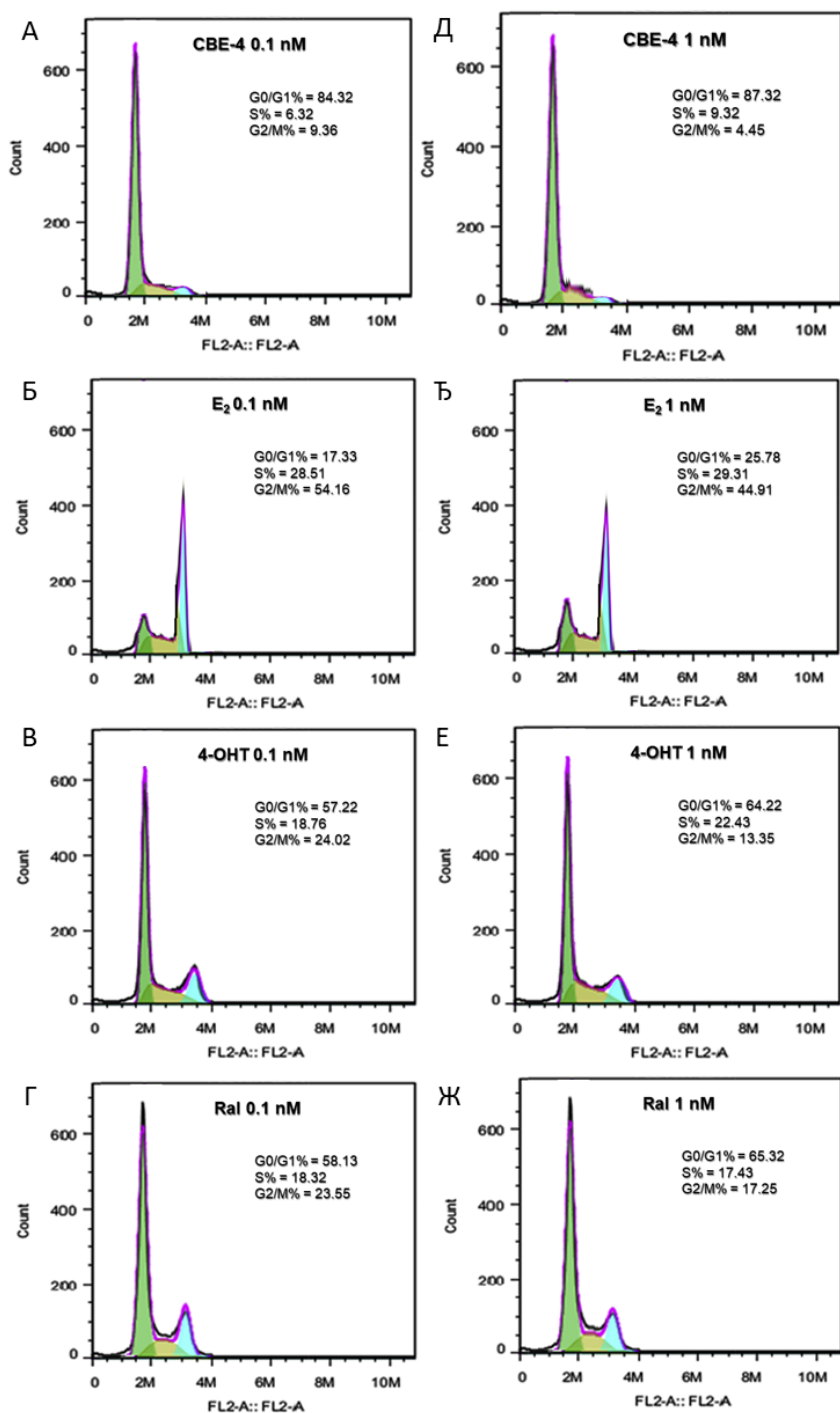
Слика ДМ116. HPLC спектар једињења **СВЕ-6**.



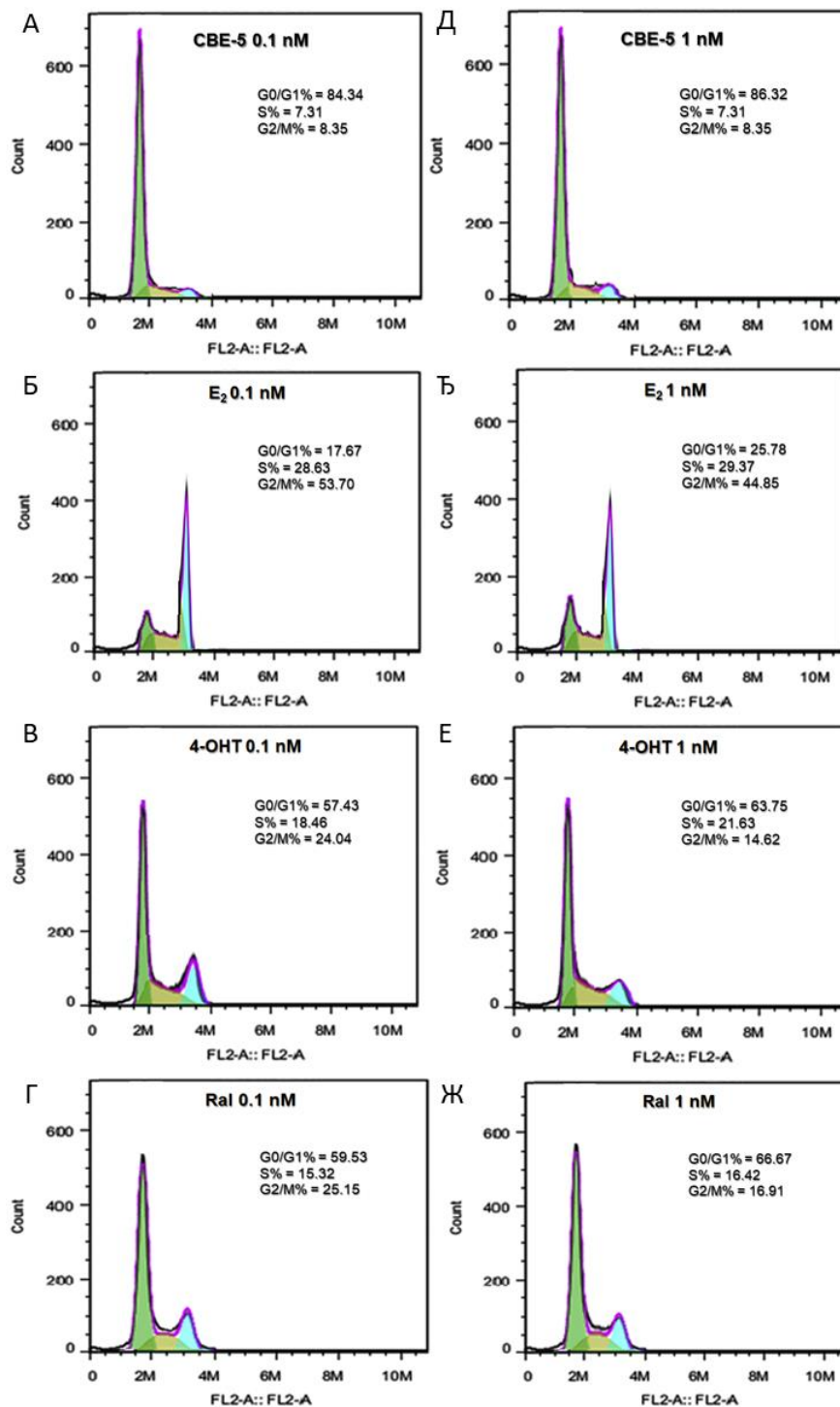
Слика ДМ117. Антагонизам естроген репептора β у присуству СВЕ-4 (А); СВЕ-5 (Б); СВЕ-3 (В); СВЕ-1 (Г); СВЕ-2 (Д); СВЕ-6 (Ђ).



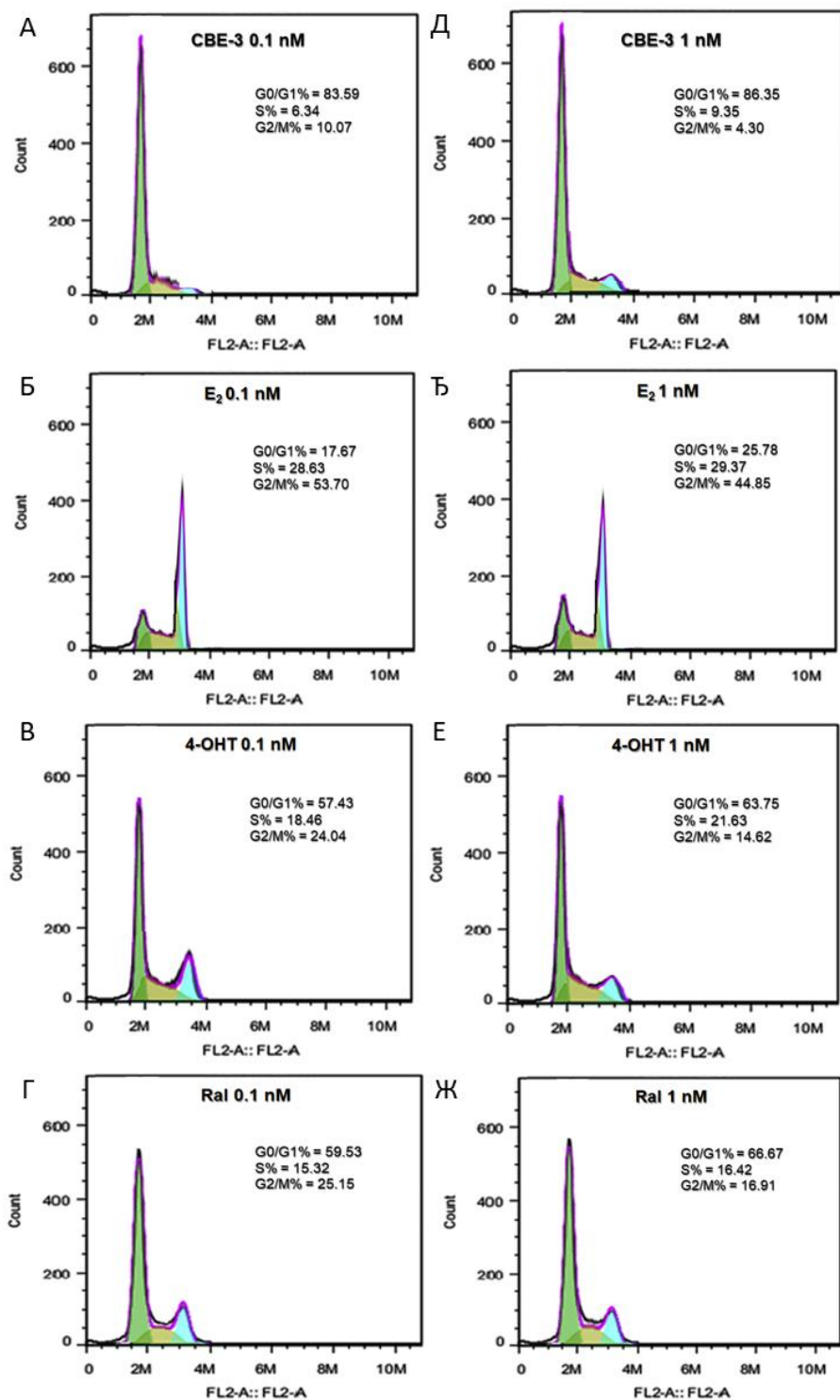
Слика ДМ118. Антипролиферативна активност **СВЕ-4** (А); **СВЕ-5** (Б); **СВЕ-3** (В); **СВЕ-1** (Г); **СВЕ-2** (Д); **СВЕ-6** (Ѕ) против MDA-MB-231 ћелијских линија.



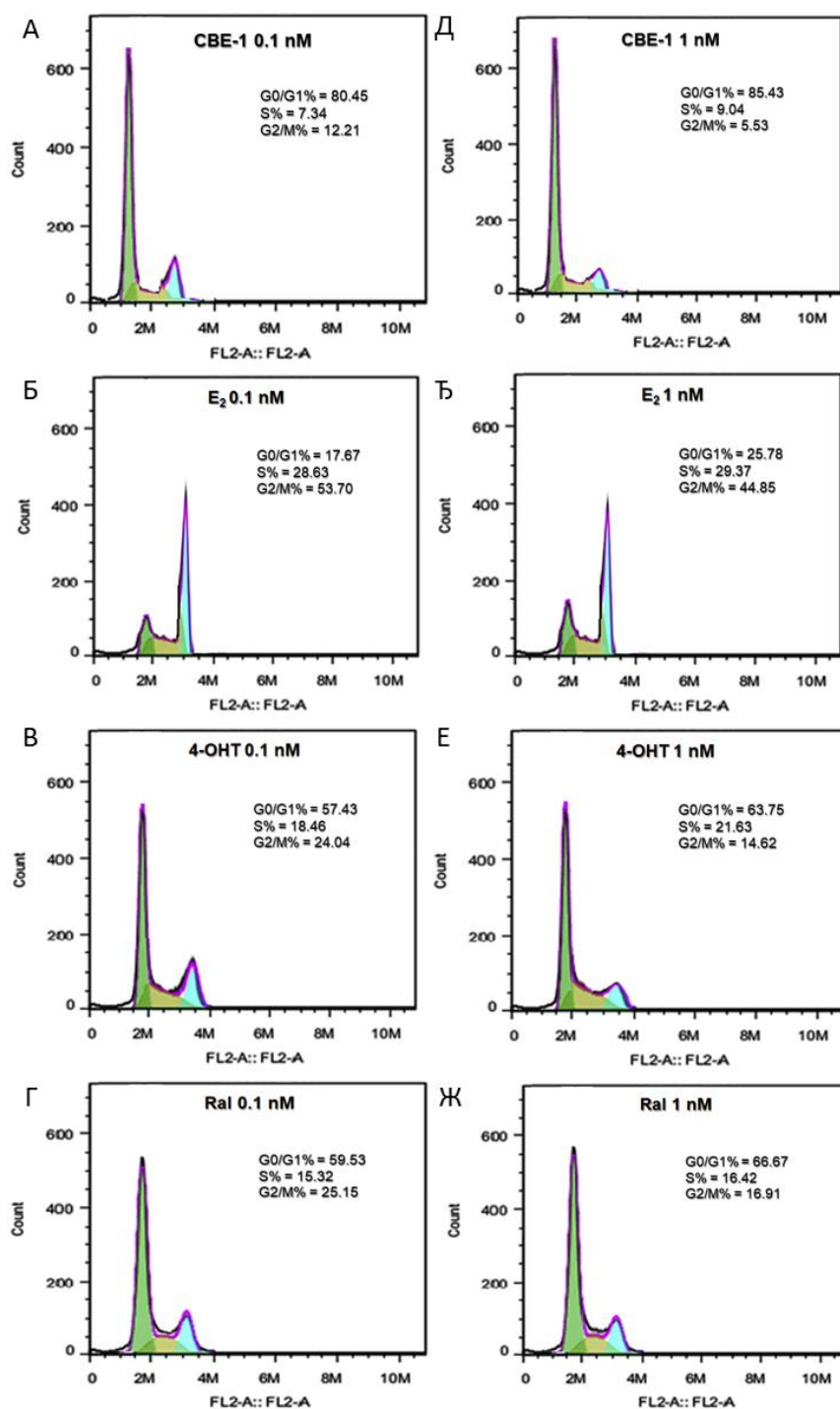
Слика ДМ119. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **CBE-4** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **CBE-4** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Е); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



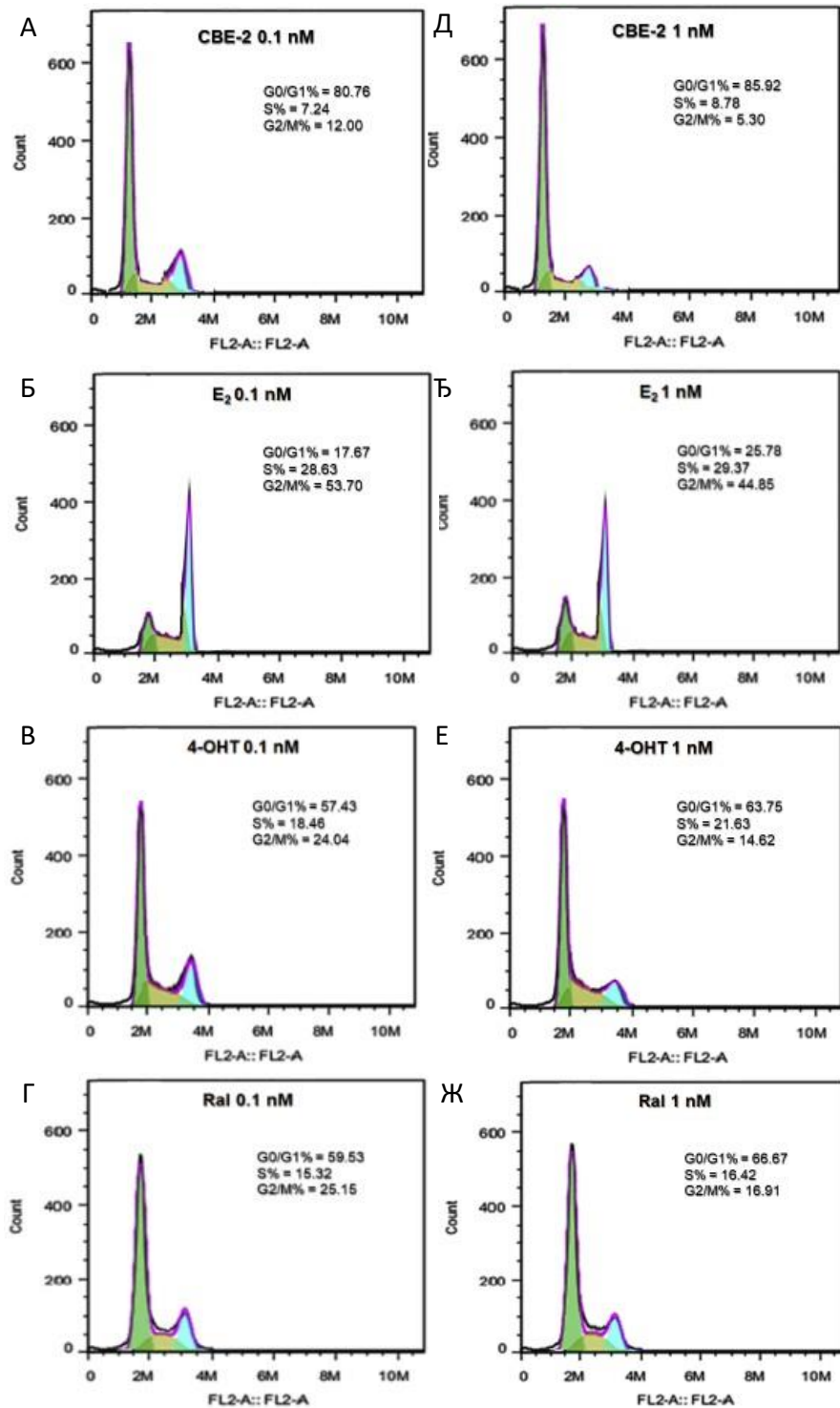
Слика ДМ120. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **CBE-5** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (С); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Д); **CBE-5** у концентрацији од 1 nM (Е); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Г); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



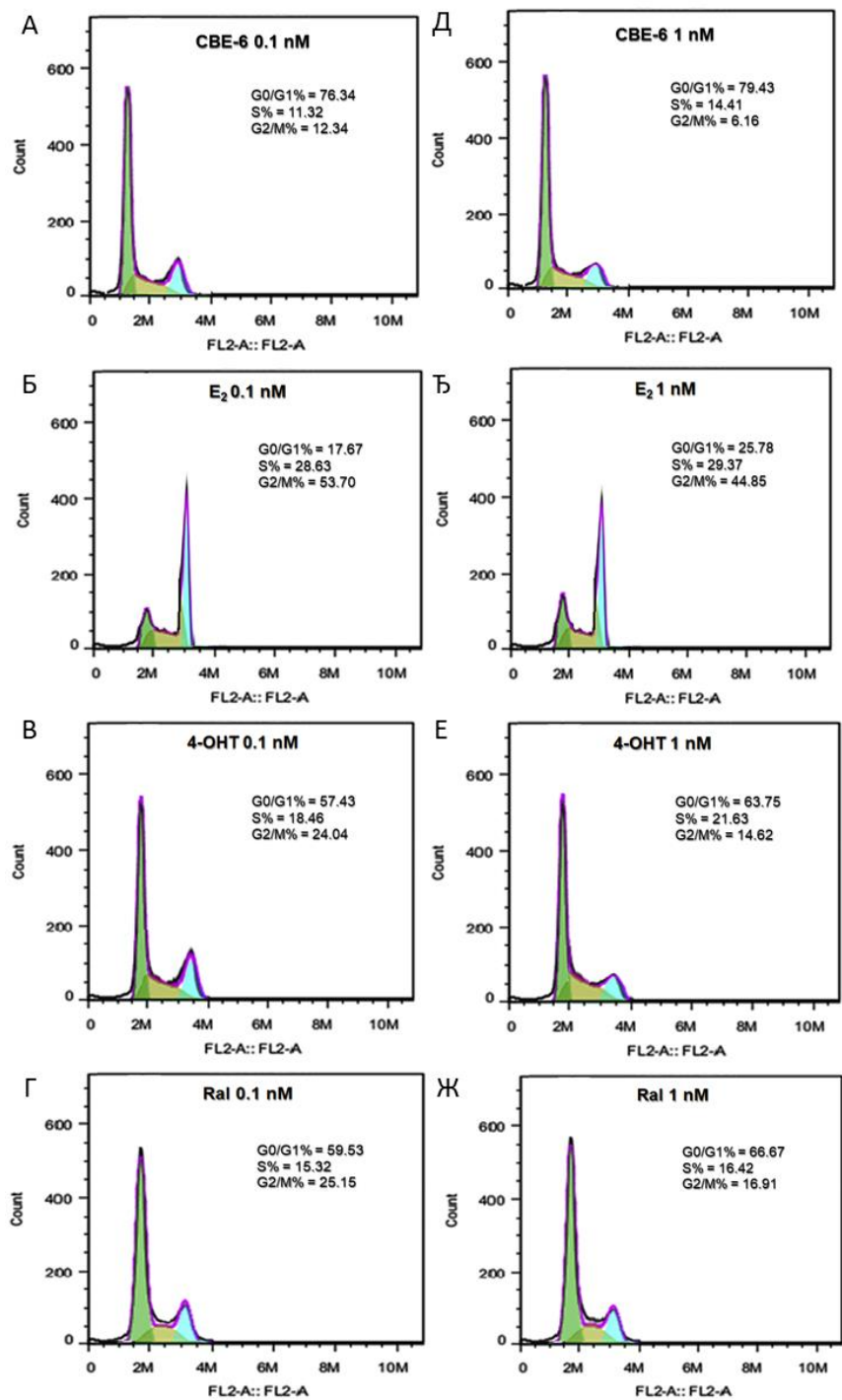
Слика ДМ121. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **CBE-3** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **CBE-3** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



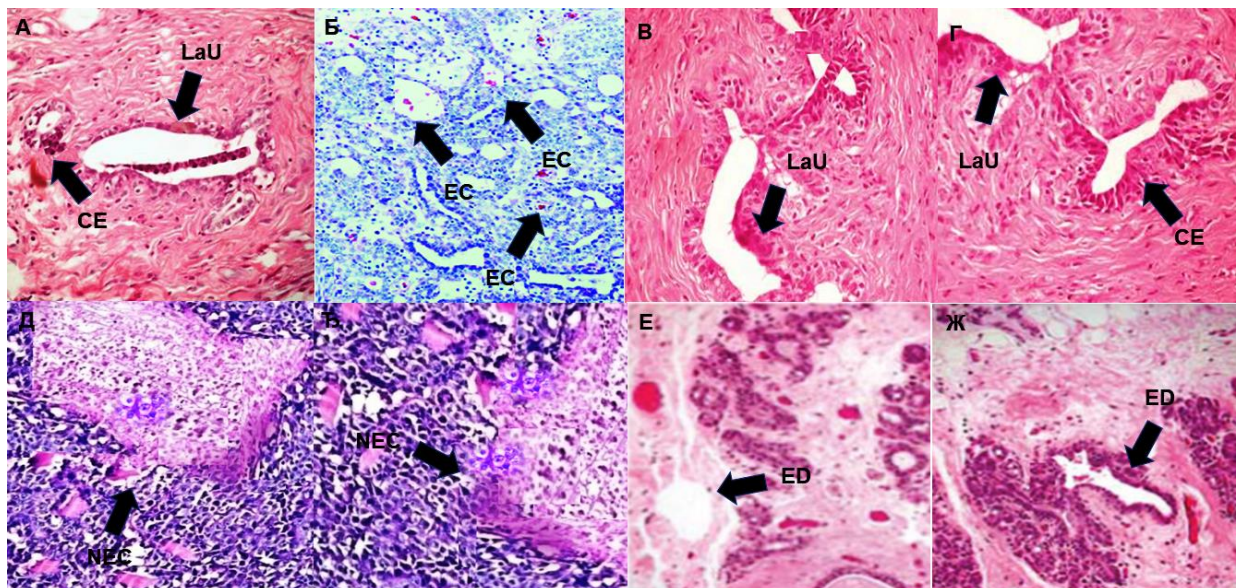
Слика ДМ122. Анализа ћелијског циклуса МСF-7 ћелијских линија третираних са **СВЕ-1** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **СВЕ-1** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



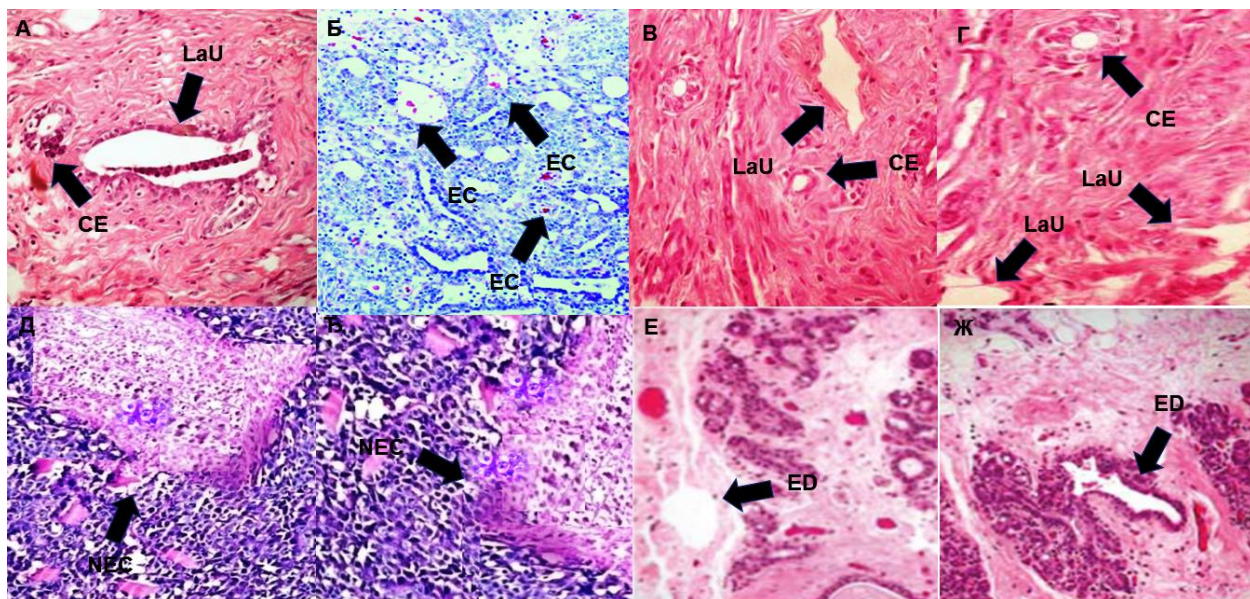
Слика ДМ123. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **CBE-2** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **CBE-2** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (З); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



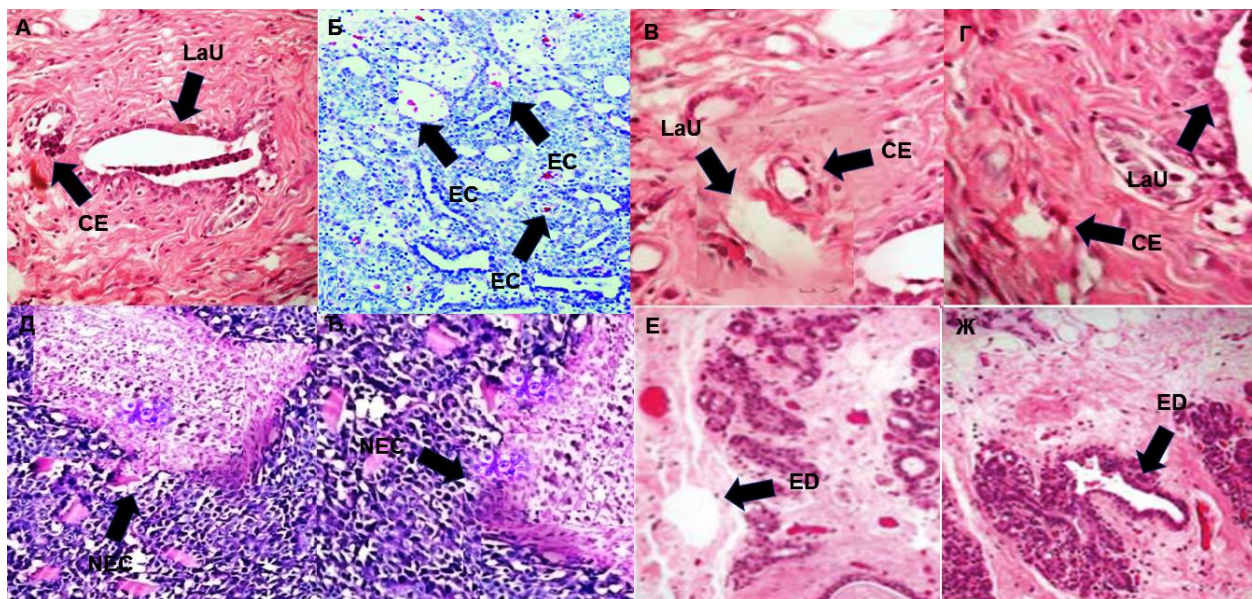
Слика ДМ124. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **CBE-6** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **CBE-6** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



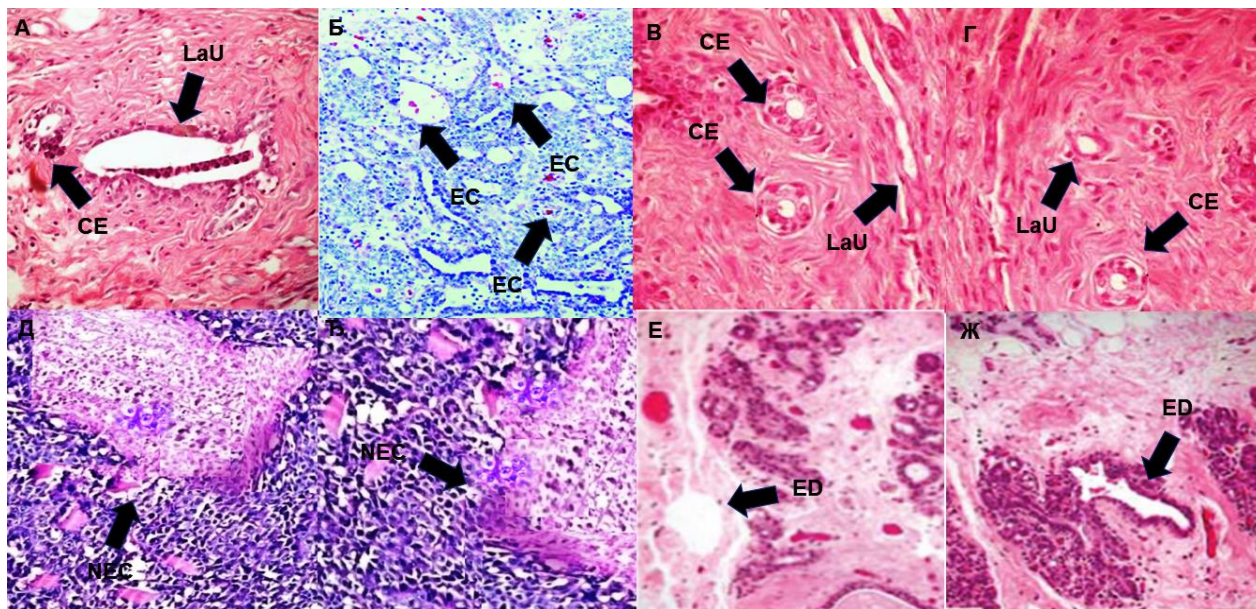
Слика ДМ125. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-5** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-5** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



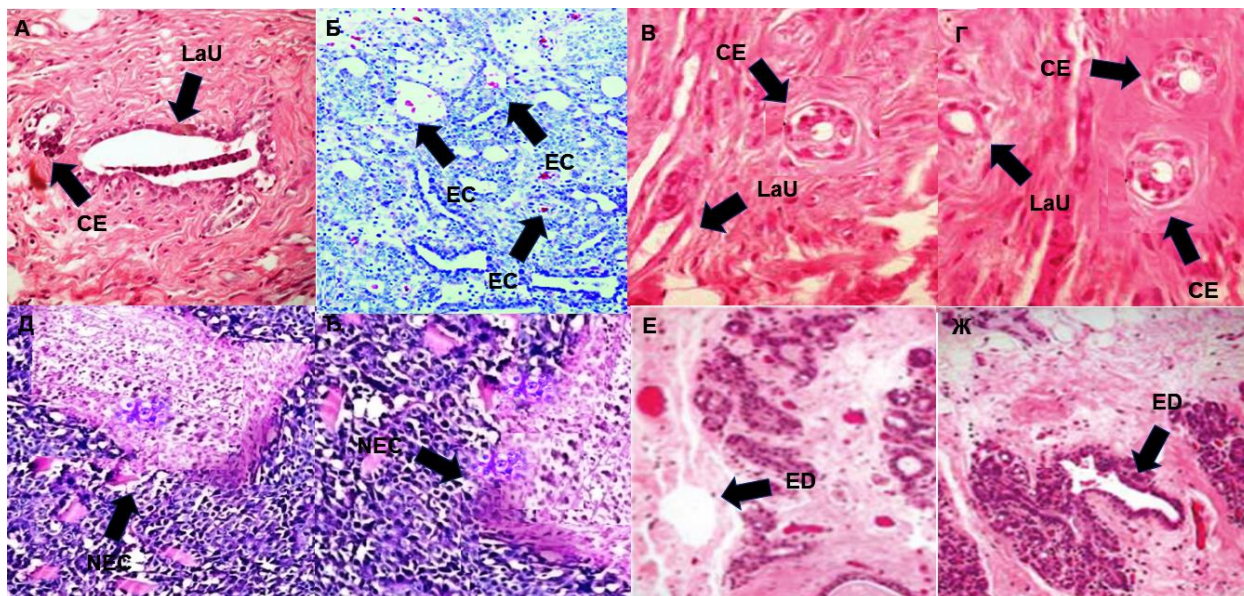
Слика ДМ126. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-3** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-3** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



Слика ДМ127. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-1** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-1** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



Слика ДМ128. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **CBE-2** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **CBE-2** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



Слика ДМ129. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-6** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **СВЕ-6** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.

Додатни материјал IV

за ДОКТОРСКУ ДИСЕРТАЦИЈУ:

*Антагонисти естроген рецептора α : Рационални
дизајн нових супресаната рака дојке базиран на 3-D
QSAR, COMBINEr и 3-D фармакофорним
студијама*

Садржај

Табела ДМ1. PDB кодови и структуре лигананда естроген рецептора α доступних у Protein Data Bank октобра 2015. године.

Табела ДМ2. Резултати различитих параметара (горњи део) и PLS статистичких параметара (доњи део) првих десет хипотеза.

Табела ДМ3. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене IC_{50} вредности тренинг сета помоћу **ADDHHP.13** хипотезе и LOO унакрсне валидације.

Табела ДМ4. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене IC_{50} вредности тренинг сета помоћу **ADDRRRP.11** хипотезе и LOO унакрсне валидације.

Табела ДМ5. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене IC_{50} вредности тренинг сета помоћу **ADDHHP.13** хипотезе и LSO унакрсне валидације.

Табела ДМ6. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене IC_{50} вредности тренинг сета помоћу **ADDRRRP.11** хипотезе и LSO унакрсне валидације.

Табела ДМ7. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као IC_{50} помоћу **3DPhyI/3-D QSAR** модел ансамбла и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ8. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као IC_{50} помоћу **3DPhyI/3-D QSAR** модел ансамбла и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ9. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу **3DPhyI/3-D QSAR** модел ансамбла и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ10. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу **3DPhyI/3-D QSAR** модел ансамбла и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ11. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као $pRBA$ помоћу **3DPhyI/3-D QSAR** модел ансамбла и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ12. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као $pRBA$ помоћу **3DPhyI/3-D QSAR** модел ансамбла и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Табела ДМ13. Анализа студија молекулског доковања у смислу карактерисања водоничних веза са кључним аминокиселинама унутар LBD.

Табела ДМ14. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз биохемијске маркере серума.

Табела ДМ15. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз маркере оксидативног оштећења јетре.

Слика ДМ1. Фармакофорне особине **3-D PhyI** хипотезе (**D**: донори водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **H**: хидрофобне особине, **P**: позитивне јонизујуће особине) и

мапе *PLS-коэффицијената 3-D QSAR* модела (ЗЕЛЕНИ $_{PLS-коэффицијенти}$: позитивне стерне интеракције, ЖУТИ $_{PLS-коэффицијенти}$: негативне стерне интеракције, ПЛАВИ $_{PLS-коэффицијенти}$: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, ЦРВЕНИ $_{PLS-коэффицијенти}$: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза неповољно утичу на активност за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ2. Фармакофорне особине **3-D PhypI** хипотезе (D: донори водоничне везе, A: акцептори водоничне везе, H: хидрофобне особине, P: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS-коэффицијената 3-D QSAR* модела (ЗЕЛЕНИ $_{PLS-коэффицијенти}$: позитивне стерне интеракције, ЖУТИ $_{PLS-коэффицијенти}$: негативне стерне интеракције, ПЛАВИ $_{PLS-коэффицијенти}$: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, ЦРВЕНИ $_{PLS-коэффицијенти}$: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза неповољно утичу на активност за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ3. Фармакофорне особине **3-D PhypI** хипотезе (D: донори водоничне везе, A: акцептори водоничне везе, H: хидрофобне особине, P: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS-коэффицијената 3-D QSAR* модела (ЗЕЛЕНИ $_{PLS-коэффицијенти}$: позитивне стерне интеракције, ЖУТИ $_{PLS-коэффицијенти}$: негативне стерне интеракције, ПЛАВИ $_{PLS-коэффицијенти}$: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, ЦРВЕНИ $_{PLS-коэффицијенти}$: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза неповољно утичу на активност за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ4. Фармакофорне особине **3-D PhypII** хипотезе (D: донори водоничне везе, A: акцептори водоничне везе, R: особине ароматичних прстенова, P: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS-коэффицијената 3-D QSAR* модела (ЗЕЛЕНИ $_{PLS-коэффицијенти}$: позитивне стерне интеракције, ЖУТИ $_{PLS-коэффицијенти}$: негативне стерне интеракције, ПЛАВИ $_{PLS-коэффицијенти}$: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, ЦРВЕНИ $_{PLS-коэффицијенти}$: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и донори

водоничних веза неповољно утичу на активност за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **2IOK** (Д); **2BJ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ5. Фармакофорне особине **3-D PhypII** хипотезе (**D**: донори водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **R**: особине ароматичних прстенова, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS-коэффицијената 3-D QSAR модела* (**ЗЕЛЕНИ***PLS-коэффицијенту*: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS-коэффицијенту*: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS-коэффицијенту*: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS-коэффицијенту*: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза неповољно утичу на активност за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ6. Фармакофорне особине **3-D PhypII** хипотезе (**D**: донори водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **R**: особине ароматичних прстенова, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS-коэффицијената 3-D QSAR модела* (**ЗЕЛЕНИ***PLS-коэффицијенту*: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS-коэффицијенту*: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS-коэффицијенту*: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS-коэффицијенту*: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза неповољно утичу на активност за **1XP6** (А); **1SJ0** (Б); **2R6Y** (В); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ7. Фармакофорне особине **3-D PhypII** хипотезе (**D**: донори водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **R**: особине ароматичних прстенова, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS-коэффицијената 3-D QSAR модела* (**ЗЕЛЕНИ***PLS-коэффицијенту*: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS-коэффицијенту*: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS-коэффицијенту*: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS-коэффицијенту*: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза неповољно утичу на активност за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ8. Фармакофорне особине **3-D PhypII** хипотезе (**D**: донори водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **R**: особине ароматичних прстенова, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS-коэффицијената 3-D QSAR модела* (**ЗЕЛЕНИ***PLS-коэффицијенту*: позитивне

стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS-коэффициенти*: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS-коэффициенти*: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS-коэффициенти*: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза неповољно утичу на активност за **2QA6** (А); **1XQC** (Б); **2B1Z** (В); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ9. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Glide: **1L2I** (А), ЕС тамно плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **5AK2** (Б), ЕС тамно плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **2IOG** (В), ЕС тамно зелена, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1X7R** (Г), ЕС љубичаста, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1UOM** (Д), ЕС љубичаста, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; и **1GWQ** (Ђ) ЕС сиво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ10. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Glide: **1XP6** (А), ЕС браон, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1SJO** (Б), ЕС тамно плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **2R6Y** (В), ЕС светло плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1XP9** (Г), ЕС плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1YIM** (Д), ЕС љубичаста, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; и **1YIN** (Ђ) ЕС љубичасто, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ11. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Glide: **1XPC** (А), ЕС сиво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **2R6W** (Б), ЕС тамно црвено, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **2QA8** (В), ЕС наранџасто, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; и **1R5K** (Г) ЕС тамно сиво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ12. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Glide: **2QA6** (А), ЕС светло плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1XQC** (Б), ЕС светло зелено, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **2B1Z** (В), ЕС светло ружичасто, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; и **1X7E** (Г) ЕС жуто, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ13. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда $ER\alpha$ виртуелно поравњаних у активном центру $ER\alpha$ помоћу програма FLA: **1L2I** (А), ЕС тамно плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **5AK2** (Б), ЕС тамно плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **2IOG** (В), ЕС тамно зелено, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1X7R** (Г), ЕС љубичасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1UOM** (Д), ЕС љубичасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; и **1GWQ** (Ђ) ЕС сиво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ14. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда $ER\alpha$ виртуелно поравњаних у активном центру $ER\alpha$ помоћу програма FLA: **1XP6** (А), ЕС браон, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1SJ0** (Б), ЕС тамно плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **2R6Y** (В), ЕС светло плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1XP9** (Г), ЕС плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1YIM** (Д), ЕС љубичасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; и **1YIN** (Ђ) ЕС љубичасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ15. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда $ER\alpha$ виртуелно поравњаних у активном центру $ER\alpha$ помоћу програма FLA: **1XPC** (А), ЕС сиво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **2R6W** (Б), ЕС тамно црвено, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **2QA8** (В), ЕС наранџасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; и **1R5K** (Г) ЕС тамно зелено, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ16. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда $ER\alpha$ виртуелно поравњаних у активном центру $ER\alpha$ помоћу програма FLA: **2QA6** (А), ЕС светло плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1XQC** (Б), ЕС светло зелено, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **2B1Z** (В), ЕС светло ружичасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; и **1X7E** (Г) ЕС жуто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ17. Преклапање SB/LB виртуелно скенираних конформација **NCI89671**, SB конформација плава, LB конформација црвена (А); **NCI101789**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Б); **NCI645330**, SB конформација плава, LB конформација црвена (В); **NCI59814**, SB конформација црвена, LB конформација плава (Г); **NCI76747**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Д); **NCI9782**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Ђ), учитаних у **3-D PhypI/3-D QSAR модел** алат за предвиђање биоактивности. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ18. Преклапање SB/LB вируелно скенираних конформација **NCI71795**, SB конформација зелена, LB конформација наранџаста (А); **NCI85239**, конформација SB зелена, конформација LB жута (Б); **NCI69359**, SB конформација корална, LB конформација зелена (В); **NCI16437**, SB конформација зелена, LB конформација плава (Г); **NCI7128**, SB конформација љубичаста, LB конформација црвена (Д); **NCI10211**, SB конформација зелена, LB конформација плава (Ђ), учитаних у **3-D PhypI/3-D QSAR модел** алат за предвиђање биоактивности. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ19. Преклапање SB/LB вируелно скенираних конформација **NCI30813**, SB конформација плава, LB конформација црвена (А); **NCI10416**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Б); **NCI6145**, SB конформација плава, LB конформација црвена (В); **NCI19824**, SB конформација црвена, LB конформација плава (Г); **NCI36586**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Д); **NCI93427**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Ђ), учитаних у **3-D PhypI/3-D QSAR модел** алат за предвиђање биоактивности. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ20. Преклапање између дизајнираних једињења **3DPQ-7** (А), SBC плава, LBC зелена; **3DPQ-11** (Б), SBC љубичаста, LBC ружичаста; **3DPQ-10** (В), SBC зелена, LBC црвена; **3DPQ-5** (Г), SBC плава, LBC наранџаста; **3DPQ-8** (Д), SBC ружичаста, LBC зелена; **3DPQ-6** (Ђ) SBC зелена, LBC жута; и **1ERE**, ЕС плава, унутар ER α активног центра. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, Н12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

Слика ДМ21. ¹H NMR спектар једињења **R1**.

Слика ДМ22. ¹³C NMR спектар једињења **R1**.

Слика ДМ23. ¹⁷O NMR спектар једињења **R1**.

Слика ДМ24. ¹H NMR спектар једињења **R2**.

Слика ДМ25. ¹³C NMR спектар једињења **R2**.

Слика ДМ26. ¹⁷O NMR спектар једињења **R2**.

Слика ДМ27. ¹H NMR спектар једињења **R3**.

Слика ДМ28. ¹³C NMR спектар једињења **R3**.

Слика ДМ29. ¹⁷O NMR спектар једињења **R3**.

Слика ДМ30. ¹H NMR спектар једињења **R4**.

Слика ДМ31. ¹³C NMR спектар једињења **R4**.

Слика ДМ32. ¹⁵N NMR спектар једињења **R4**.

Слика ДМ33. ¹⁷O NMR спектар једињења **R4**.

Слика ДМ34. ¹H NMR спектар једињења **R5**.

Слика ДМ35. ¹³C NMR спектар једињења **R5**.

Слика ДМ36. ¹⁵N NMR спектар једињења **R5**.

Слика ДМ37. ¹⁷O NMR спектар једињења **R5**.

Слика ДМ38. ¹H NMR спектар једињења **R6**.

Слика ДМ39. ¹³C NMR спектар једињења **R6**.

Слика ДМ40. ¹⁷O NMR спектар једињења **R6**.

Слика ДМ41. ¹H NMR спектар једињења **R7**.

Слика ДМ42. ^{13}C NMR спектар једињења **R7**.
Слика ДМ43. ^{17}O NMR спектар једињења **R7**.
Слика ДМ44. ^1H NMR спектар једињења **R8**.
Слика ДМ45. ^{13}C NMR спектар једињења **R8**.
Слика ДМ46. ^{17}O NMR спектар једињења **R8**.
Слика ДМ47. ^1H NMR спектар једињења **BFA-D1**.
Слика ДМ48. ^{13}C NMR спектар једињења **BFA-D1**.
Слика ДМ49. ^{17}O NMR спектар једињења **BFA-D1**.
Слика ДМ50. ^1H NMR спектар једињења **BFA-D2**.
Слика ДМ51. ^{13}C NMR спектар једињења **BFA-D2**.
Слика ДМ52. ^{17}O NMR спектар једињења **BFA-D2**.
Слика ДМ53. ^1H NMR спектар једињења **BFA-D3**.
Слика ДМ54. ^{13}C NMR спектар једињења **BFA-D3**.
Слика ДМ55. ^{17}O NMR спектар једињења **BFA-D3**.
Слика ДМ56. ^1H NMR спектар једињења **BFA-D4**.
Слика ДМ57. ^{13}C NMR спектар једињења **BFA-D4**.
Слика ДМ58. ^{17}O NMR спектар једињења **DFA-D4**.
Слика ДМ59. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R3**.
Слика ДМ60. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R3**.
Слика ДМ61. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R3**.
Слика ДМ62. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-R3**.
Слика ДМ63. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R6**.
Слика ДМ64. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R6**.
Слика ДМ65. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R6**.
Слика ДМ66. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R7**.
Слика ДМ67. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R7**.
Слика ДМ68. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R7**.
Слика ДМ69. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R8**.
Слика ДМ70. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R8**.
Слика ДМ71. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R8**.
Слика ДМ72. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R9**.
Слика ДМ73. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R9**.
Слика ДМ74. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R9**.
Слика ДМ75. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-R9**.
Слика ДМ76. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R12**.
Слика ДМ77. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R12**.
Слика ДМ78. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R12**.
Слика ДМ79. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-R12**.
Слика ДМ80. ^1H NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-1**.
Слика ДМ81. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-1**.
Слика ДМ82. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-1**.
Слика ДМ83. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-1**.
Слика ДМ84. ^1H NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-2**.
Слика ДМ85. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-2**.
Слика ДМ86. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-2**.
Слика ДМ87. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-2**.

Слика ДМ180. HPLC спектар једињења **3DPQ-7**.
Слика ДМ181. HPLC спектар једињења **3DPQ-8**.
Слика ДМ182. HPLC спектар једињења **3DPQ-9**.
Слика ДМ183. HPLC спектар једињења **3DPQ-10**.
Слика ДМ184. HPLC спектар једињења **3DPQ-11**.
Слика ДМ185. HPLC спектар једињења **3DPQ-12**.
Слика ДМ186. Антагонизам естроген рецептора α у присуству **3DPQ-7** (А); **3DPQ-11** (Б); **3DPQ-10** (В); **3DPQ-5** (Г); **3DPQ-8** (Д); **3DPQ-6** (Ђ) .
Слика ДМ187. Антагонизам естроген рецептора β у присуству **3DPQ-12** (А); **3DPQ-3** (Б); **3DPQ-9** (В); **3DPQ-4** (Г); **3DPQ-2** (Д); **3DPQ-1** (Ђ).
Слика ДМ188. Антагонизам естроген рецептора β у присуству **3DPQ-7** (А); **3DPQ-11** (Б); **3DPQ-10** (В); **3DPQ-5** (Г); **3DPQ-8** (Д); **3DPQ-6** (Ђ).
Слика ДМ189. Биоактивне конформације **3DPQ-7** (А); **3DPQ-11** (Б); **3DPQ-10** (В); **3DPQ-5** (Г); **3DPQ-8** (Д); **3DPQ-6** (Ђ) унутар активног центра ER α . Аминокиселине су приказане белом бојом, хеликс H12 приказан је плавом бојом.
Слика ДМ190. Антипролиферативна активност за **3DPQ-7** (А); **3DPQ-11** (Б); **3DPQ-10** (В); **3DPQ-5** (Г); **3DPQ-8** (Д); **3DPQ-6** (Ђ) против MCF-7 cell ћелијских линија.
Слика ДМ191. Антипролиферативна активност **3DPQ-12** (А); **3DPQ-7** (Б); **3DPQ-11** (В); **3DPQ-2** (Г); **3DPQ-1** (Д); **3DPQ-4** (Ђ) против MDA-MB-231 ћелијских линија.
Слика ДМ192. Антипролиферативна активност **3DPQ-7** (А); **3DPQ-11** (Б); **3DPQ-10** (В); **3DPQ-5** (Г); **3DPQ-8** (Д); **3DPQ-6** (Ђ) против MDA-MB-231 ћелијских линија.
Слика ДМ193. Антипролиферативна активност **3DPQ-7** (А); **3DPQ-11** (Б); **3DPQ-10** (В); **3DPQ-5** (Г); **3DPQ-8** (Д); **3DPQ-6** (Ђ) против Ishikawa ћелијских линија.
Слика ДМ194. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-3** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E2** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-3** у концентрацији од 1 nM (Д); **E2** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж)
Слика ДМ195. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-9** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E2** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-9** у концентрацији од 1 nM (Д); **E2** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).
Слика ДМ196. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-4** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E2** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-4** у концентрацији од 1 nM (Д); **E2** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).
Слика ДМ197. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-2** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E2** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-2** у концентрацији од 1 nM (Д); **E2** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).
Слика ДМ198. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-1** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E2** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-1** у концентрацији од 1 nM (Д); **E2**

у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОНТ** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Слика ДМ199. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-7** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E2** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-ОНТ** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-7** у концентрацији од 1 nM (Д); **E2** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОНТ** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Слика ДМ200. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-11** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E2** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-ОНТ** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-11** у концентрацији од 1 nM (Д); **E2** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОНТ** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Слика ДМ201. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-10** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E2** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-ОНТ** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-10** у концентрацији од 1 nM (Д); **E2** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОНТ** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Слика ДМ202. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-5** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E2** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-ОНТ** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-5** у концентрацији од 1 nM (Д); **E2** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОНТ** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

Слика ДМ203. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-8** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E2** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-ОНТ** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-8** у концентрацији од 1 nM (Д); **E2** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОНТ** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

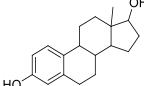
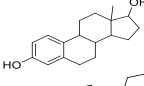
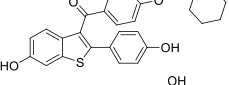
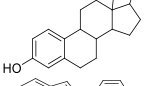
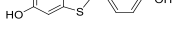
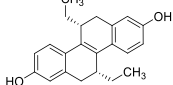
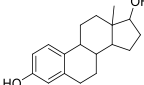
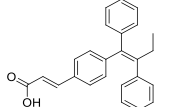
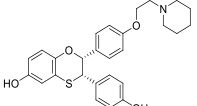
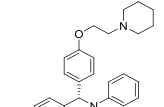
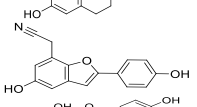
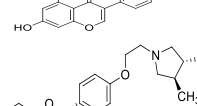
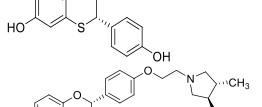
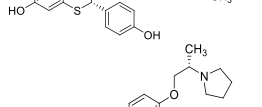
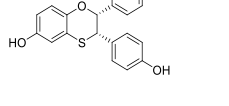
Слика ДМ204. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-6** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E2** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-ОНТ** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-6** у концентрацији од 1 nM (Д); **E2** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-ОНТ** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).

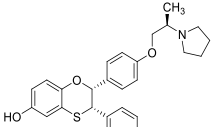
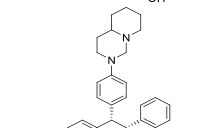
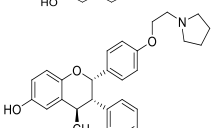
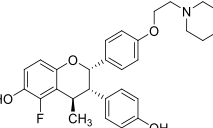
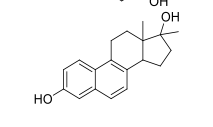
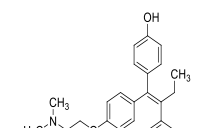
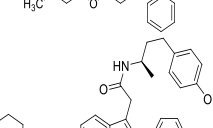
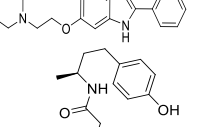
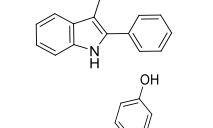
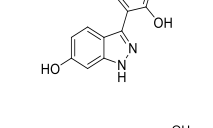
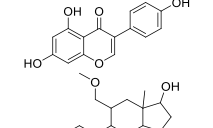
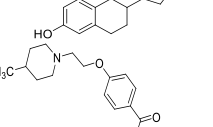
Слика ДМ205. Фотографије исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотографије исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотографије исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-3** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотографије исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-3** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотографије исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотографије исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотографије исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е);

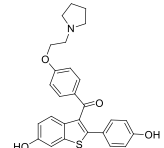
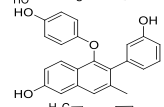
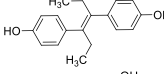
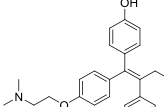
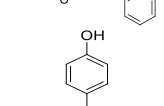
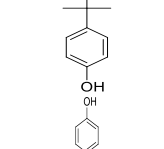
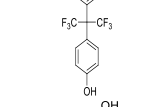
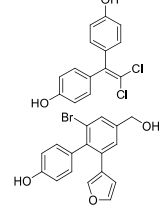
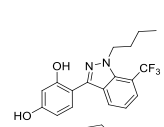
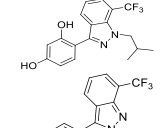
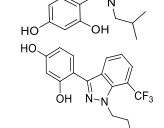
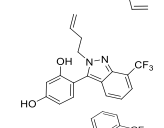
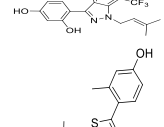
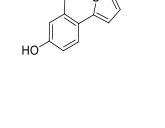

третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.

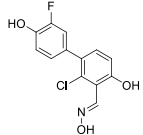
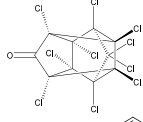
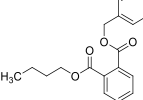
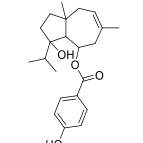
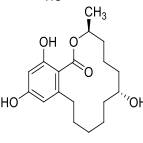
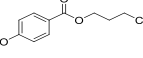
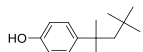
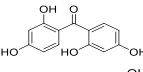
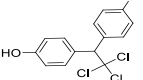
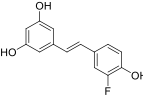
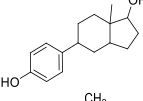
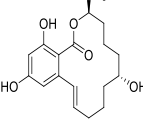
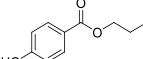
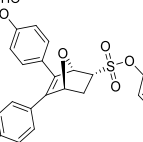
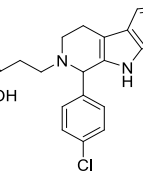
Слика ДМ209. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-1** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-1** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.

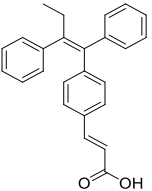
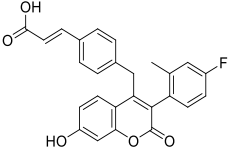
Табела ДМ1. PDB кодови и структуре лиганда естроген рецептора α доступних у Protein Data Bank октобра 2015. године.

PDB	Структура лиганда	pI_{C50}	pK_i	Мутација	Реф.
1A52		9,24	9,79	Не постоји	318
1ERE		9,24	9,79	Не постоји	73
1ERR		9,52	10,50	Не постоји	73
1G50		8,72	6,27	Не постоји	319
1GWQ		5,85	НД ^a	Не постоји	75
1L2I		8,50	8,50	Не постоји	85
1QKU		8,72	6,27	Не постоји	320
1R5K		7,40	НД	Не постоји	74
1SJO		9,09	НД	Не постоји	76
1UOM		7,70	НД	Не постоји	86
1X7E		5,90	НД	Не постоји	77
1X7R		8,01	НД	Не постоји	78
1XP1		9,30	НД	Не постоји	79
1XP6		9,30	НД	Не постоји	79
1XP9		8,80	НД	Не постоји	79

1XPC		8,70	НД	Не постоји	79
1XQC		7,20	НД	Не постоји	80
1YIM		8,80	НД	Не постоји	81
1YIN		8,80	НД	Не постоји	81
2B1Z		7,10	НД	C381S C417S	87
2BJ4		8,60	10,40	Не постоји	87
2IOG		8,09	НД	Не постоји	83
2IOK		9,00	НД	Не постоји	83
2QA6		7,30	НД	Y537S	88
2QA8		8,01	6,40	Y537Ser	88
2QGT					88
2R6W		8,60	9,40	C381S C417S	89

2R6Y		8,9	9,50	C381S C417S	89
3DT3		НД	НД	Не постоји	84
3ERD		9,48	НД	Не постоји	84
3ERT		НД	9,60	Не постоји	84
3UU7		НД	8,79	Y537S	90
3UUA		НД	8,79	Y537S	90
3UUC		НД	5,70	Не постоји	90
4DMA		НД	5,60	Не постоји	90
4IU1		НД	НД	Не постоји	322
4IV2		НД	НД	Не постоји	322
4IV4		НД	НД	Не постоји	322
4IVY		НД	НД	Не постоји	322
4IW6		НД	НД	Не постоји	322
4IW8		НД	НД	Не постоји	322
4IWC		НД	НД	Не постоји	322

4IWF		НД	НД	Не постоји	322
4MG5		НД	НД	Y537S	322
4MG6		НД	6,00	Y537S	92
4MG7		НД	НД	Y537S	92
4MG8		НД	10,00	Y537S	92
4MG9		НД	6,00	Y537S	92
4MGA		НД	6,00	Y537S	92
4MGC		НД	7,00	Y537S	92
4MGD		НД	6,00	Y537S	92
4PPP		НД	НД	Не постоји	323
4PPS		НД	НД	Не постоји	323
4TUZ		НД	10,00	Y537S	324
4TV1		НД	НД	Y537S	93
4ZN9		НД	9,60	Y537S	94
5AAU		4.86	НД	Не постоји	321

5AAV		9,17	НД	Не постоји	321
5AK2		8,40	10,00	C381S C417S	75

^aНије доступно.

Табела ДМ2. Резултати различитих параметара (горњи део) и PLS статистичких параметара (доњи део) првих десет хипотеза.

HID ^a	SB	S-I ^b	P-H ^г	S ^д	V ^ђ	VOL ^е	SE ^ж	M ^з	A ^и	I ^ј
DDRRRP.34	3,432	1,432	5,432	0,76	0,821	0,314	2,157	14	9,52	1,594
AAARRP.37	3,449	1,453	5,623	0,74	0,863	0,338	2,147	14	9,52	1,658
DDHHHP.26	3,338	1,324	5,321	0,77	0,872	0,367	2,153	14	9,52	1,451
AAHHHP.46	3,442	1,442	5,634	0,72	0,902	0,367	2,156	14	9,52	1,558
ADDRRRP.11	3,741	0,967	6,429	0,81	0,991	0,426	2,678	17	9,52	1,751
ADDHHHP.13	3,743	0,963	6,432	0,83	0,993	0,431	2,674	17	9,52	1,755
AAHHHP.29	3,532	1,021	5,331	0,77	0,912	0,416	2,365	15	9,30	1,458
AAARRP.19	3,561	1,113	5,231	0,74	0,922	0,426	2,358	15	9,30	1,552
ADDHHHP.37	3,563	1,096	5,336	0,78	0,923	0,429	2,357	16	9,52	1,574
ADDRRRHP.41	3,432	1,432	5,432	0,76	0,821	0,314	2,157	14	9,52	1,594
	PLSF ^к	r ² _л	SD ^љ	F ^м	P ^н	Stability ^њ	q ² _{LOO} ^о	q ² _{LSO} ^п	q ² _{YS LOO} ^р	q ² _{YS LSO} ^с
DDRRRP.34	4	0,912	0,214	58,9	3,94e ⁻¹⁵	0,845	0,695	0,548	-0,212	-0,127
AAARRP.37	4	0,918	0,216	58,3	3,98e ⁻¹⁵	0,861	0,691	0,535	-0,264	-0,126
DDHHHP.26	4	0,914	0,219	59,2	3,96e ⁻¹⁵	0,914	0,684	0,552	-0,187	-0,187
AAHHHP.46	4	0,916	0,216	58,6	4,01e ⁻¹⁵	0,904	0,687	0,539	-0,164	-0,146
ADDRRRP.11	5	0,949	0,264	61,3	4,38e ⁻¹⁵	0,971	0,825	0,627	-0,234	-0,247
ADDHHHP.13	5	0,951	0,257	61,4	4,41e ⁻¹⁵	0,977	0,826	0,659	-0,241	-0,258
AAHHHP.29	4	0,924	0,228	56,4	4,26e ⁻¹⁵	0,934	0,712	0,623	-0,174	-0,136
AAARRP.19	4	0,931	0,234	54,3	4,29e ⁻¹⁵	0,954	0,705	0,593	-0,165	-0,187
ADDHHHP.37	4	0,329	0,217	52,7	4,31e ⁻¹⁵	0,941	0,726	0,617	-0,175	-0,134
ADDRRRHP.41	4	0,935	0,246	53,3	4,33e ⁻¹⁵	0,956	0,722	0,618	-0,264	-0,129

^aHypothesis identification - Идентификација хипотезе; ^bSurvival - скалирана комбинација вектора, позиције, запремине и резултата преживљавања и процена за број једињења чија структура одговара фармакофори; ^cSurvival-inactives - резултат преживљавања за активна једињења умањен коефицијентом за неактивна једињења; ^гPost-hoc - резултат пребројавања; ^дSite score - RMS вредност преклапања фармакофорних особина које доприносе хипотези, базирана на девијацији свих лиганата у односу на референтни лиганд; ^ђVector alignment score - мера вектора за поравнање акцептора, донора и ароматичних прстенова у структурама које доприносе овој хипотези када су саме структуре поравнате са фармакофором; ^еVolume - мера колико се запремине доприносећих структура преклапају када се поравнају на фармакофору; ^жSelectivity - удео молекула који ће се вероватно подударати са хипотезом, без обзира на њихову активност у односу на рецептор; ^зMatches - број активних молекула који се подударају са хипотезом; ^иActivity - Активност референтног лиганда (pIC₅₀); ^јInactive - Оцена преживљавања неактивних молекула; ^кPLS factor, тј. N/5, где је N број лиганата присутних у тренинг сету; ^лКонвенционални коефицијент квадратне корелације; ^љСтандардна девијација регресије; ^мОднос варијансе модела у односу на варијансу посматране активности; ^нНиво значајности односа варијансе; ^њСтабилност предвиђања модела у односу на промене у саставу тренинг сета; ^оКоефицијент корелације унакрсне валидације применом leave-one-out методе. ^пКоефицијент корелације унакрсне валидације применом leave-some-out методе са 5 случајних група; ^рПросечан коефицијент корелације унакрсне валидације применом leave-one-out методе, добијен након Y-мешања. ^сПросечни коефицијент корелације унакрсне валидације применом leave-some-out методе, добијен након Y-мешања.

Табела ДМ3. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу **ADDHHP.13** хипотезе и LOO унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	9,04	0,2	8,12	0,90
1ERR	9,52	9,31	0,21	8,12	-0,29
1GWQ	5,85	6,05	-0,2	8,12	-0,2
1L2I	8,50	8,33	0,17	8,12	0,04
1RK5	7,40	7,56	-0,16	8,12	0,65
1SJ0	9,09	9,21	-0,12	8,12	0,48
1UOM	7,70	7,87	-0,17	8,12	0,46
1X7E	5,90	6,13	-0,23	8,12	-0,43
1X7R	8,01	7,91	0,10	8,12	0,23
1XP1	9,30	9,56	-0,26	8,12	-0,04
1XP6	9,30	9,12	0,18	8,12	0,41
1XP9	8,80	8,74	0,06	8,12	0,64
1XPC	8,70	8,64	0,06	8,12	-0,06
1XQC	7,20	7,35	-0,15	8,12	0,35
1YIM	8,80	9,12	-0,32	8,12	0,68
1YIN	8,80	8,79	0,01	8,12	0,25
2B1Z	7,10	7,56	-0,46	8,12	0,55
2BJ4	8,60	8,43	0,17	8,12	0,48
2IOG	8,09	7,92	0,17	8,12	-0,05
2IOK	9,00	8,84	0,16	8,12	0,28
2QA6	7,30	7,12	0,18	8,12	-0,58
2QA8	9,70	9,46	0,24	8,12	1,36
2R6W	8,60	8,12	0,48	8,12	0,48
2R6Y	8,90	9,16	-0,26	8,12	-0,24
3ERD	9,48	9,24	0,24	8,12	0,36
5AK2	8,40	8,76	-0,36	8,12	0,28

Табела ДМ4. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене rIC_{50} вредности тренинг сета помоћу **ADDRRRP.11** хипотезе и LOO унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	8,94	0,30	8,56	0,68
1ERR	9,52	9,13	0,39	9,68	-0,16
1GWQ	5,85	6,12	-0,27	6,11	-0,26
1L2I	8,50	8,60	-0,10	8,31	0,19
1RK5	7,40	7,77	-0,37	6,85	0,55
1SJ0	9,09	9,14	-0,05	8,75	0,34
1UOM	7,70	7,86	-0,16	7,12	0,58
1X7E	5,90	6,33	-0,43	6,69	-0,79
1X7R	8,01	7,99	0,02	7,46	0,55
1XP1	9,30	9,41	-0,11	9,34	-0,04
1XP6	9,30	9,07	0,23	8,79	0,51
1XP9	8,80	8,69	0,11	8,16	0,64
1XPC	8,70	8,76	-0,06	8,46	0,24
1XQC	7,20	7,31	-0,11	6,88	0,32
1YIM	8,80	9,06	-0,26	8,22	0,58
1YIN	8,80	8,94	-0,14	8,25	0,55
2B1Z	7,10	7,66	-0,56	6,74	0,36
2BJ4	8,60	8,39	0,21	8,07	0,53
2IOG	8,09	7,84	0,25	8,34	-0,25
2IOK	9,00	8,92	0,08	8,85	0,15
2QA6	7,30	7,56	-0,26	7,52	-0,22
2QA8	9,70	9,56	0,14	8,34	1,36
2R6W	8,60	8,18	0,42	8,02	0,58
2R6Y	8,90	9,12	-0,22	9,22	-0,32
3ERD	9,48	9,13	0,35	9,15	0,33
5AK2	8,40	8,66	-0,26	8,02	0,38

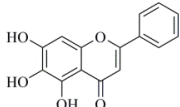
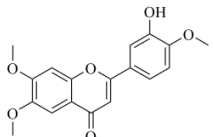
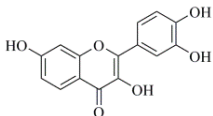
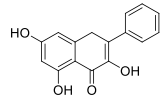
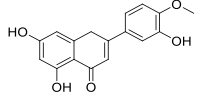
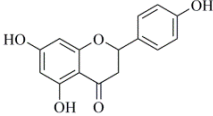
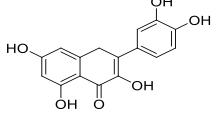
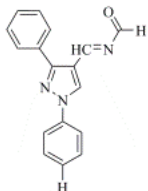
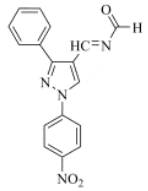
Табела ДМ5. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу **ADDHHP.13** хипотезе и LSO унакрсне валидације.

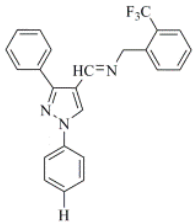
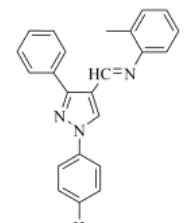
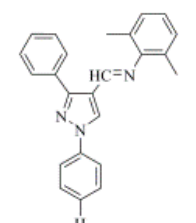
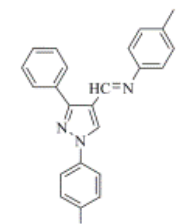
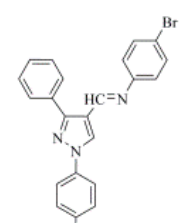
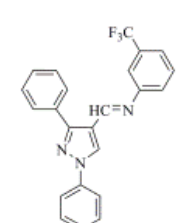
Јед.	Експериментално	Прерачунао	Грешка	Прерачунао	Грешка
1ERE	9,24	8,94	0,30	8,36	0,88
1ERR	9,52	9,13	0,39	9,76	-0,24
1GWQ	5,85	6,12	-0,27	6,46	-0,61
1L2I	8,50	8,60	-0,1	7,84	0,66
1RK5	7,40	7,77	-0,37	6,31	1,09
1SJ0	9,09	9,14	-0,05	8,59	0,50
1UOM	7,70	7,86	-0,16	6,13	1,57
1X7E	5,90	6,33	-0,43	6,36	-0,46
1X7R	8,01	7,99	0,02	8,99	-0,98
1XP1	9,30	9,41	-0,11	8,54	0,76
1XP6	9,30	9,07	0,23	8,39	0,91
1XP9	8,80	8,69	0,11	8,24	0,56
1XPC	8,70	8,76	-0,06	8,64	0,06
1XQC	7,20	7,31	-0,11	6,51	0,69
1YIM	8,80	9,06	-0,26	7,37	1,43
1YIN	8,80	8,94	-0,14	7,12	1,68
2B1Z	7,10	7,66	-0,56	6,64	0,46
2BJ4	8,60	8,39	0,21	7,51	1,09
2IOG	8,09	7,84	0,25	7,67	0,42
2IOK	9,00	8,92	0,08	8,63	0,37
2QA6	7,30	7,56	-0,26	6,74	0,56
2QA8	9,70	9,56	0,14	8,36	1,34
2R6W	8,60	8,18	0,42	7,61	0,99
2R6Y	8,90	9,12	-0,22	8,16	0,74
3ERD	9,48	9,13	0,35	9,06	0,42
5AK2	8,40	8,66	-0,26	7,28	1,12

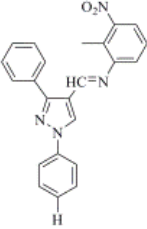
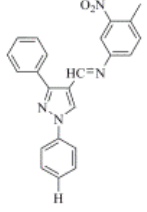
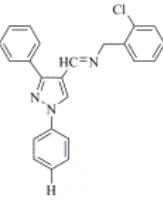
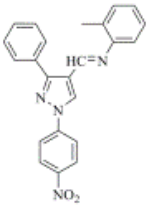
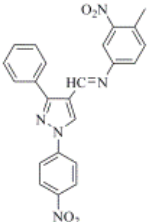
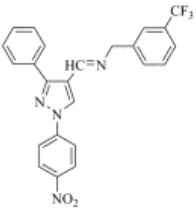
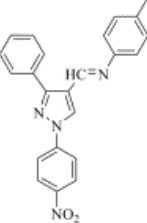
Табела ДМ6. Експерименталне у односу на прерачунате и предвиђене pIC_{50} вредности тренинг сета помоћу **ADDRRRP.11** хипотезе и LSO унакрсне валидације.

Јед.	Експериментално	Прерачунато	Грешка	Прерачунато	Грешка
1ERE	9,24	9.35	-0.11	8.89	0.35
1ERR	9,52	9.62	-0.10	9.01	0.51
1GWQ	5,85	6.47	-0.62	6.96	-1.11
1L2I	8,50	8.70	-0.20	8.91	-0.41
1RK5	7,40	7.64	-0.24	8.13	-0.73
1SJ0	9,09	9.17	-0.08	8.93	0.16
1UOM	7,70	7.59	0.11	7.70	0.00
1X7E	5,90	5.86	0.04	6.45	-0.55
1X7R	8,01	8.19	-0.18	8.34	-0.33
1XP1	9,30	9.30	0.00	8.88	0.42
1XP6	9,30	9.33	-0.03	9.14	0.16
1XP9	8,80	8.50	0.30	8.38	0.42
1XPC	8,70	8.81	-0.11	8.84	-0.14
1XQC	7,20	7.13	0.07	7.41	-0.21
1YIM	8,80	9.01	-0.21	9.21	-0.41
1YIN	8,80	8.77	0.03	9.46	-0.66
2B1Z	7,10	6.89	0.21	6.35	0.75
2BJ4	8,60	8.41	0.19	7.68	0.92
2IOG	8,09	8.05	0.04	8.62	-0.53
2IOK	9,00	8.94	0.06	9.42	-0.42
2QA6	7,30	7.15	0.15	7.27	0.03
2QA8	9,70	8.75	0.95	8.21	1.49
2R6W	8,60	8.58	0.02	8.82	-0.22
2R6Y	8,90	9.07	-0.17	9.05	-0.15
3ERD	9,48	9.75	-0.27	9.06	0.42
5AK2	8,40	8.24	0.16	8.29	0.11

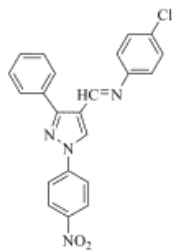
Табела ДМ7. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pIC_{50} помоћу 3DPhyI/3-D QSAR модел ансамбла и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pIC_{50}	Пред. pIC_{50}		Пред. pIC_{50}		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^b	АЕР ^B	
Бајкалеин		4,71	6,23	1,52	7,52	2,81	327
Еупаторин		5,09	5,13	0,04	6,42	1,33	327
Фисетин		5,38	4,33	1,05	5,62	0,24	328
Галангин		4,81	2,79	2,02	4,08	0,73	328
Хесперетин		4,4	2,34	2,06	3,63	0,77	328
Нарингенин		4,18	2,73	1,45	4,02	0,16	328
Кверцетин		4,76	6,33	1,57	7,62	2,86	328
I11-3a		3,7	6,83	3,13	8,12	4,42	329
I11-3b		3,47	6,63	3,16	7,92	4,45	329

I11-4a10		3,61	6,25	2,64	7,54	3,93	329
I11-4a1a		4,33	5,8	1,47	7,09	2,76	329
I11-4a2		4,13	3,91	0,22	5,2	1,07	329
I11-4a3b		4,25	3,47	0,78	4,76	0,51	329
I11-4a5		5,52	3,35	2,17	4,64	0,88	329
I114a6		4,89	4,02	0,87	5,31	0,42	329

I11-4a7		4,89	4,13	0,76	5,42	0,53	329
I11-4a8		5,4	5,34	0,06	6,63	1,23	329
I11-4a9		4,89	6,24	1,35	7,53	2,64	329
I11-4b1		3,58	6,02	2,44	7,31	3,73	329
I11-4b6		3,63	3,57	0,06	4,86	1,23	329
I11-4b7		3,65	2,68	0,97	3,97	0,32	329
I11-4b2		3,58	3,36	0,22	4,65	1,07	329

I11-4b3



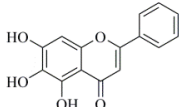
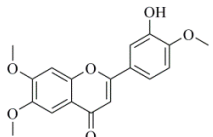
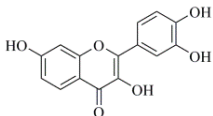
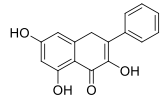
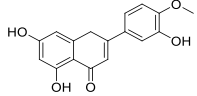
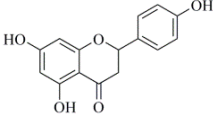
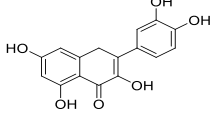
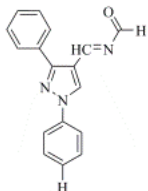
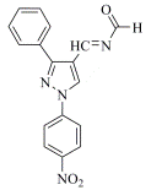
3,61 3,68 0,07 4,97 1,36 329

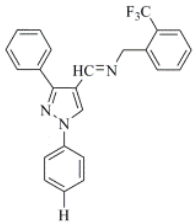
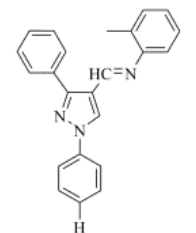
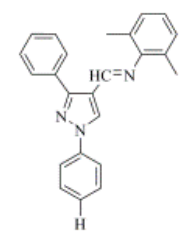
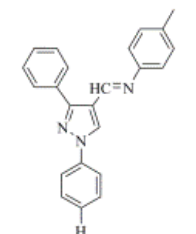
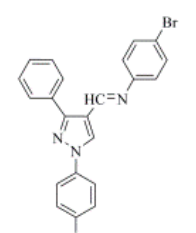
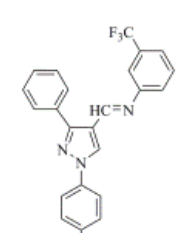
³LOO, leave-one-out унакрсна валидација;

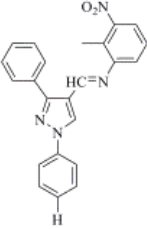
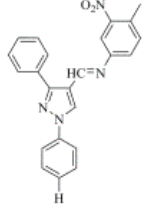
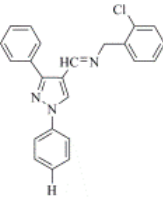
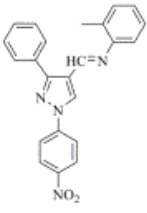
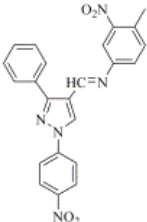
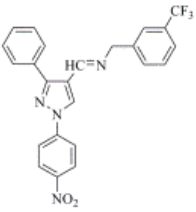
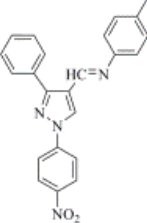
⁶LSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

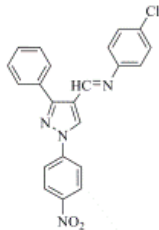
Табела ДМ8. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pIC_{50} помоћу **3DPhyI/3-D QSAR модел ансамбла** и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pIC_{50}	Пред. pIC_{50}		Пред. pIC_{50}		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^b	АЕР ^B	
Бајкалеин		4,71	7,21	2,50	8,11	3,40	327
Еупаторин		5,09	7,14	2,05	7,64	2,55	327
Фисетин		5,38	6,69	1,31	7,74	2,36	328
Галангин		4,81	7,45	2,64	7,18	2,37	328
Хесперетин		4,4	6,32	1,92	7,96	3,56	328
Нарингенин		4,18	6,76	2,58	7,11	2,93	328
Кверцетин		4,76	6,48	1,72	6,78	2,02	328
I11-3a		3,7	4,45	0,75	5,14	1,44	329
I11-3b		3,47	4,47	1,00	5,21	1,74	329

I11-4a10		3,61	4,23	0,62	4,91	1,30	329
I11-4a1a		4,33	4,68	0,35	5,53	1,20	329
I11-4a2		4,13	5,48	1,35	5,34	1,21	329
I11-4a3b		4,25	5,31	1,06	5,73	1,48	329
I11-4a5		5,52	6,32	0,80	7,11	1,59	329
I11-4a6		4,89	3,64	1,25	6,36	1,47	329

I11-4a7		4,89	5,34	0,45	6,41	1,52	329
I11-4a8		5,4	6,15	0,75	6,13	0,73	329
I11-4a9		4,89	6,32	1,43	6,37	1,48	329
I11-4b1		3,58	5,56	1,98	5,34	1,76	329
I11-4b6		3,63	5,23	1,60	5,78	2,15	329
I11-4b7		3,65	4,54	0,89	5,23	1,58	329
I11-4b2		3,58	4,24	0,66	5,11	1,53	329

I11-4b3



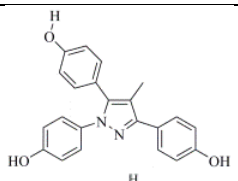
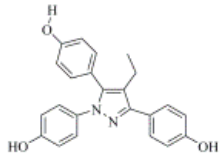
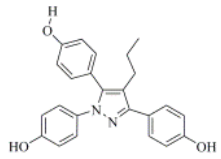
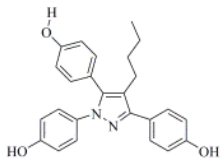
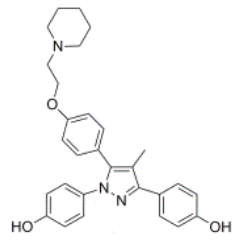
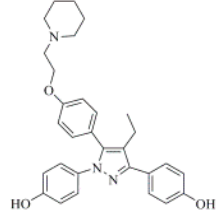
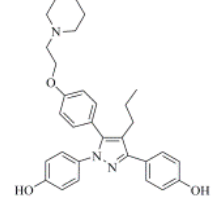
3,61 3,41 0,20 4,53 0,92 329

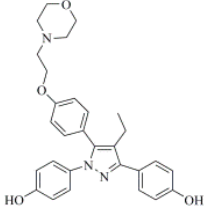
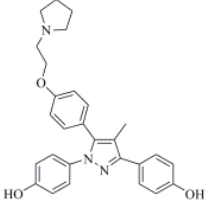
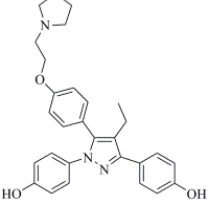
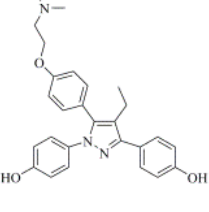
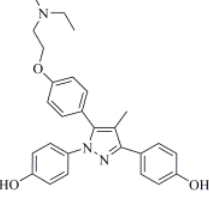
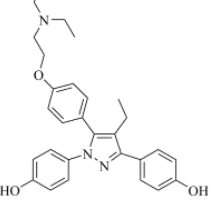
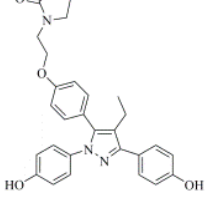
³LOO, leave-one-out унакрсна валидација;

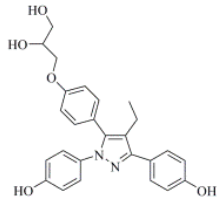
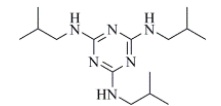
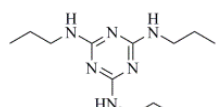
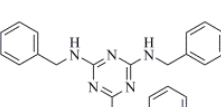
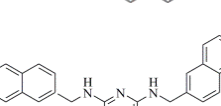
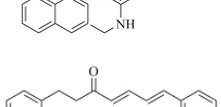
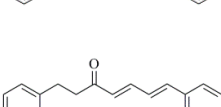
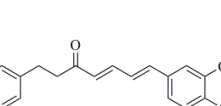
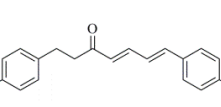
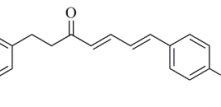
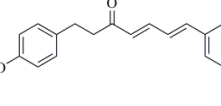
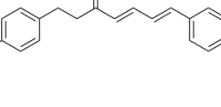
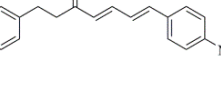
⁶LSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

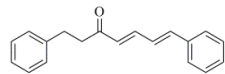
Табела ДМ9. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу **3DPhyI/3-D QSAR модел ансамбла** и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pK_i	Пред. pK_i		Пред. pK_i		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^a	АЕР ^B	
I3-I1		7,25	8,12	0,87	7,78	0,53	330
I3-I2		9,08	6,43	2,65	7,48	1,6	330
I3-I3		9,23	3,14	6,09	4,38	4,85	330
I3-I4		8,68	6,96	1,72	8,16	0,52	330
I3-I-A1		7,57	6,42	1,15	7,06	0,51	330
I3-I-A2		8,6	6,52	2,08	6,59	2,01	331
I3-I-A3		8,36	5,33	3,03	5,27	3,09	331

I3-I-B		8,49	4,29	4,2	5,43	3,06	331
I3-I-C1		7,6	7,73	0,13	6,91	0,69	332
I3-I-C2		8,72	5,94	2,78	6,28	2,44	332
I3-I-D		8,48	6,81	1,67	6,91	1,57	332
I3-I-E1		8,42	6,08	2,34	6,25	2,17	332
I3-I-E2		8,74	5,43	3,31	4,99	3,75	332
I3-I-F		8,64	5,64	3	5,52	3,12	332

I3-I-G		8,37	8,53	0,16	7,04	1,33	332
I4-1a		3,19	5,64	2,45	5,21	2,02	333
I4-1b		3,1	7,52	4,42	8,03	4,93	333
I4-1c		3,39	7,55	4,16	8,16	4,77	333
I4-1e		4,49	5,25	0,76	6,18	1,69	333
I6-10		3,63	6	2,37	6,65	3,02	333
I6-12		5,86	2,52	3,34	3,26	2,6	333
I6-14		6,01	4,86	1,15	6,02	0,01	333
I6-15		5,63	3,58	2,05	3,48	2,15	333
I6-16		6,29	3,47	2,82	3,27	3,02	333
I6-17		5,83	3,88	1,95	5,04	0,79	333
I6-18		5,66	5,46	0,2	5,15	0,51	333
I6-19		6,04	4,19	1,85	4,26	1,78	333

I6-1



6,19

4,65

1,54

6,15

0,04

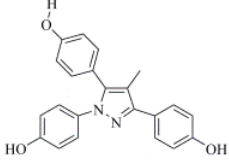
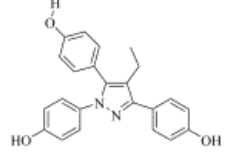
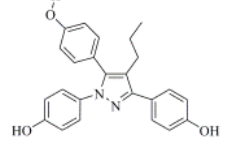
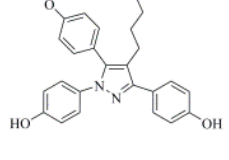
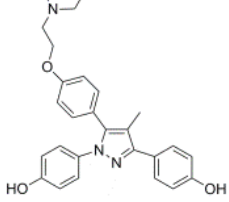
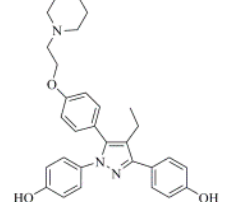
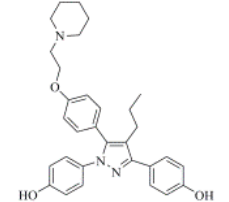
333

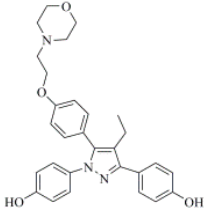
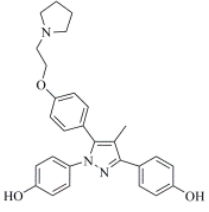
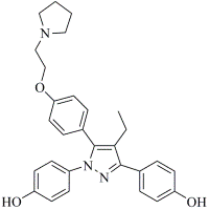
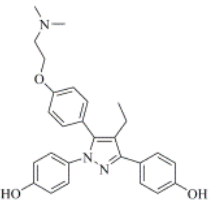
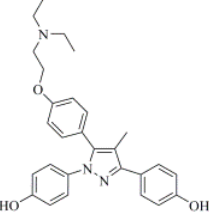
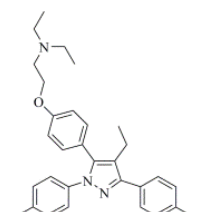
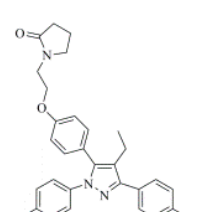
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

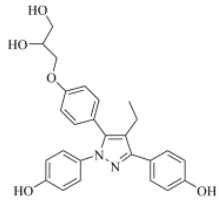
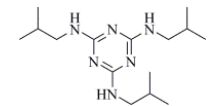
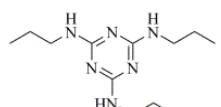
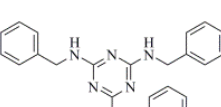
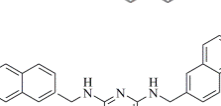
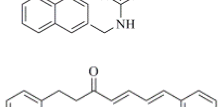
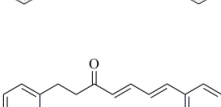
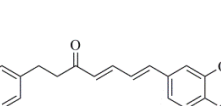
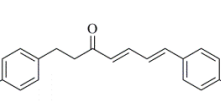
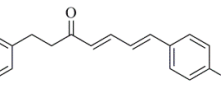
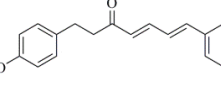
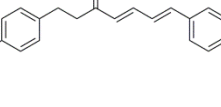
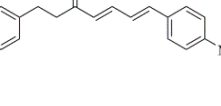
⁶LSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^bAEP, апсолутна грешка предвиђања.

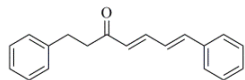
Табела ДМ10. Хемијске структуре, активност и ЛВ предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pK_i помоћу **3DPhyI/3-D QSAR** модел ансамбла и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pK_i	Пред. pK_i		Пред. pK_i		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^a	АЕР ^B	
I3-I1		7,25	6,73	0,52	7,12	0,13	330
I3-I2		9,08	8,07	1,01	7,58	1,50	330
I3-I3		9,23	7,83	1,40	4,69	4,54	330
I3-I4		8,68	7,62	1,06	8,15	0,53	330
I3-I-A1		7,57	6,75	0,82	7,70	0,13	330
I3-I-A2		8,6	6,70	1,90	7,02	1,58	331
I3-I-A3		8,36	6,78	1,58	7,27	1,09	331

I3-I-B		8,49	5,94	2,55	6,27	2,22	331
I3-I-C1		7,6	6,88	0,72	7,15	0,45	332
I3-I-C2		8,72	7,29	1,43	7,72	1,00	332
I3-I-D		8,48	7,36	1,12	8,35	0,13	332
I3-I-E1		8,42	6,60	1,82	6,82	1,60	332
I3-I-E2		8,74	7,00	1,74	7,43	1,31	332
I3-I-F		8,64	7,36	1,28	7,92	0,72	332

I3-I-G		8,37	7,17	1,20	7,48	0,89	332
I4-1a		3,19	5,69	2,50	5,95	2,76	333
I4-1b		3,1	5,13	2,03	5,47	2,37	333
I4-1c		3,39	5,28	1,89	5,60	2,21	333
I4-1e		4,49	6,20	1,71	6,60	2,11	333
I6-10		3,63	6,75	3,12	7,02	3,39	333
I6-12		5,86	3,27	2,59	3,58	2,28	333
I6-14		6,01	4,92	1,09	5,46	0,55	333
I6-15		5,63	5,03	0,60	6,26	0,63	333
I6-16		6,29	3,02	3,27	3,26	3,03	333
I6-17		5,83	5,51	0,32	5,82	0,01	333
I6-18		5,66	5,41	0,25	5,81	0,15	333
I6-19		6,04	4,84	1,20	5,05	0,99	333

I6-1



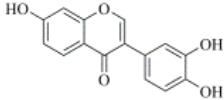
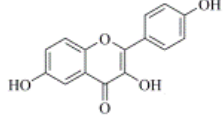
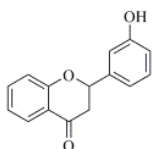
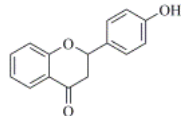
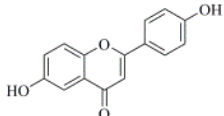
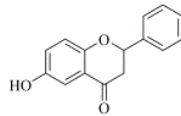
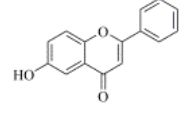
6,19 5,31 0,88 5,82 0,37 333

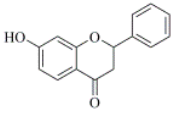
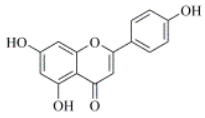
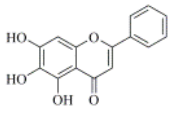
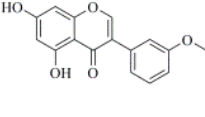
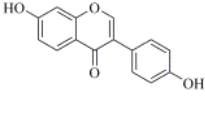
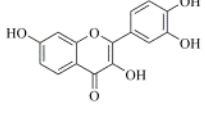
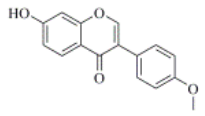
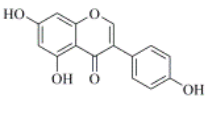
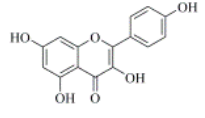
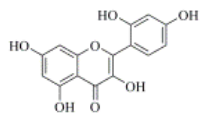
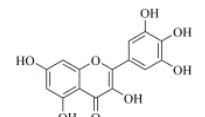
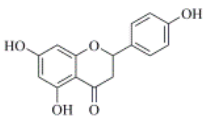
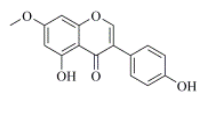
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

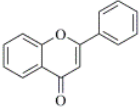
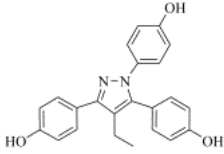
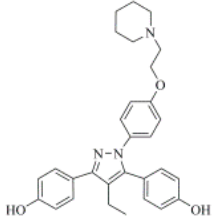
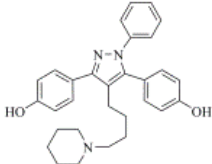
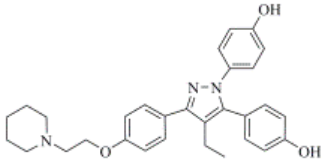
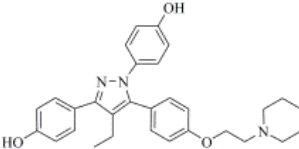
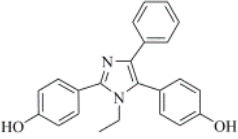
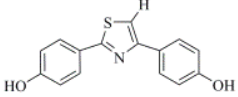
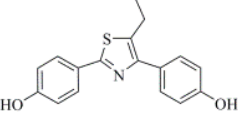
^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

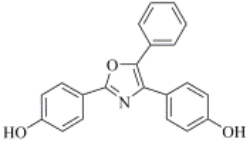
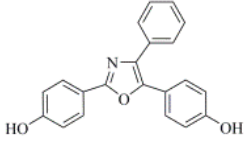
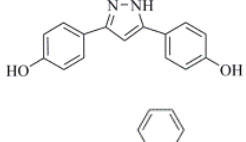
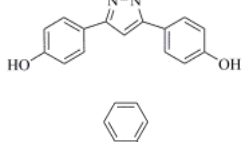
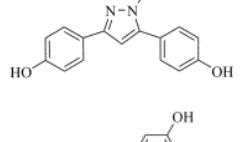
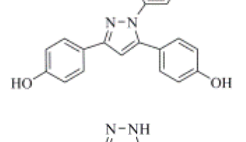
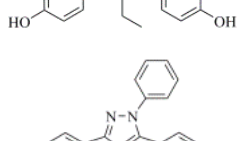
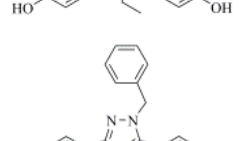
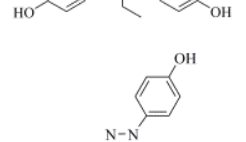
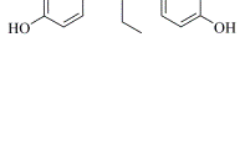
^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

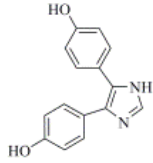
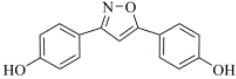
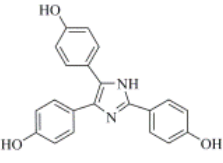
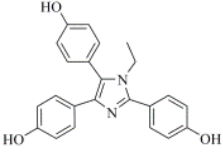
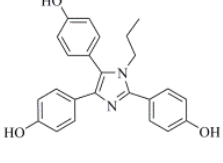
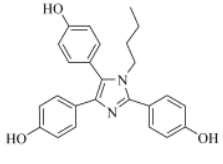
Табела ДМ11. Хемијске структуре, активност и SB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pRBA помоћу 3DPhyI/3-D QSAR модел ансамбла и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pRBA	Пред. pRBA		Пред. pRBA		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^b	LSO ^a	АЕР ^b	
3',4',7-трихидрокси изофлаван		5,35	7,24	1,89	8,52	3,17	333
3,6,4'-трихидрокси флаван		3,35	7,17	3,82	7,52	4,17	333
3'-хидроксифлаванон		5,77	6,75	0,98	6,41	0,64	333
4'-хидроксифлаванон		5,64	6,89	1,25	5,62	0,02	333
6,4'-дихидроксифлаван		3,82	6,06	2,24	6,41	2,59	333
6-хидроксифлаванон		6,05	6,97	0,92	6,52	0,47	333
6-хидроксифлаван		6,4	7,37	0,97	6,42	0,02	333

7- гидроксифлаванон		6,72	7,37	0,65	6,3	0,42	333
Апигенин		4,55	6,51	1,96	5,52	0,97	333
Бајкалеин		6,05	6,53	0,48	4,75	1,3	333
Биоканин А		5,37	8,12	2,75	7,62	2,25	333
Диазенин		4,64	7,73	3,09	6,64	2	333
Фисетин		5,35	6,6	1,25	5,63	0,28	333
Формонетин		5,89	7,74	1,85	7,41	1,52	333
Генистеин		3,35	6,69	3,34	6,52	3,17	333
Камферол		4,6	7,2	2,6	6,62	2,02	333
Морин		6,35	7,52	1,17	6,52	0,17	333
Мирицетин		5,75	6,18	0,43	4,96	0,79	333
Нарингенин		5,13	6,41	1,28	5,08	0,05	333
Прунетин		5,75	4,18	1,57	2,75	3	333

Флавон		5,35	5,52	0,17	4,4	0,95	333
I101		1,45	8,52	7,07	7,3	5,85	334
I102		3,19	8,33	5,14	7,3	4,11	334
I103		3,3	7,48	4,18	6,3	3	334
I104		3,88	8,13	4,25	6,98	3,1	334
I105		1,94	6,9	4,96	6,63	4,69	334
I912		3,6	6,85	3,25	6,43	2,83	335
I922a		5,35	8,52	3,17	8,52	3,17	335
I922b		3,35	7,52	4,17	7,52	4,17	335

I929		5,77	6,41	0,64	6,41	0,64	335
I931		5,64	5,62	0,02	5,62	0,02	335
I935a		3,82	7,33	3,51	6,41	2,59	335
I935b		6,05	7,62	1,57	6,52	0,47	335
I935c		6,4	7,37	0,97	6,42	0,02	335
I935d		6,72	7,37	0,65	6,3	0,42	335
I938a		4,55	6,51	1,96	5,52	0,97	335
I938b		6,05	6,53	0,48	4,75	1,3	335
I938c		5,37	8,12	2,75	7,62	2,25	335
I938d		4,64	7,73	3,09	6,64	2	335

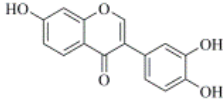
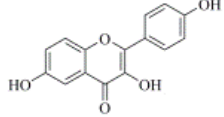
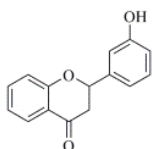
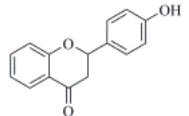
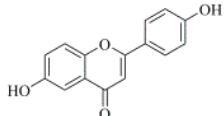
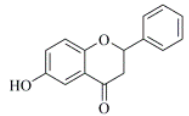
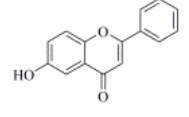
I93		5,35	6,6	1,25	5,63	0,28	335
I941		5,89	7,74	1,85	7,41	1,52	335
I96a		3,35	6,69	3,34	6,52	3,17	335
I96b		4,6	7,2	2,6	6,62	2,02	335
I96c		6,35	7,52	1,17	6,52	0,17	335
I96d		5,75	6,18	0,43	4,96	0,79	335

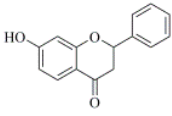
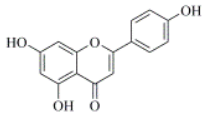
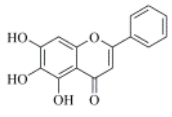
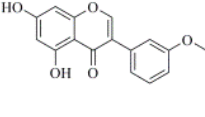
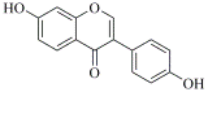
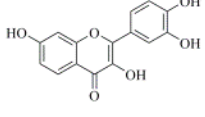
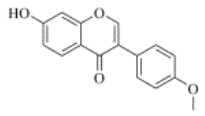
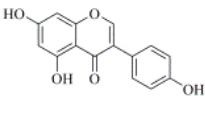
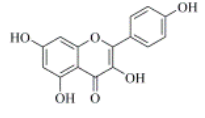
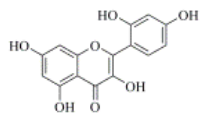
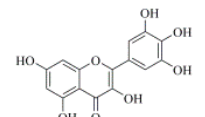
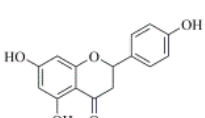
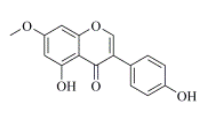
^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

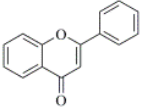
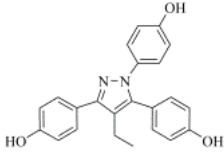
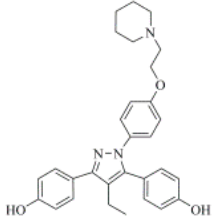
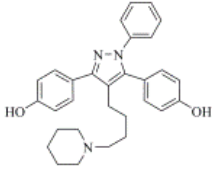
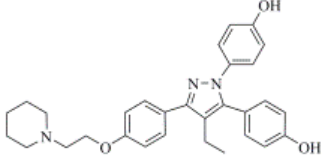
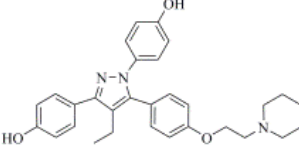
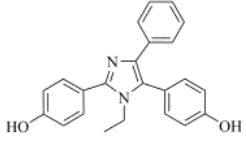
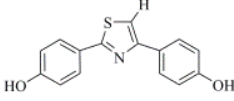
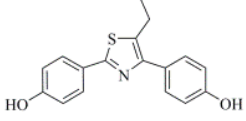
^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

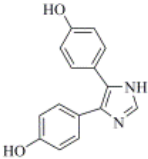
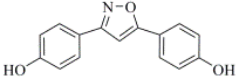
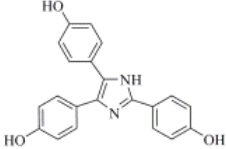
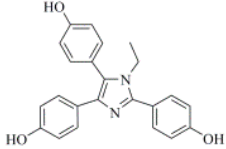
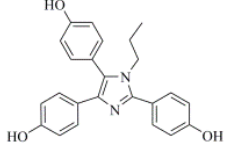
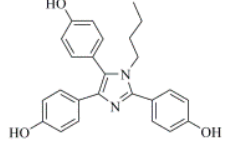
Табела ДМ12. Хемијске структуре, активност и LB предвиђања активности тест сета састављеног од једињења чија је активност у литератури изражена као pRBA помоћу **3DPhyI/3-D QSAR** модел ансамбла и leave-one-out односно leave-some-out унакрсне валидације.

Унос	Структура лиганда	pRBA	Пред. pRBA		Пред. pRBA		Реф.
			LOO ^a	АЕР ^B	LSO ^a	АЕР ^B	
3',4',7-трихидрокси изофлаван		5,35	4,77	0,59	3,76	1,59	333
3,6,4'-трихидрокси флаван		3,35	6,91	3,56	5,86	2,51	333
3'-хидроксифлаванон		5,77	4,77	1,01	3,88	1,89	333
4'-хидроксифлаванон		5,64	6,91	1,27	6,52	0,88	333
6,4'-дихидроксифлаван		3,82	6,91	3,09	6,07	2,25	333
6-хидроксифлаванон		6,05	6,91	0,86	6,09	0,04	333
6-хидроксифлаван		6,4	4,77	1,64	4,19	2,21	333

7- гидроксифлаванон		6,72	4,77	1,96	3,76	2,96	333
Апигенин		4,55	6,91	2,36	6,11	1,56	333
Бајкалеин		6,05	6,91	0,86	6,15	0,09	333
Биоканин А		5,37	6,91	1,54	6,13	0,76	333
Диазенин		4,64	8,01	3,37	6,91	2,27	333
Фисетин		5,35	8,17	2,82	7,18	1,83	333
Формонетин		5,89	6,91	1,02	6,03	0,14	333
Генистеин		3,35	7,84	4,49	7,04	3,69	333
Камферол		4,6	6,91	2,31	6,54	1,94	333
Морин		6,35	6,91	0,56	6,41	0,06	333
Мирицетин		5,75	6,91	1,16	6,63	0,88	333
Нарингенин		5,13	4,77	0,37	3,83	1,3	333
Прунетин		5,75	6,91	1,16	5,98	0,23	333

Флавон		5,35	6,44	1,09	5,08	0,27	333
I101		1,45	6,91	5,46	6,4	4,95	334
I102		3,19	4,77	1,58	3,75	0,56	334
I103		3,3	6,91	3,61	6,41	3,11	334
I104		3,88	6,91	3,03	6,63	2,75	334
I105		1,94	6,91	4,97	6,52	4,58	334
I912		3,6	6,91	3,31	6,41	2,81	335
I922a		5,35	4,77	0,59	3,76	1,59	335
I922b		3,35	6,91	3,56	5,86	2,51	335

I929		5,77	4,77	1,01	3,88	1,89	335
I931		5,64	6,91	1,27	6,52	0,88	335
I935a		3,82	6,91	3,09	6,07	2,25	335
I935b		6,05	6,91	0,86	6,09	0,04	335
I935c		6,40	4,77	1,64	4,19	2,21	335
I935d		6,72	4,77	1,96	3,76	2,96	335
I938a		4,55	6,91	2,36	6,11	1,56	335
I938b		6,05	6,91	0,86	6,15	0,09	335
I938c		5,37	6,91	1,54	6,13	0,76	335
I938d		4,64	8,01	3,37	6,91	2,27	335

I93		5,35	8,17	2,82	7,18	1,83	335
I941		5,89	6,91	1,02	6,03	0,14	335
I96a		3,35	7,84	4,49	7,04	3,69	335
I96b		4,6	6,91	2,31	6,54	1,94	335
I96c		6,35	6,91	0,56	6,41	0,06	335
I96d		5,75	6,91	1,16	6,63	0,88	335

^aLOO, leave-one-out унакрсна валидација;

^bLSO, 5-random-groups-out (K-5-Fold) унакрсна валидација;

^BAEP, апсолутна грешка предвиђања.

Табела ДМ13. Анализа студија молекулског доковања у смислу карактерисања водоничних веза са кључним аминокиселинама унутар LBD.

Једињење	Аминокиселина са јачином (дужином) водоничне везе (формиране преко специфичних функционалних фрупа једињења)					
	H3 Glu353 ($d_{\text{HВ}}$ у Å)	H6 Arg394 ($d_{\text{HВ}}$ у Å)	H3 Thr347 ($d_{\text{HВ}}$ у Å) (преко <i>p</i> -CO)	H3 Thr347 ($d_{\text{HВ}}$ у Å) (преко <i>o</i> -Ac-Ph)	H11 His524 ($d_{\text{HВ}}$ у Å)	H3 Asp351 ($d_{\text{HВ}}$ у Å)
3DPQ-1	2,951	2,830	3,244	3,431	3,937	3,083
3DPQ-2	3,051	3,244	3,914	3,546	3,640	3,122
3DPQ-3	2,891	2,839	3,316	3,254	3,958	3,222
3DPQ-4	2,949	2,829	3,234	3,441	3,998	3,347
3DPQ-5	2,993	2,824	3,262	3,553	3,972	/
3DPQ-6	2,841	2,950	3,567	3,543	3,905	/
3DPQ-7	2,891	2,817	3,175	3,352	3,394	3,922
3DPQ-8	2,862	2,651	3,962	3,144	3,925	/
3DPQ-9	2,850	2,826	3,764	3,453	3,993	3,314
3DPQ-10	2,848	2,835	3,919	3,565	3,975	/
3DPQ-11	2,863	2,931	3,892	3,445	3,981	3,136
3DPQ-12	3,032	3,533	3,972	3,753	3,431	3,112

Табела ДМ14. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз биохемијске маркере серума.

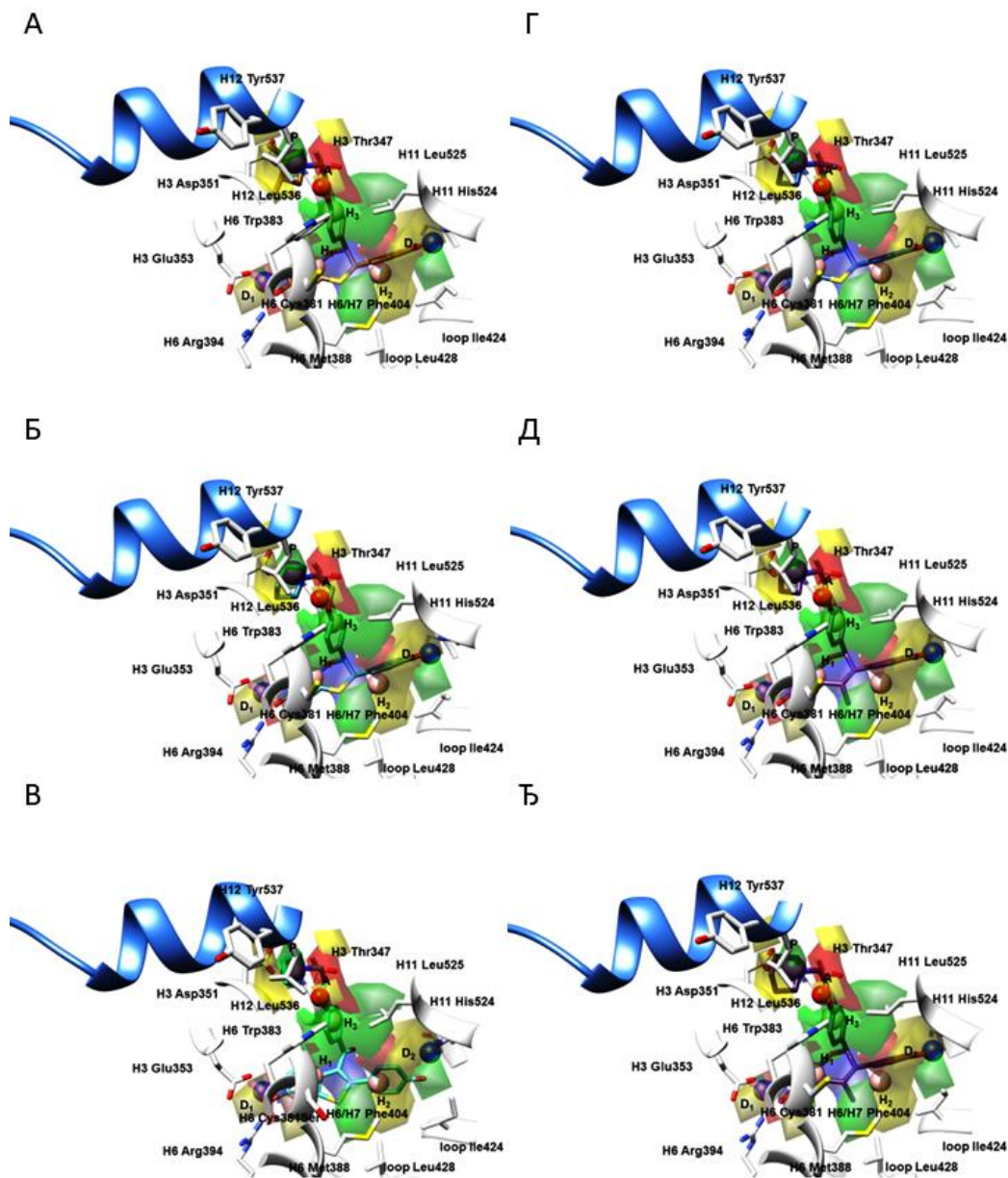
Јед.	Доза (mg/kg)	AST ^a (U/L)	ALT ^b (A/L)	ALP ^b (A/L)	γ-GT ^Г (U/L)	TBC ^Д (μmol/L)
3DPQ-1	5	44,78±0,61 ^{h,†,‡,§,⊥}	51,63±0,32 ^{*,†}	104,53±0,75 ^{*,†}	13,54±1,74 [†]	15,43±0,32 ^{†,‡}
	50	49,54±0,65 ^{†,§,⊥}	53,43±1,34 ^{*,†,§}	107,52±0,61 ^{*,†,§}	16,43±0,76 [†]	19,41±0,42 ^{†,§,⊥}
3DPQ-2	5	56,43±0,21 [†]	46,89±0,74 [†]	98,53±0,14 ^{*,†}	16,52±0,42	16,43±0,36 ^{†,‡}
	50	59,54±0,32 ^{†,§,⊥}	49,47±0,64 ^{*,†,§}	119,47±0,13 ^{*,†,§,⊥}	17,35±0,56 [*]	17,72±0,56 ^{†,§,⊥}
3DPQ-3	5	58,43±0,31 [†]	49,84±0,59 ^{†,‡,§,⊥}	87,47±0,21 ^{†,‡,§,⊥}	10,36±0,45 [†]	17,54±0,36 ^{†,‡}
	50	61,63±0,47 [†]	55,84±0,79 ^{†,§}	86,65±0,44 ^{*,†,§,⊥}	11,64±0,84 ^{†,§}	20,32±0,46 ^{†,§}
3DPQ-4	5	57,53±0,43 [†]	55,87±0,62 ^{*,†}	99,41±0,15 ^{*,†}	11,54±0,53 [†]	19,31±0,24 ^{†,‡}
	50	59,46±0,63 ^{†,§}	59,74±0,11 ^{*,†,§}	104,52±0,31 ^{*,†,§}	13,46±0,55 [†]	22,74±0,66 ^{*,†}
3DPQ-9	5	64,52±0,43 [†]	46,58±0,94 ^{†,‡,§,⊥}	125,54±0,21 ^{*,†,‡,§,⊥}	10,32±0,21 [†]	22,33±0,73 ^{*,†}
	50	69,76±0,74 ^{*,†}	51,95±0,86 ^{*,†,§}	139,42±0,31 ^{*,†,§,⊥}	12,36±0,53 [†]	24,46±0,98 ^{*,†}
3DPQ-12	5	51,54±0,74 [†]	50,99±0,84 ^{*,†}	132,67±0,43 ^{*,†,§,⊥}	13,53±0,35 [†]	19,28±0,72 ^{†,‡}
	50	52,69±0,95 ^{*,†}	59,65±0,84 ^{*,†}	121,33±0,23 ^{*,†,§,⊥}	15,54±0,83	23,43±0,76 ^{*,†}
4-ОТН.^е	5	53,76±0,32	52,44±0,31 ^{*,†}	105,32±0,31 ^{*,†,§,⊥}	16,54±0,31	23,56±0,75 ^{*,†,§,⊥}
	50	58,41±0,25 ^{*,†}	59,63±0,32 ^{*,†}	131,43±0,43 ^{*,†,§,⊥}	18,47±0,45	25,57±0,76 [*]
Ral.^ж	5	53,57±0,43 [†]	50,14±0,35 ^{*,†}	99,54±0,32 ^{*,†}	11,43±0,53 [†]	18,53±0,95 [†]
	50	58,41±0,32 ^{*,†}	52,46±0,42 ^{*,†}	106,43±0,54 ^{*,†,§,⊥}	12,35±0,31 [†]	22,46±0,98 ^{*,†}
MNU^з	50	135,43±0,54 ^{*,§,⊥}	157,31±0,31 ^{*,‡,§,⊥}	232,54±0,32 ^{*,‡,§,⊥}	19,43±0,42 ^{*,⊥}	32,34±0,52 ^{*,‡,⊥}
Control^и		46,43±0,11 ^{†,‡,§,⊥}	40,31±0,47 ^{†,‡,§,⊥}	77,43±0,22 ^{†,‡,§,⊥}	11,46±0,45 ^{†,§}	14,25±0,74 ^{†,‡,§,⊥}

^aКаталитичка активност аспартат трансминазе; ^bКаталитичка активност аланин трансминазе; ^вКаталитичка активност алкалне фосфатазе; ^ГКаталитичка активност γ-глутамилтрансферазе; ^ДУкупни садржај билирубина; ^hРезултати су представљени као средња вредност±стандардна девијација најмање три мерења; ^е**4-хидрокситамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОТН**); ^ж**Ралоксифен** (енг. **Raloxifene, Ral**); ^зметил нитрозоуреа; ^и0,9% NaCl. *p < 0,05 када се пореди са групом негативне контроле; †p < 0,05 када се пореди са MNU у концентрацији од 50 mg/kg; ‡p < 0,05 када се пореди са 4-ОТН у концентрацији од 5 mg/kg; §p < 0,05 када се пореди са 4-ОТН у концентрацији од 50 mg/kg; ⊥p < 0,05 када се пореди са Ral у концентрацији од 5 mg/kg; ⊥p < 0,05 када се пореди са Ral у концентрацији од 50 mg/kg.

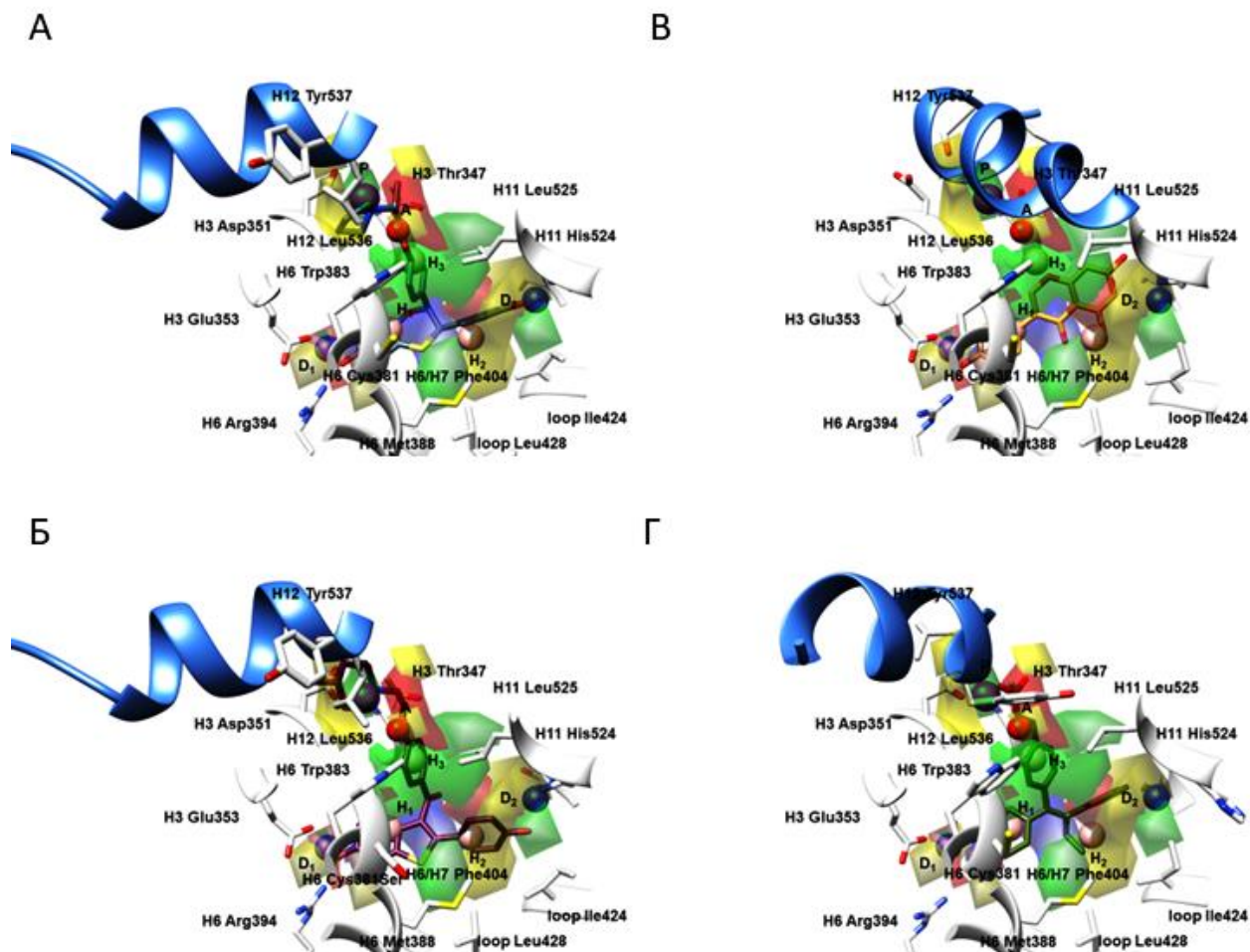
Табела ДМ15. Ефекти третмана базираног на синтетисаним једињењима на туморигенезу дојке виђени кроз маркере оксидативног оштећења јетре.

Јед.	Доза (mg/kg)	TP ^a (g/L)	GSH ^b (mg/g)	CAT ^b (μmol/mg)	SOD ^г (U/mg)	TBARS ^д (nmol/mg)
3DPQ-1	5	33,54±0,32 ^{b,†,‡,⊥}	9,54±0,53 [†]	16,21±0,77 [†]	7,65±0,63	0,96±0,04 ^{†,‡,⊥}
	50	37,21±0,43 ^{†,§,⊥}	9,35±0,45 [†]	17,35±0,56 [†]	8,83±0,51 [†]	0,65±0,32 ^{†,§,⊥}
3DPQ-2	5	36,24±0,12 ^{†,‡,⊥}	9,96±0,27 [†]	15,54±0,51 [†]	9,63±0,56	0,56±0,17 ^{†,‡,⊥}
	50	41,54±0,32 ^{†,§,⊥}	10,35±0,55 ^{†,§}	17,31±0,63 [†]	12,3±0,36 [†]	0,75±0,21 ^{†,§,⊥}
3DPQ-3	5	38,32±0,19 ^{*,†}	9,15±0,77 [†]	17,46±0,82 [†]	7,32±0,18	0,24±0,13 ^{†,‡,⊥}
	50	46,47±0,46 [*]	9,74±0,45 [†]	18,32±0,63 [†]	11,46±0,36 [†]	0,56±0,32 ^{†,§,⊥}
3DPQ-4	5	43,53±0,51 ^{*,†}	9,87±0,52	16,34±0,73 [†]	8,73±0,38	0,65±0,21 ^{†,‡,⊥}
	50	48,54±0,31 [*]	10,36±0,46 [†]	16,43±0,66 [†]	10,57±0,73	0,65±0,34 ^{†,§,⊥}
3DPQ-9	5	39,31±0,22 ^{†,‡,⊥}	8,66±0,45	10,83±0,46	7,74±0,37	0,96±0,21 ^{†,‡,⊥}
	50	39,43±0,14 ^{†,§}	8,89±0,63	13,32±0,54 ^{†,§}	14,43±0,35 [†]	0,96±0,24 ^{*,†,§,⊥}
3DPQ-12	5	336,12±0,78 ^{†,‡,⊥}	8,96±0,22	14,55±0,51 [†]	5,43±0,25	0,92±0,18 ^{†,‡,⊥}
	50	389,35±0,32 [†]	9,02±0,57 [†]	19,46±0,75 [†]	13,32±0,43 [†]	1,05±0,34 ^{†,§,⊥}
4-ОТН.^е	5	43,43±0,67 ^{*,†}	4,67±0,25 [*]	13,56±0,88 [†]	4,87±0,72	12,84±0,21 ^{*,†}
	50	47,46±0,25 [*]	3,33±0,56 [*]	20,46±0,76 ^{*,†,⊥}	7,46±0,34	3,63±0,32 ^{*,⊥}
Ral.^ж	5	42,67±0,32 ^{*,†}	6,65±0,21	10,73±0,32 [†]	6,89±0,56	2,31±0,56 [†]
	50	44,43±0,22 [*]	5,54±0,36	14,43±0,56 [†]	8,46±0,23 [†]	2,63±0,21 ^{†,§}
MNU^з	50	51,32±0,43 ^{*,⊥}	2,23±0,32 [*]	3,08±0,68 ^{*,‡,§,⊥}	3,32±0,14 [⊥]	3,31±0,72 ^{*,‡,⊥}
Контрола^и		31,36±0,84 ^{†,‡,§,⊥}	7,43±0,31 [†]	14,21±0,65 [†]	9,34±0,12	1,61±0,05 ^{†,‡,§,⊥}

^aУкупни садржај протеина; ^bКонцентрација редукованог глутатиона; ^вКаталитичка активност каталазе; ^гКаталитичка активност супероксид дисмутазе; Садржај реактивних супстанци тиобарбитурне киселине; ^дРезултати су представљени као средња вредност±стандардна девијација најмање три мерења; ^е**4-хидрокси тамоксифен** (енг. **4-hydroxytamoxifen, 4-ОТН**); ^ж**Ралоксифен** (енг. **Raloxifene, Ral**); ^зметил нитрозоуреа; ^и0,9% NaCl. *p < 0,05 када се пореди са групом негативне контроле; †p < 0,05 када се пореди са MNU у концентрацији од 50 mg/kg; ‡p < 0,05 када се пореди са 4-ОТН у концентрацији од 5 mg/kg; §p < 0,05 када се пореди са 4-ОТН у концентрацији од 50 mg/kg; ⊥p < 0,05 када се пореди са Ral у концентрацији од 5 mg/kg; ⊥p < 0,05 када се пореди са Ral у концентрацији од 50 mg/kg.

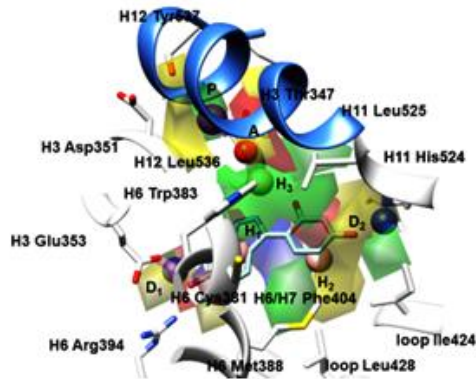


Слика ДМ1. Фармакофорне особине 3-D PhypI хипотезе (**D**: доноси водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **H**: хидрофобне особине, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS*-коэффицијента 3-D QSAR модела (**ЗЕЛЕНИ***PLS*-коэффицијенти: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS*-коэффицијенти: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS*-коэффицијенти: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS*-коэффицијенти: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза неповољно утичу на активност за **1XP6** (A); **1SJ0** (B); **2R6Y** (B); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

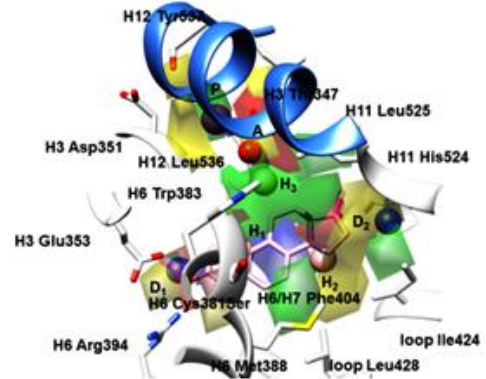


Слика ДМ2. Фармакофорне особине **3-D PhypI** хипотезе (**D**: донори водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **H**: хидрофобне особине, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS*-коэффицијента **3-D QSAR** модела (**ЗЕЛЕНИ***PLS*-коэффицијенти: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS*-коэффицијенти: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS*-коэффицијенти: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS*-коэффицијенти: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза неповољно утичу на активност за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

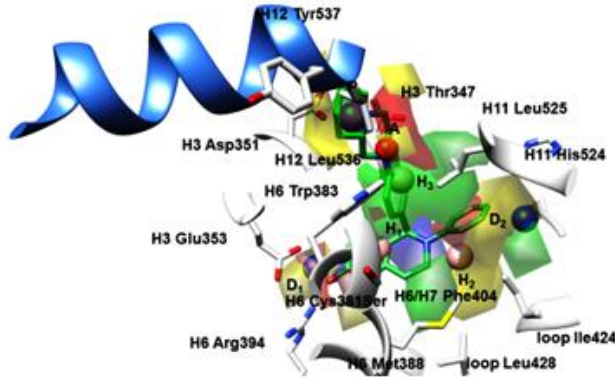
A



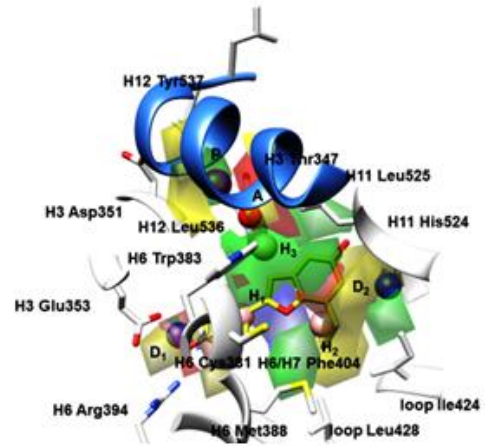
B



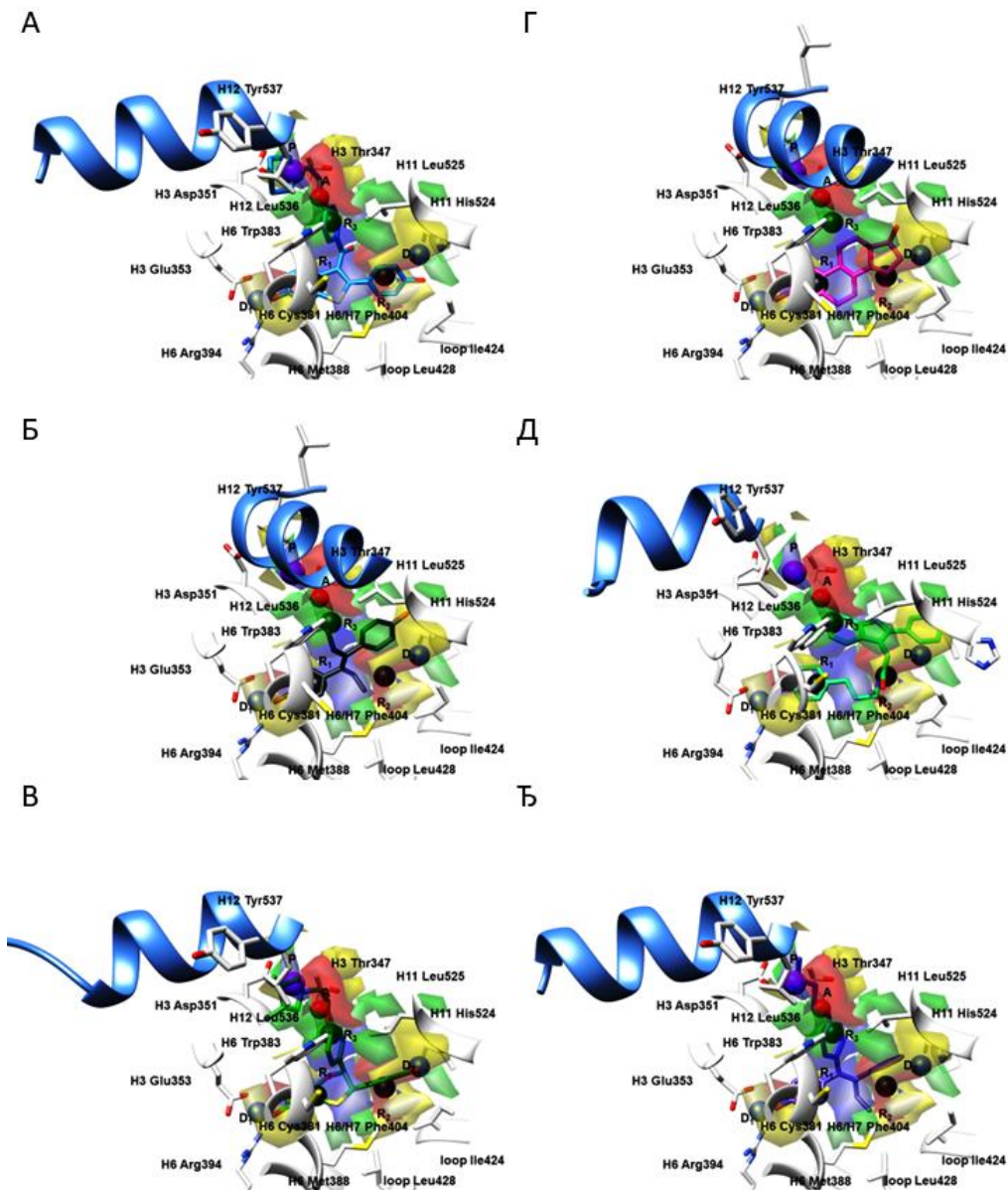
Б



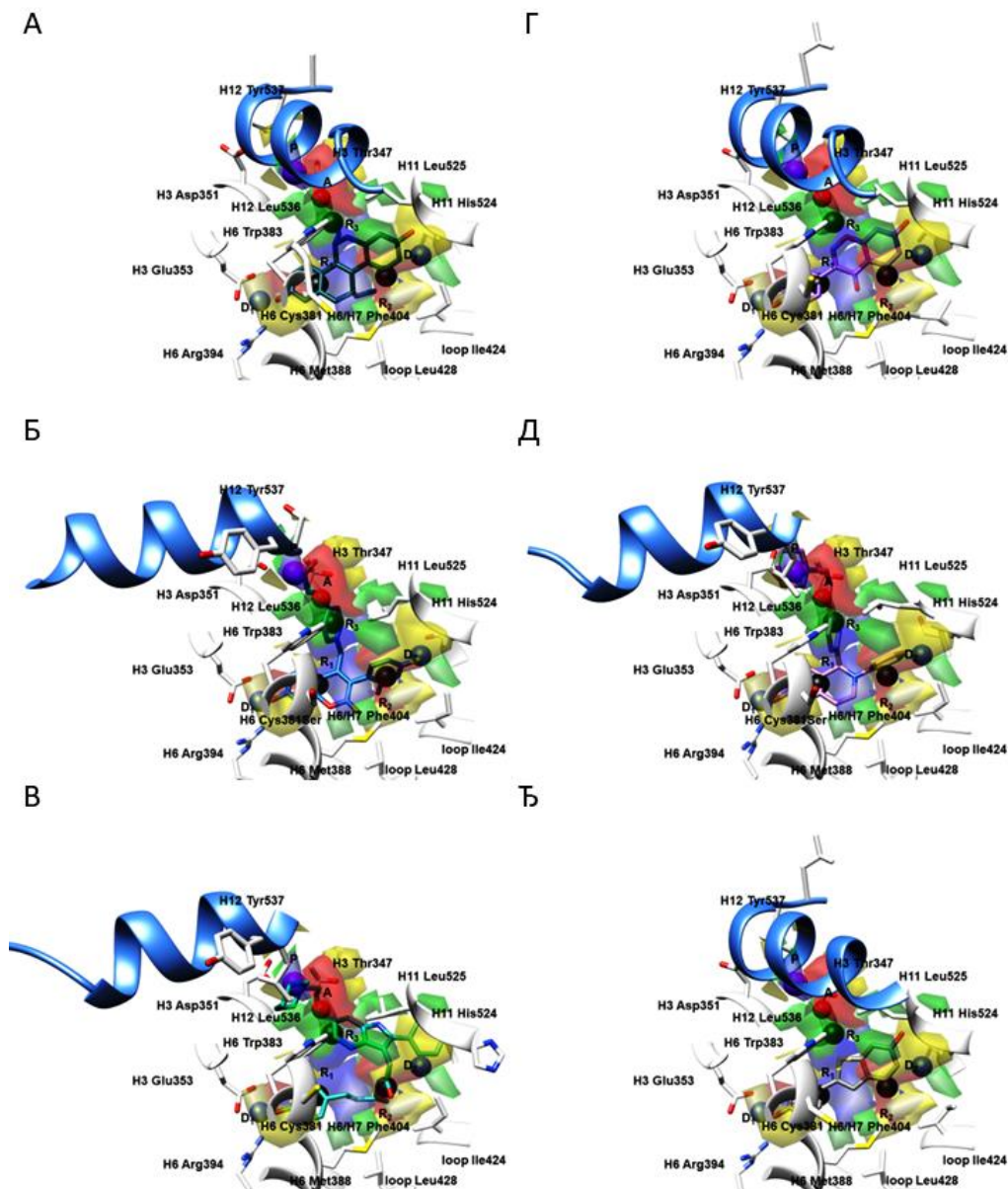
Г



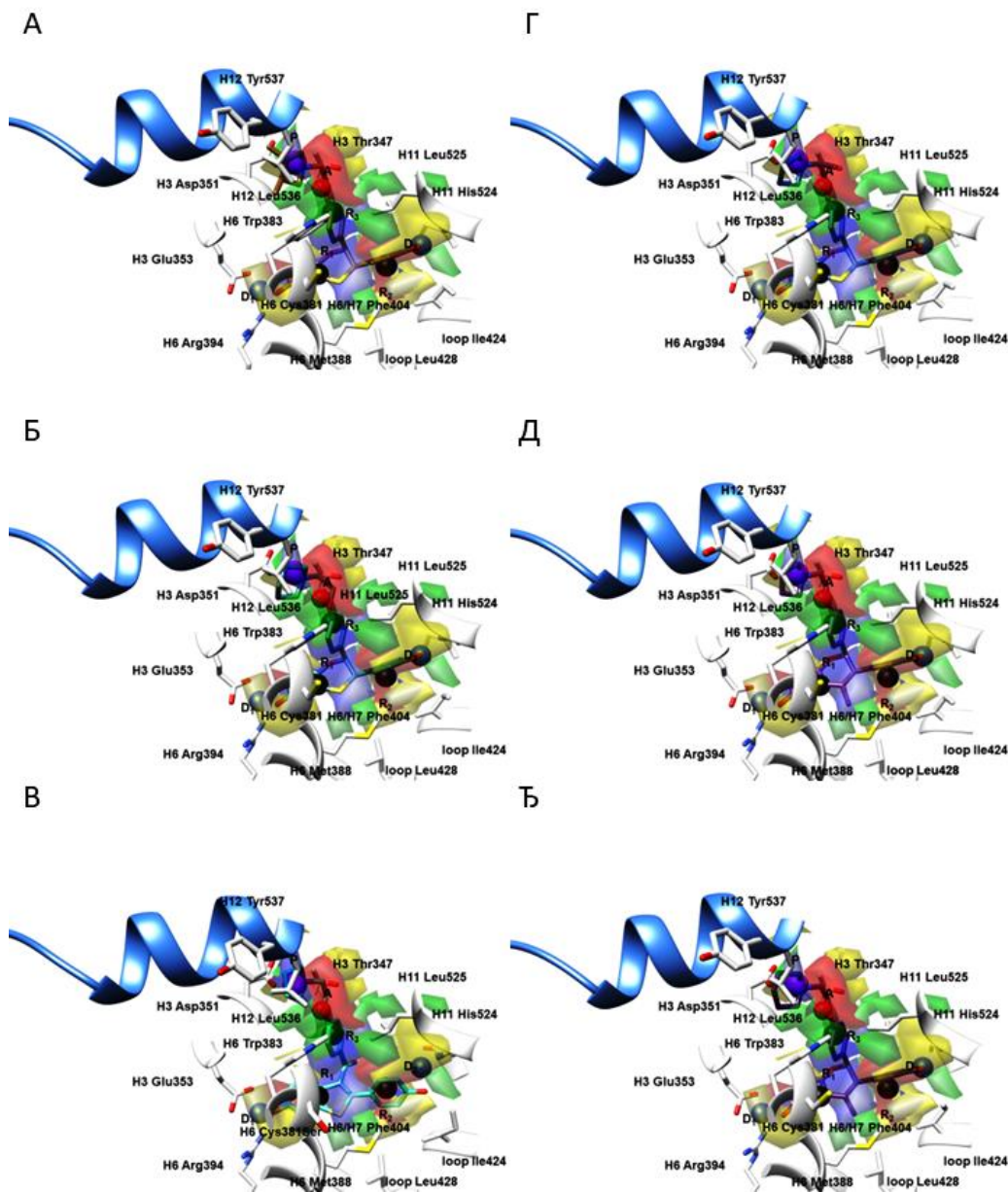
Слика ДМ3. Фармакофорне особине **3-D PhypI** хипотезе (**D**: доноси водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **H**: хидрофобне особине, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS*-кофицијената **3-D QSAR** модела (**ЗЕЛЕНИ***PLS*-кофицијенти: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS*-кофицијенти: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS*-кофицијенти: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS*-кофицијенти: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза неповољно утичу на активност за **2QA6** (A); **1XQC** (Б); **2B1Z** (B); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



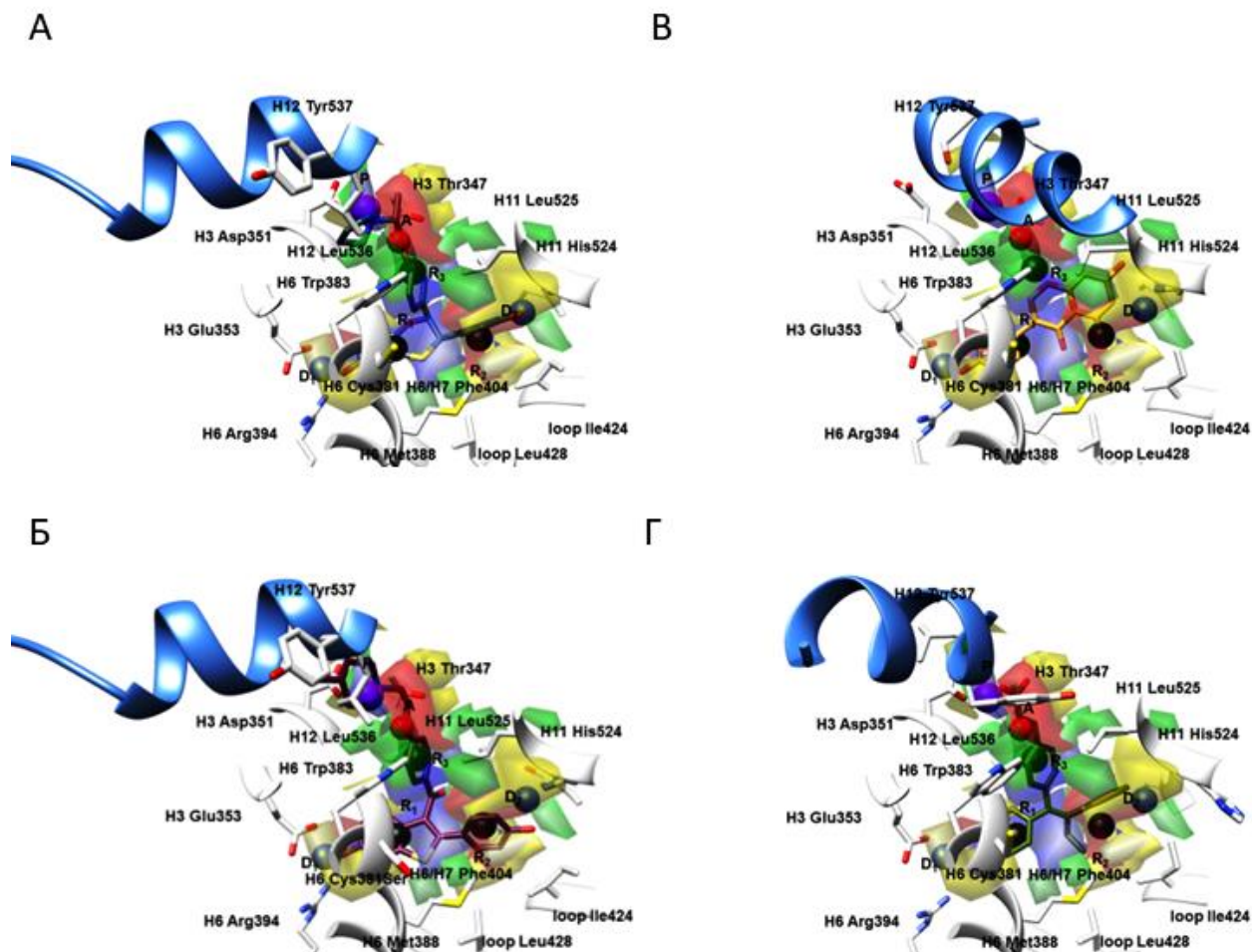
Слика ДМ4. Фармакофорне особине **3-D PhypII** хипотезе (**D**: доноси водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **R**: особине ароматичних прстенова, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS*-кофицијената **3-D QSAR** модела (**ЗЕЛЕНИ***PLS*-кофицијенти: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS*-кофицијенти: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS*-кофицијенти: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS*-кофицијенти: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза неповољно утичу на активност за **1ERR** (А); **3ERD** (Б); **1XP1** (В); **1ERE** (Г); **2ЮК** (Д); **2БЈ4** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ5. Фармакофорне особине **3-D PhypII** хипотезе (**D**: доноси водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **R**: особине ароматичних прстенова, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS*-коэффицијента **3-D QSAR** модела (**ЗЕЛЕНИ***PLS*-коэффицијенти: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS*-коэффицијенти: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS*-коэффицијенти: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS*-коэффицијенти: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза неповољно утичу на активност за **1L2I** (А); **5AK2** (Б); **2IOG** (В); **1X7R** (Г); **1UOM** (Д); **1GWQ** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

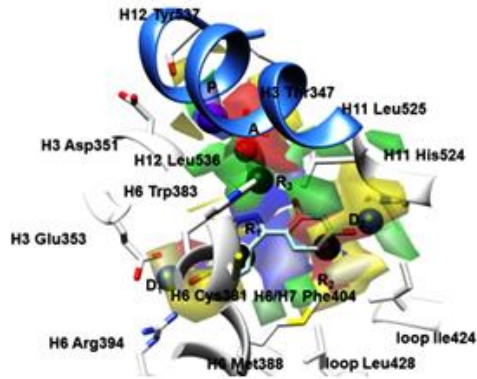


Слика ДМ6. Фармакофорне особине **3-D PhyPII** хипотезе (**D**: доноси водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **R**: особине ароматичних прстенова, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS*-кофицијената **3-D QSAR** модела (**ЗЕЛЕНИ***PLS*-кофицијенти: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS*-кофицијенти: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS*-кофицијенти: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS*-кофицијенти: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза неповољно утичу на активност за **1XP6** (A); **1SJ0** (B); **2R6Y** (B); **1XP9** (Г); **1YIM** (Д); **1YIN** (Ђ). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

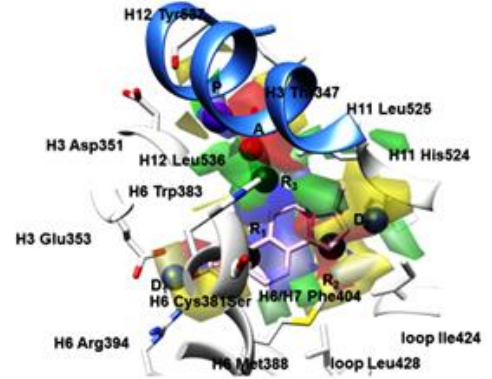


Слика ДМ7. Фармакофорне особине **3-D PhyрII** хипотезе (**D**: донори водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **R**: особине ароматичних прстенова, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS-коэффицијента* **3-D QSAR** модела (**ЗЕЛЕНИ***PLS-коэффицијенти*: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS-коэффицијенти*: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS-коэффицијенти*: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS-коэффицијенти*: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и донори водоничних веза неповољно утичу на активност за **1XPC** (А); **2R6W** (Б); **2QA8** (В); **1R5K** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

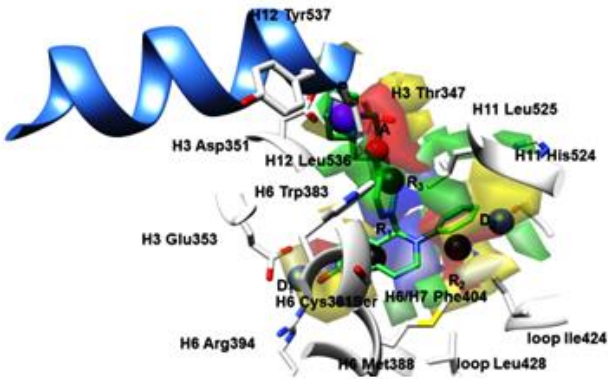
A



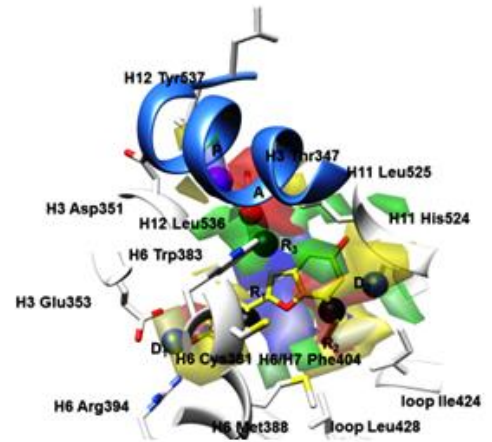
B



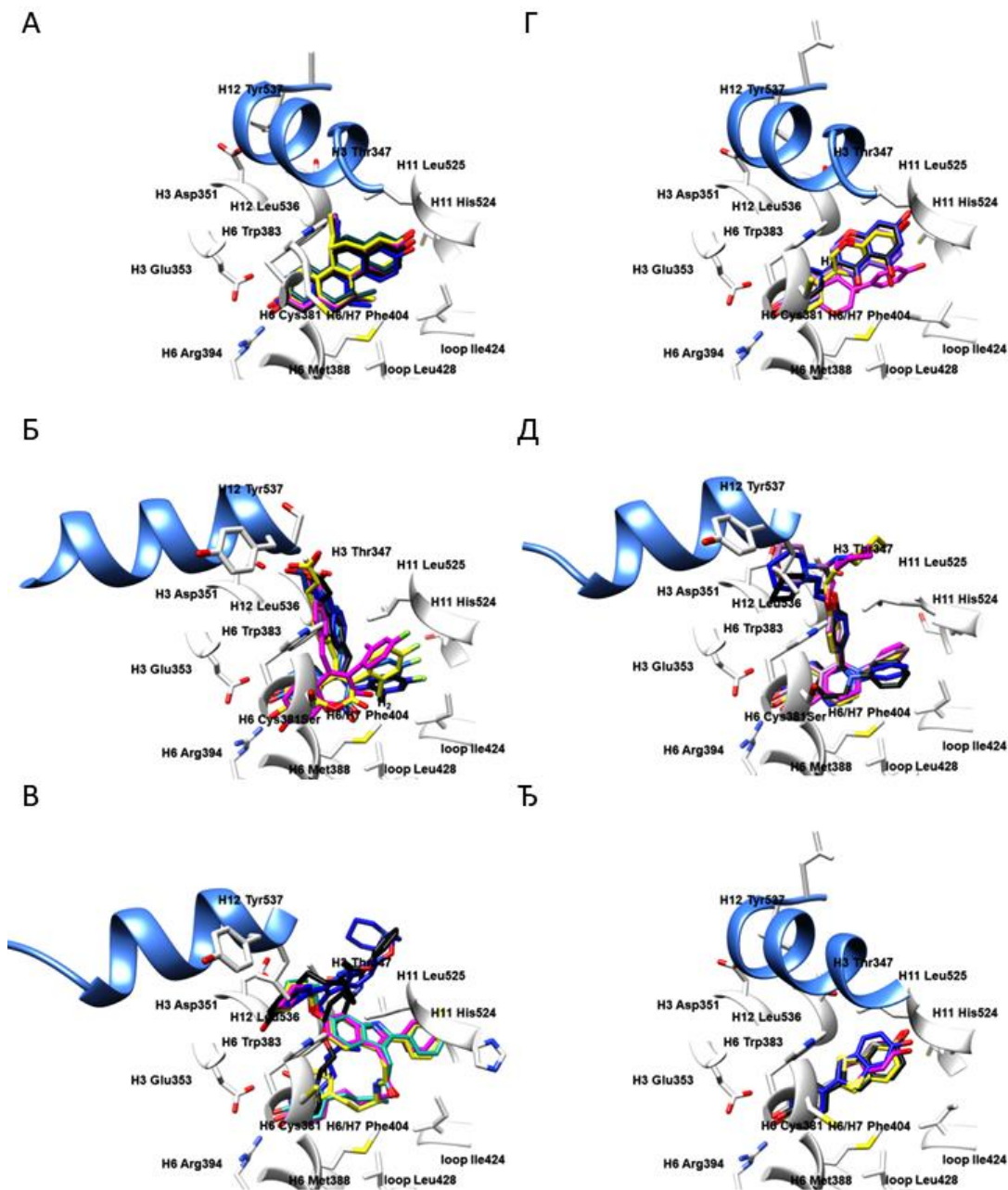
Б



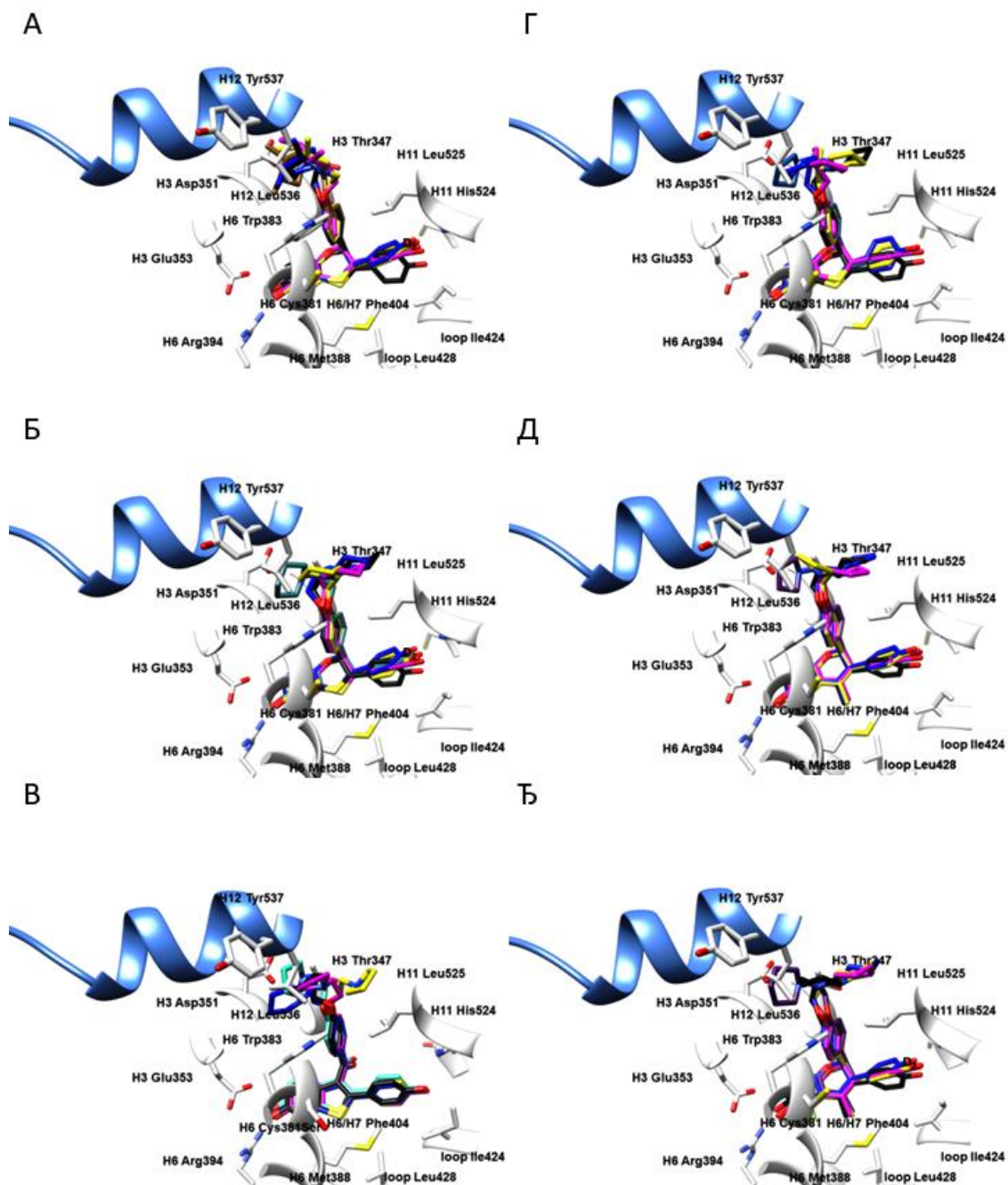
Г



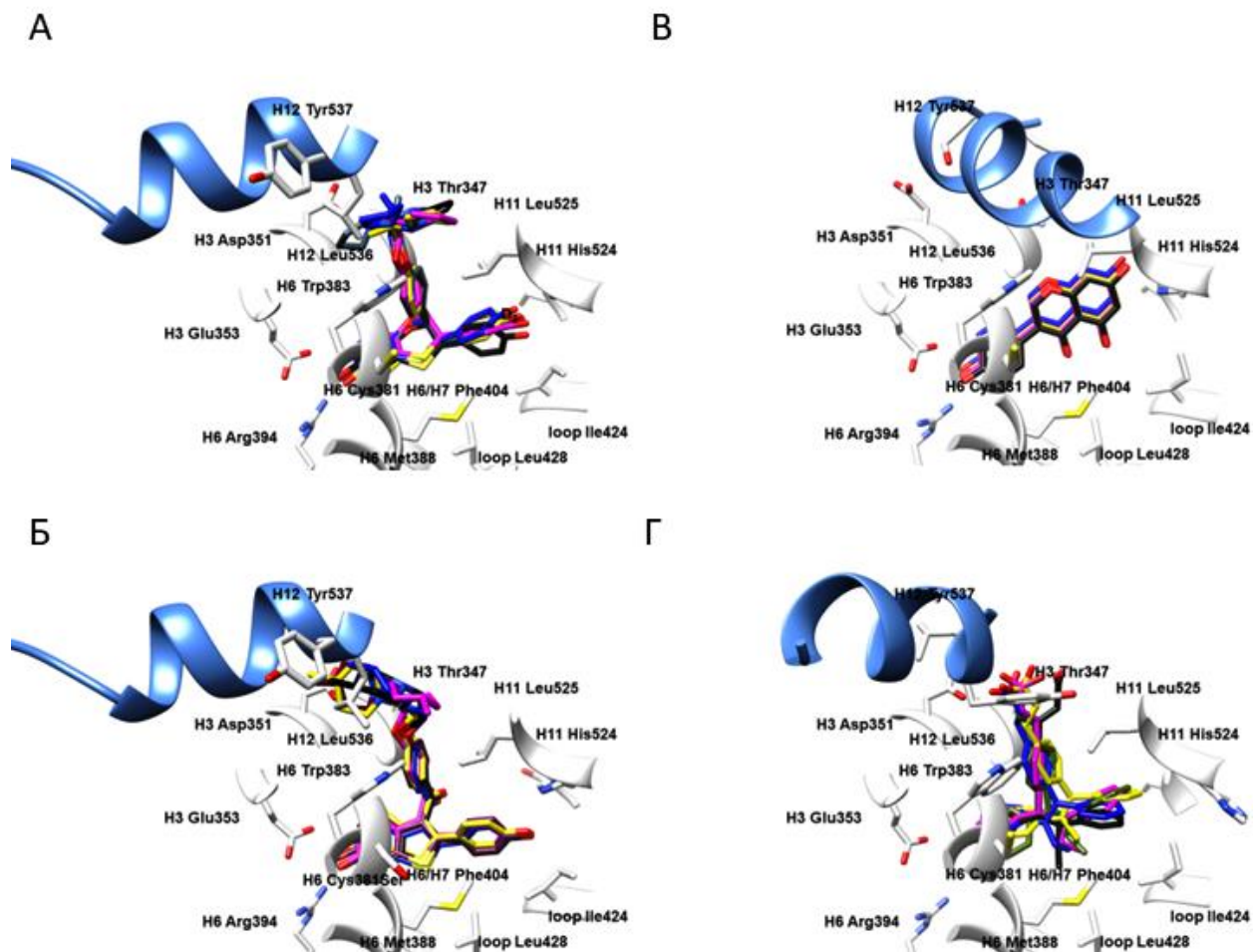
Слика ДМ8. Фармакофорне особине **3-D PhypII** хипотезе (**D**: доноси водоничне везе, **A**: акцептори водоничне везе, **R**: особине ароматичних прстенова, **P**: позитивне јонизујуће особине) и мапе *PLS*-коэффицијента **3-D QSAR** модела (**ЗЕЛЕНИ***PLS*-коэффицијенти: позитивне стерне интеракције, **ЖУТИ***PLS*-коэффицијенти: негативне стерне интеракције, **ПЛАВИ***PLS*-коэффицијенти: региони где позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза повољно утичу на активност, док негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза неповољно утичу на активност, **ЦРВЕНИ***PLS*-коэффицијенти: региони где негативно наелектрисане функционалне групе и акцептори водоничних веза позитивно утичу на активност, док позитивно наелектрисане функционалне групе и доноси водоничних веза неповољно утичу на активност за **2QA6** (A); **1XQC** (Б); **2B1Z** (B); **1X7E** (Г). Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ9. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Glide: **1L2I** (A), EC тамно плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **5AK2** (Б), EC тамно плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **2IOG** (B), EC тамно зелена, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1X7R** (Г), EC љубичаста, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1UOM** (Д), EC љубичаста, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; и **1GWQ** (Ђ) EC сиво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

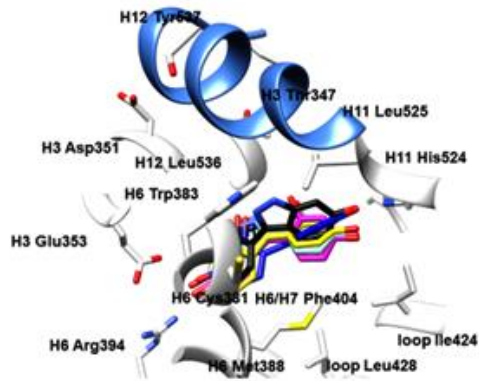


Слика ДМ10. Процена способности репродукције биоактивних конформација лигананда ER α помоћу програма Glide: **1XP6** (A), EC браон, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1SJ0** (Б), EC тамно плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **2R6Y** (B), EC светло плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1XP9** (Г), EC плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1YIM** (Д), EC љубичаста, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; и **1YIN** (Ђ) EC љубичасто, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

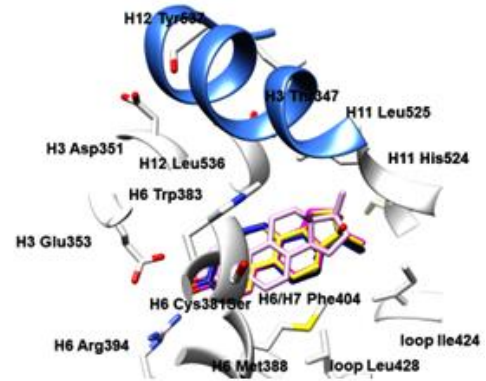


Слика ДМ11. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α помоћу програма Glide: **1XPC** (A), EC сиво, ECRD жуто, RCRD магента ECCD плаво, RCCD црно; **2R6W** (Б), EC тамно црвено, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **2QA8** (В), EC наранцасто, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; и **1R5K** (Г) EC тамно сиво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

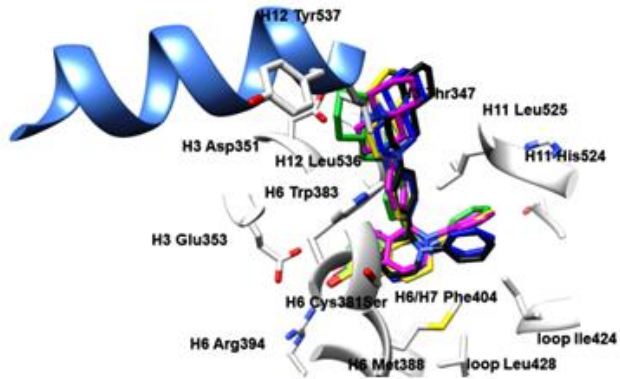
A



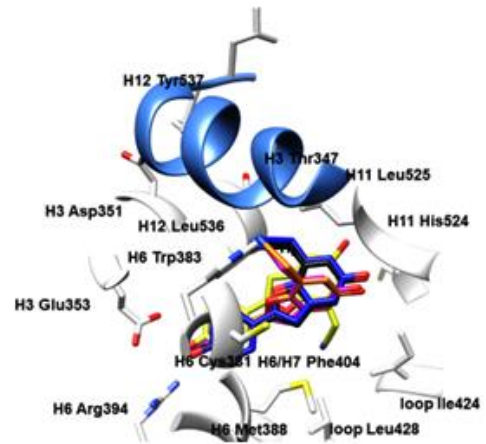
B



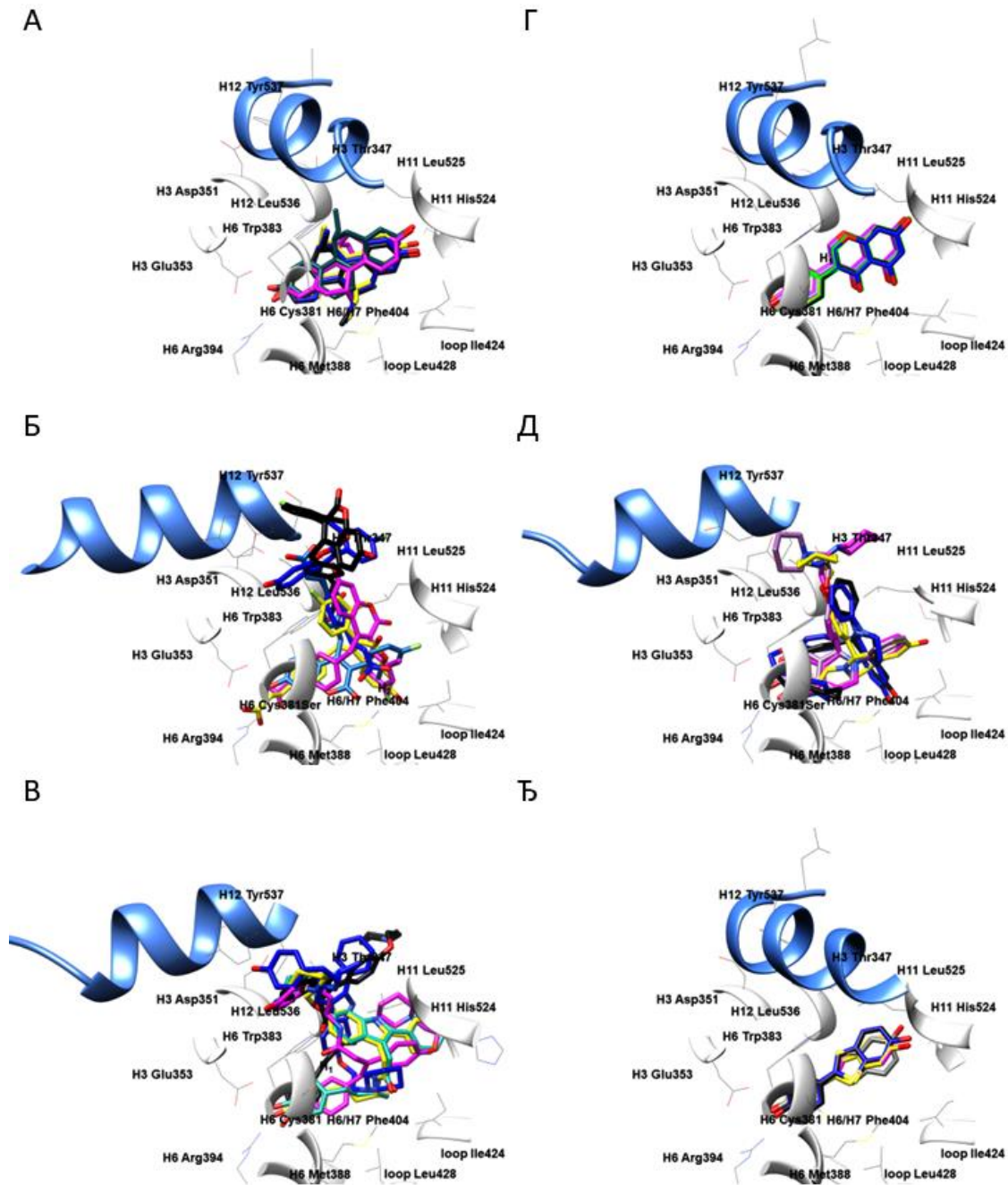
Б



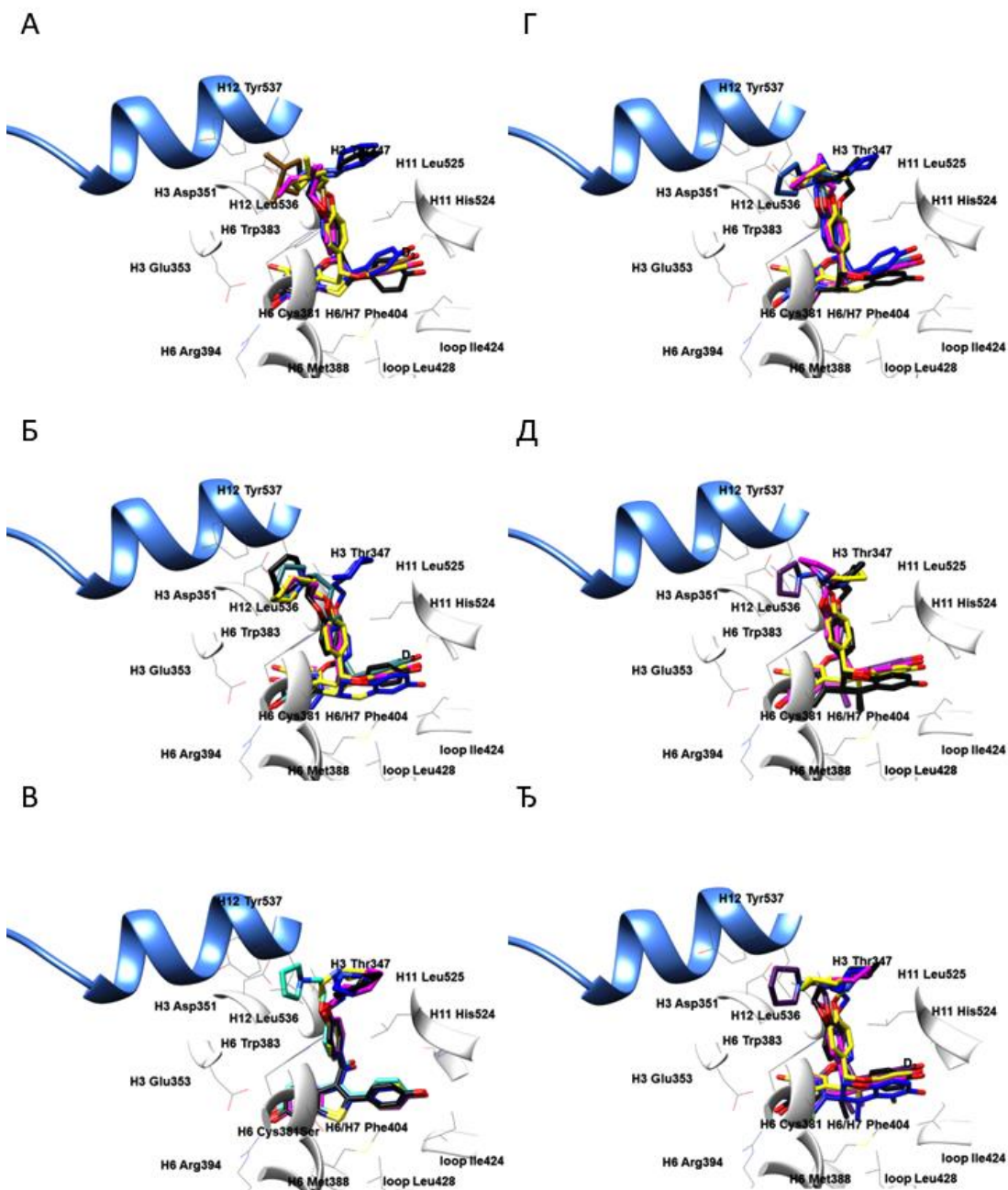
Г



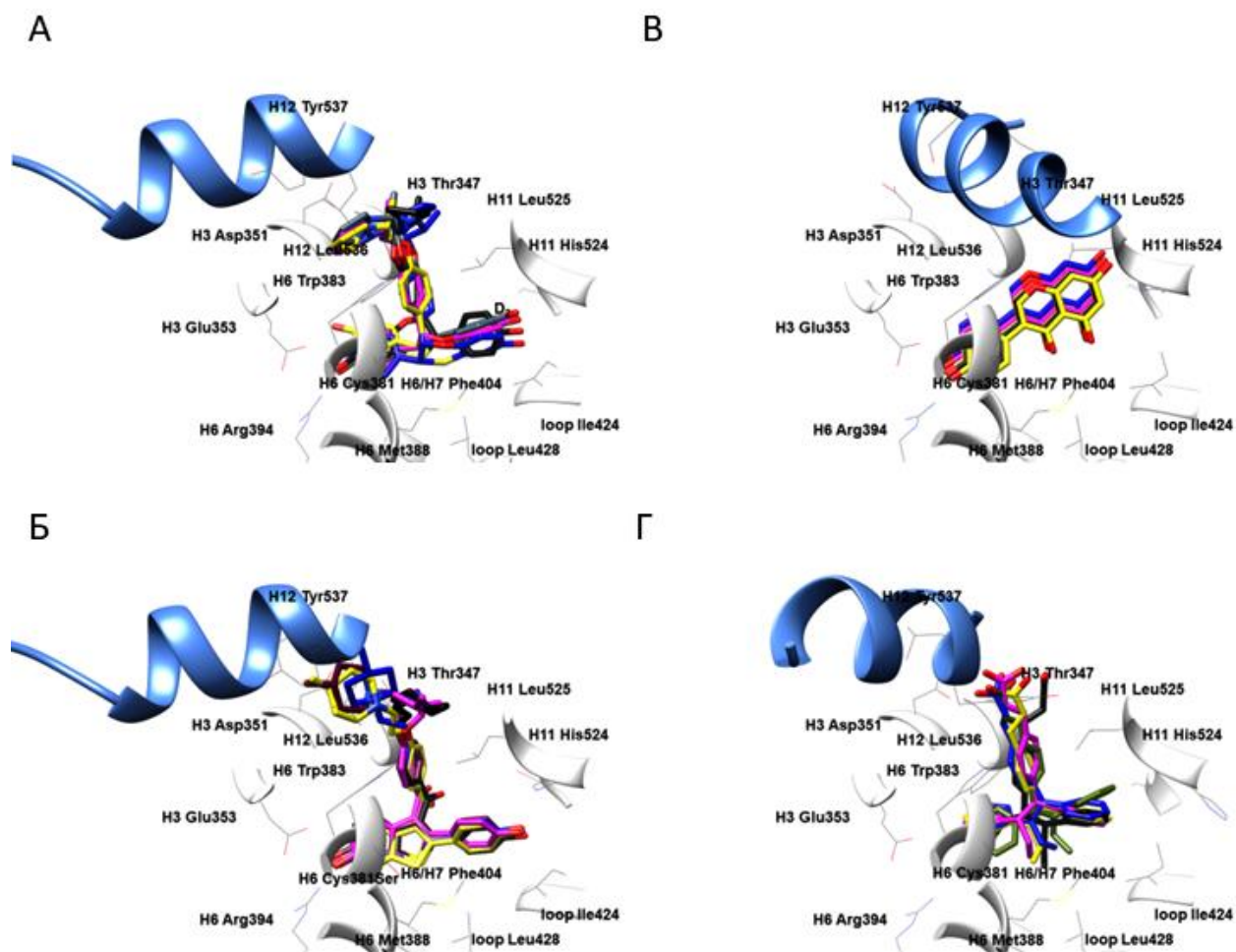
Слика ДМ12. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α помоћу програма Glide: **2QA6** (A), EC светло плаво, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **1XQC** (Б), EC светло зелено, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; **2B1Z** (B), EC светло ружичасто, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно; и **1X7E** (Г) EC жуто, ECRD жуто, RCRD магента, ECCD плаво, RCCD црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



Слика ДМ13. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α виртуелно поравњаних у активном центру ER α помоћу програма FLA: **1L2I** (А), ЕС тамно плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **5AK2** (Б), ЕС тамно плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **2IOG** (В), ЕС тамно зелено, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1X7R** (Г), ЕС љубичасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1UOM** (Д), ЕС љубичасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1GWQ** (Ђ) ЕС сиво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

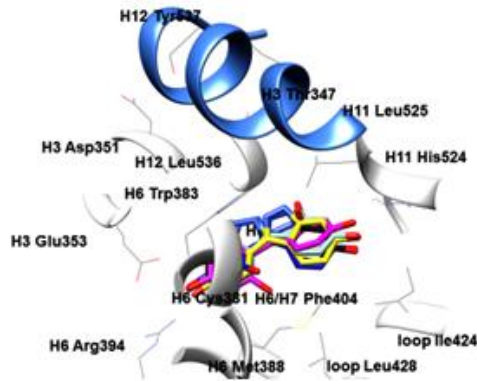


Слика ДМ14. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганда ER α виртуелно поравњаних у активном центру ER α помоћу програма FLA: **1XP6** (А), ЕС браон, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1SJ0** (Б), ЕС тамно плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **2R6Y** (В), ЕС светло плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1XP9** (Г), ЕС плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1YIM** (Д), ЕС љубичасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; и **1YIN** (Ђ) ЕС љубичасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

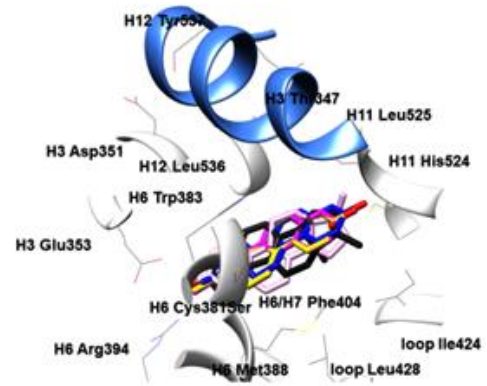


Слика ДМ15. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α виртуелно поравњаних у активном центру ER α помоћу програма FLA: **1XPC** (A), EC сиво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **2R6W** (Б), EC тамно црвено, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **2QA8** (B), EC наранџасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; и **1R5K** (Г) EC тамно зелено, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.

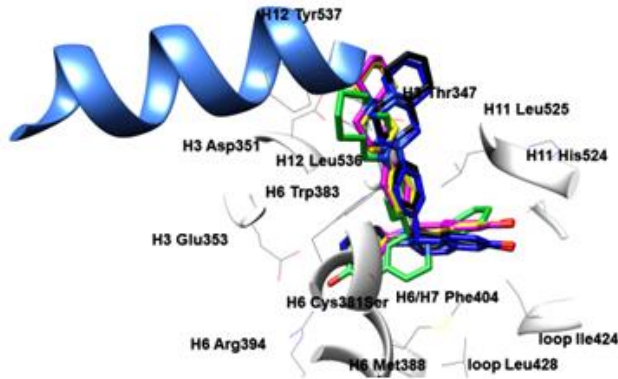
A



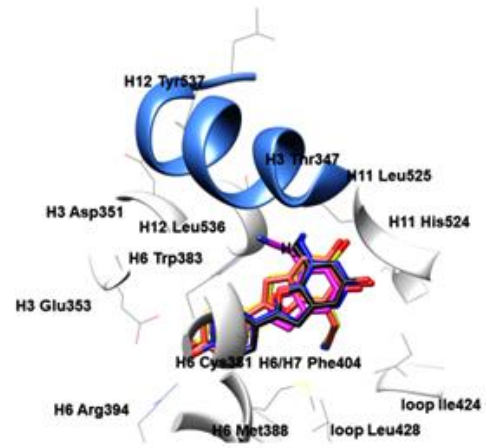
B



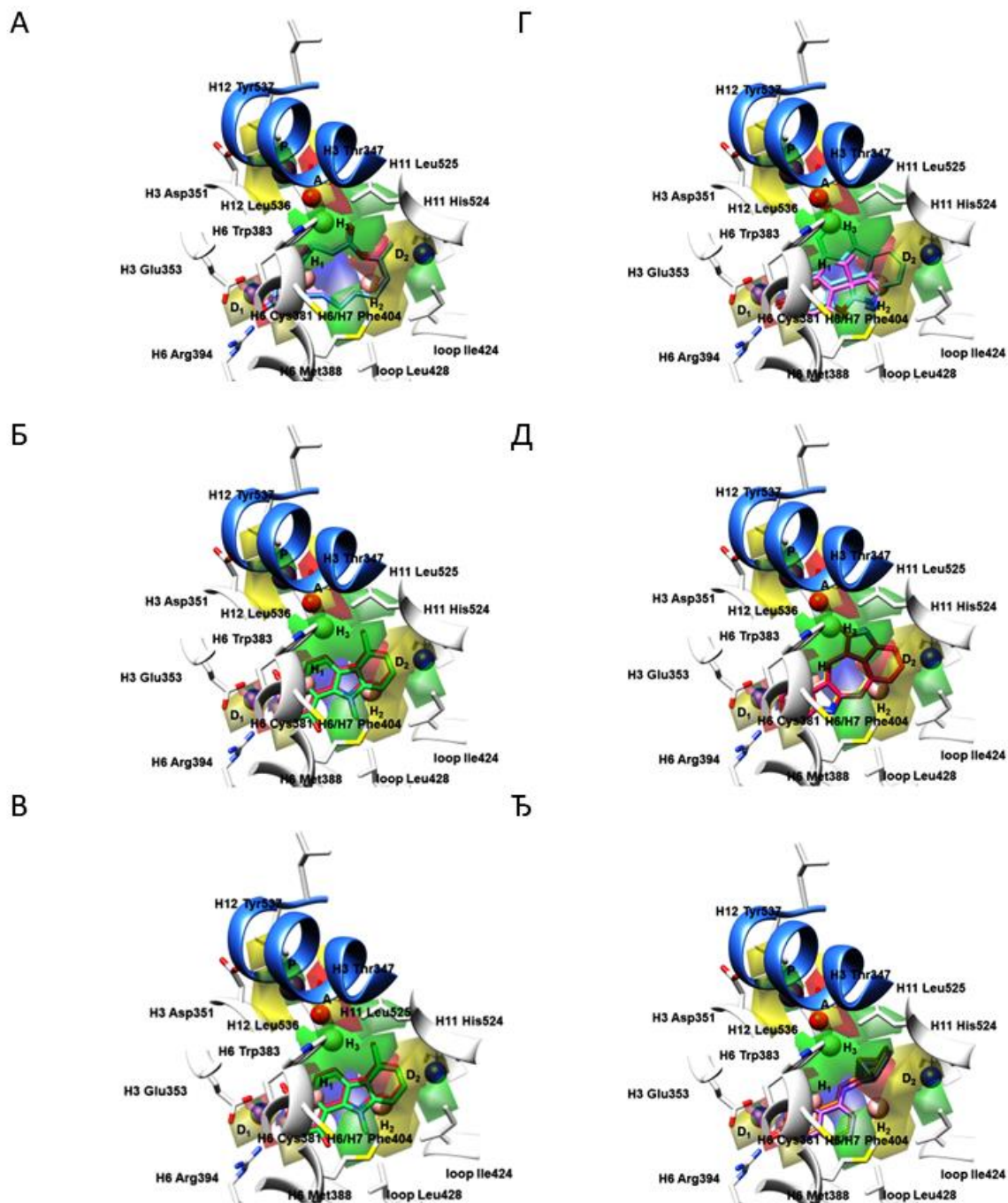
Б



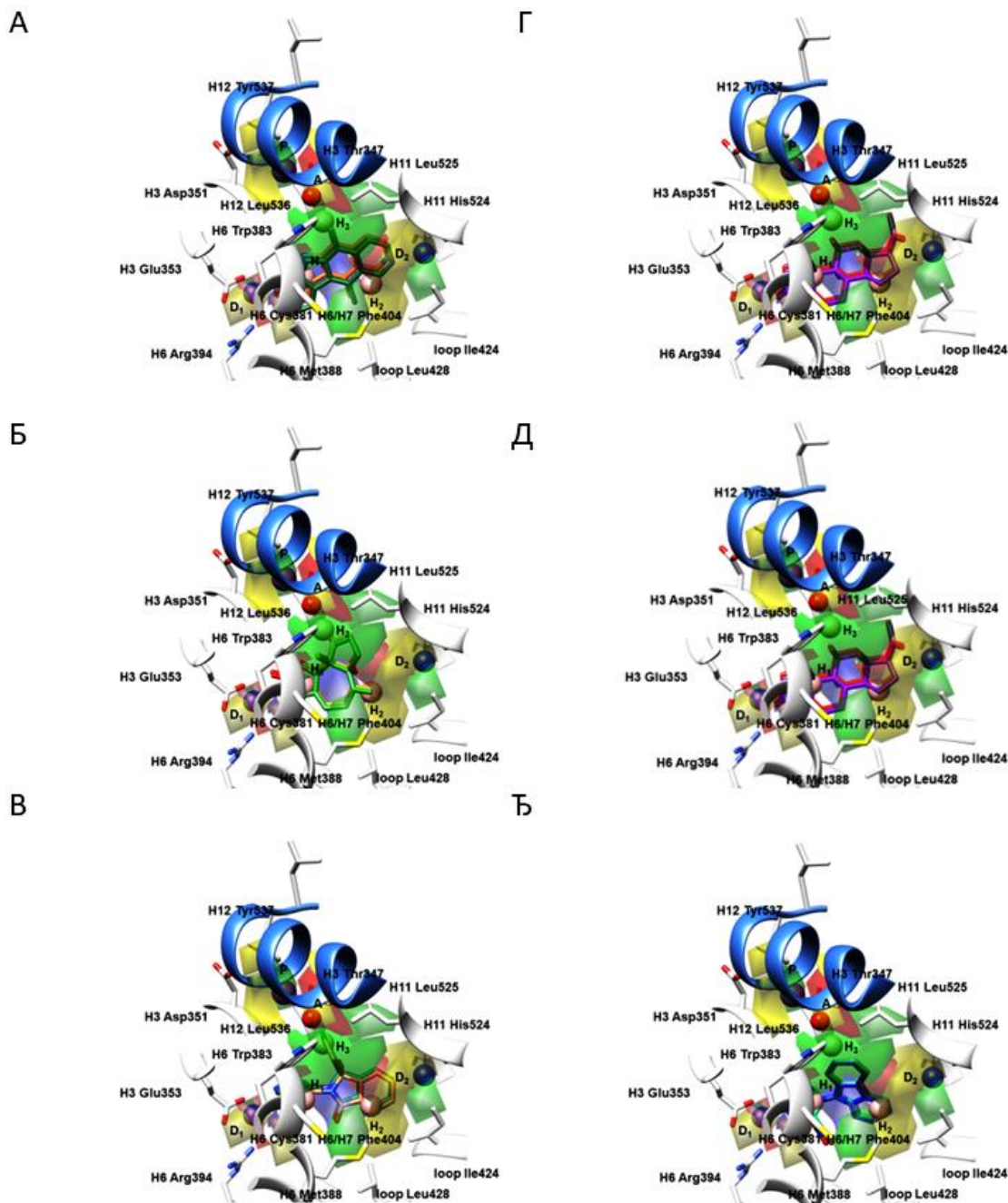
Г



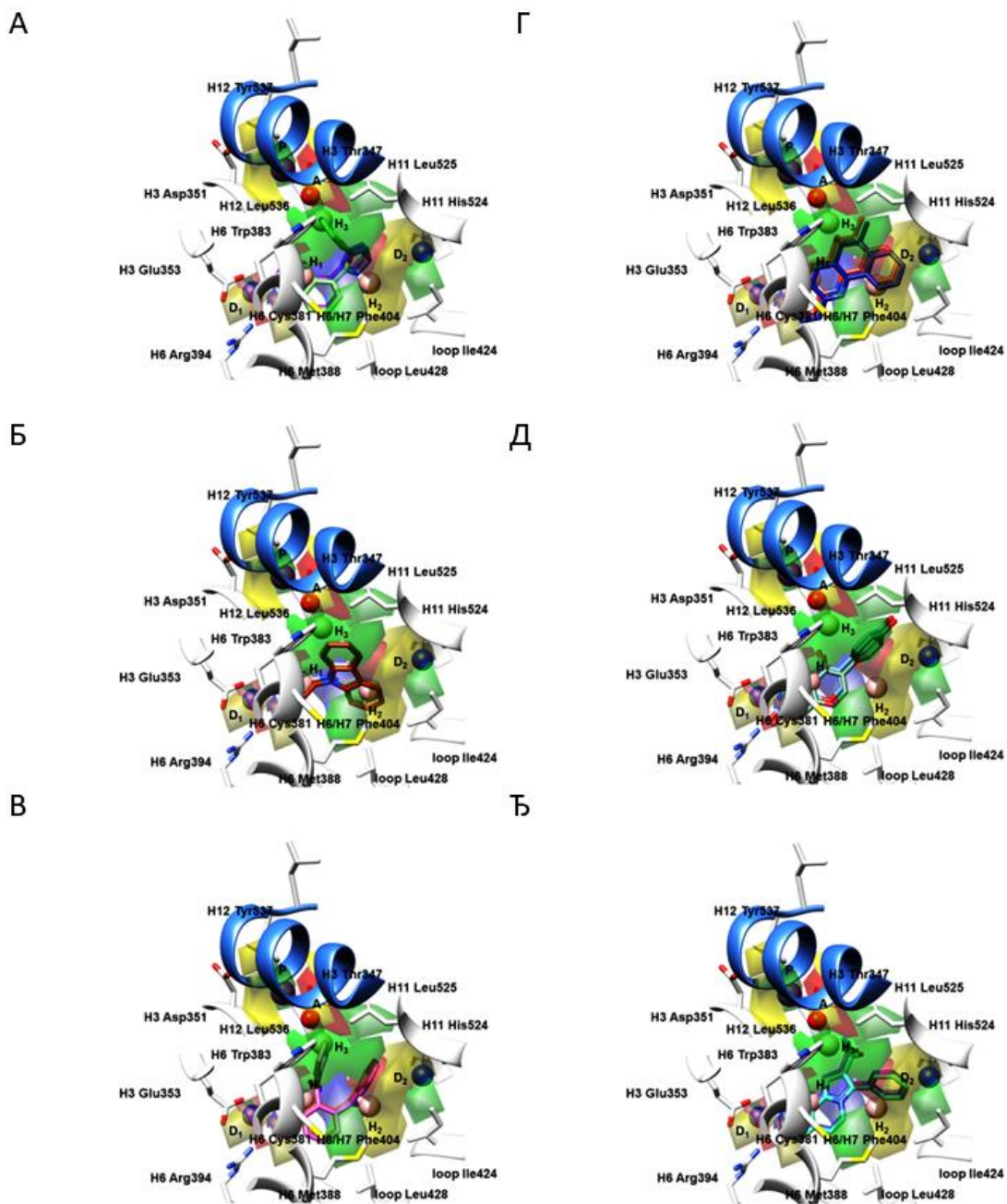
Слика ДМ16. Процена способности репродукције биоактивних конформација лиганата ER α виртуелно поравњаних у активном центру ER α помоћу програма FLA: **2QA6** (A), EC светло плаво, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **1XQC** (Б), EC светло зелено, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; **2B1Z** (B), EC светло ружичасто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно; и **1X7E** (Г) EC жуто, ECRA жуто, RCRA магента, ECCA плаво, RCCA црно. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



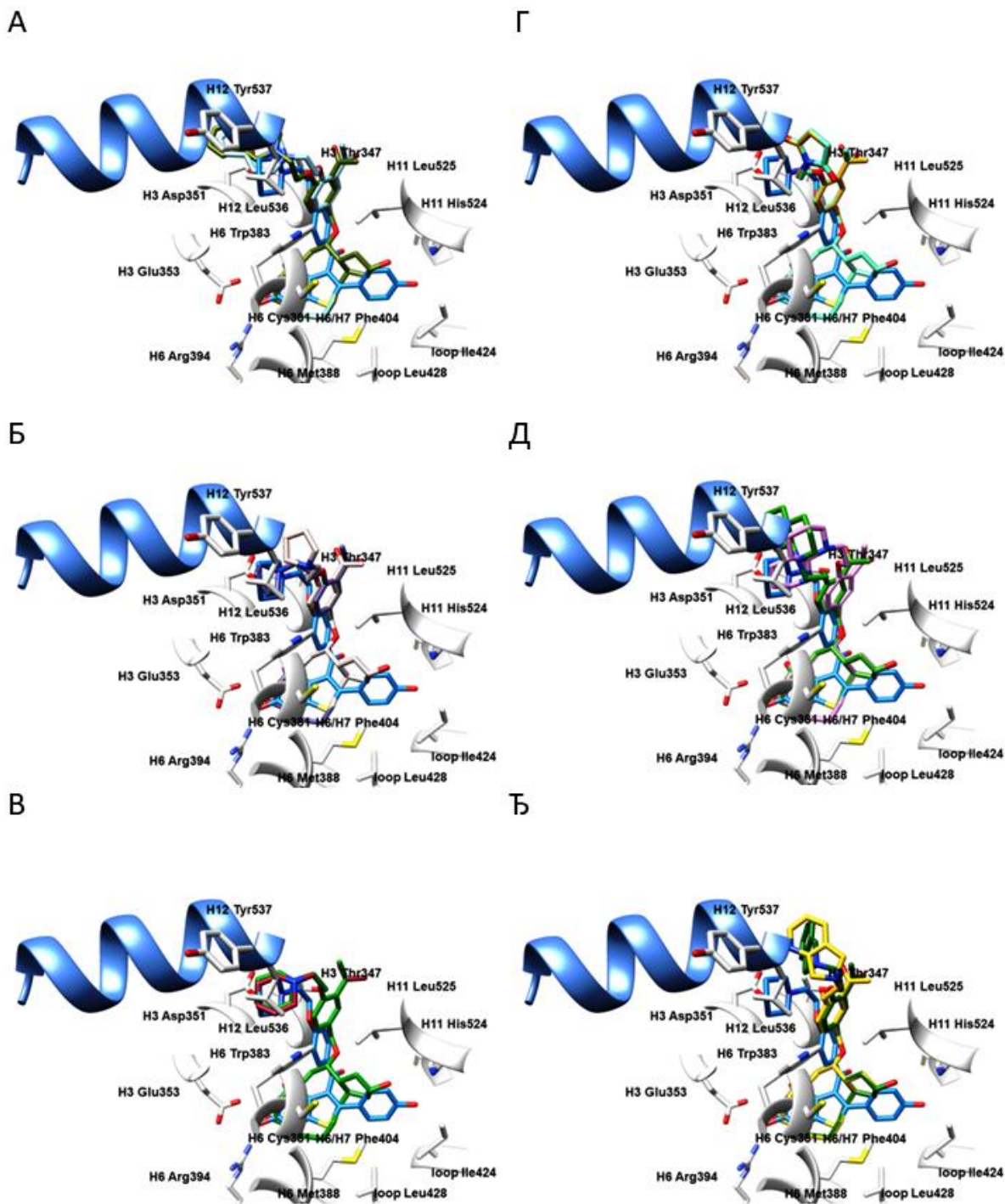
Слика ДМ17. Преклапање SB/LB вирuellно скенираних конформација **NCI89671**, SB конформација плава, LB конформација црвена (А); **NCI101789**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Б); **NCI645330**, SB конформација плава, LB конформација црвена (В); **NCI59814**, SB конформација црвена, LB конформација плава (Г); **NCI76747**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Д); **NCI9782**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Ђ), учитаних у **3-D PhypI/3-D QSAR** модел алат за предвиђање биоактивности. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



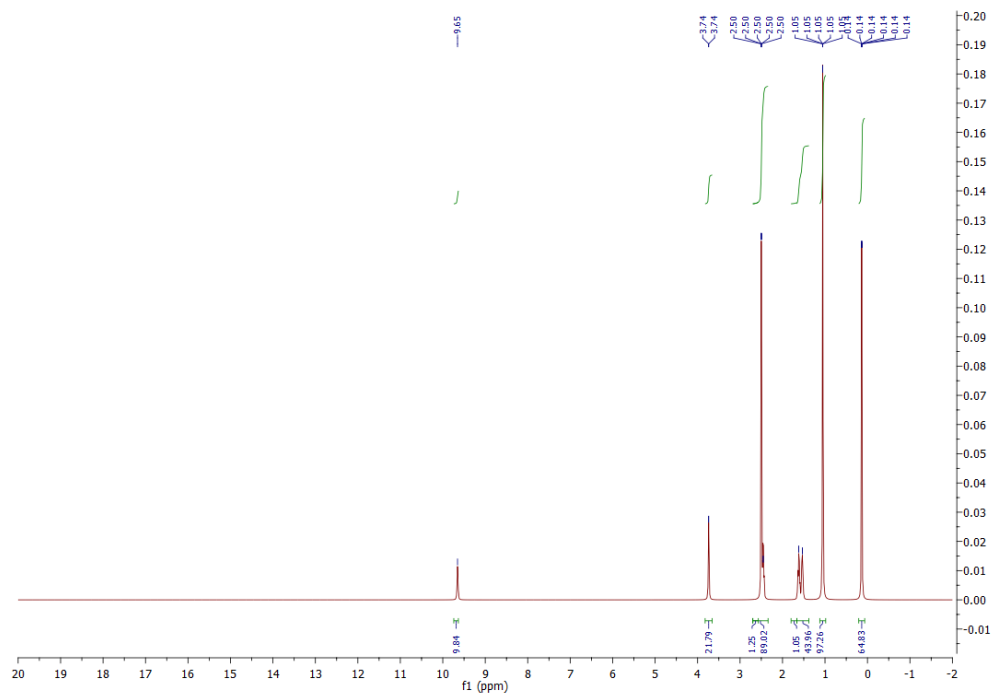
Слика ДМ18. Преклапање SB/LB вирuellно скенираних конформација **NCI71795**, SB конформација зелена, LB конформација наранџаста (А); **NCI85239**, конформација SB зелена, конформација LB жута (Б); **NCI69359**, SB конформација корална, LB конформација зелена (В); **NCI16437**, SB конформација зелена, LB конформација плава (Г); **NCI7128**, SB конформација љубичаста, LB конформација црвена (Д); **NCI10211**, SB конформација зелена, LB конформација плава (Ђ), учитаних у **3-D PhypI/3-D QSAR** модел алат за предвиђање биоактивности. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



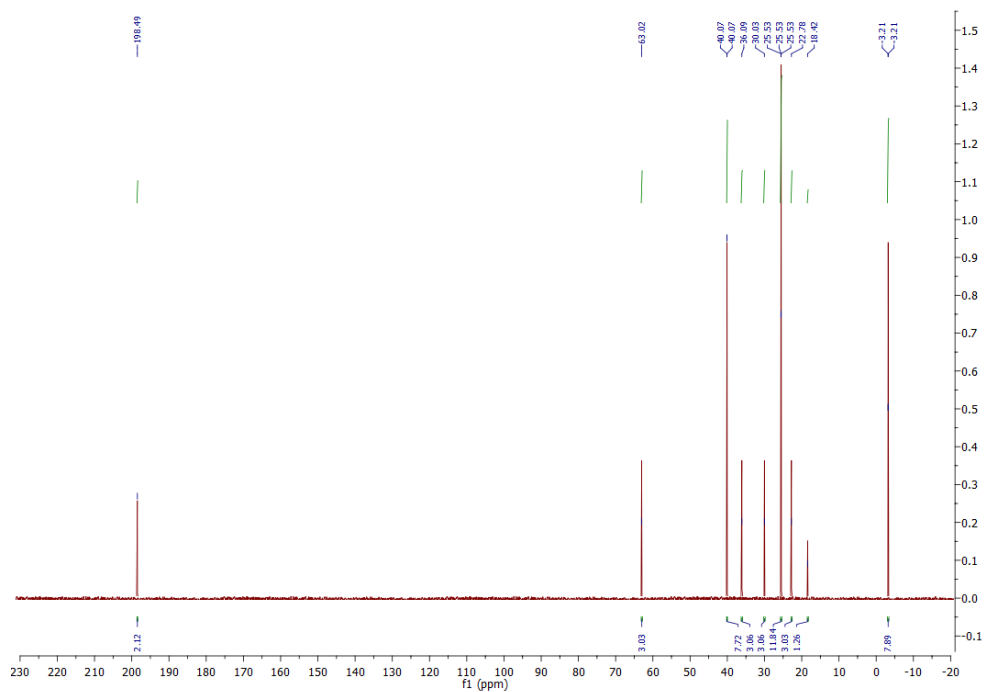
Слика ДМ19. Преклапање SB/LB вирусно скенираних конформација **NCI30813**, SB конформација плава, LB конформација црвена (А); **NCI10416**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Б); **NCI6145**, SB конформација плава, LB конформација црвена (В); **NCI19824**, SB конформација црвена, LB конформација плава (Г); **NCI36586**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Д); **NCI93427**, SB конформација плава, LB конформација црвена (Ђ), учитаних у **3-D PhypI/3-D QSAR** модел алат за предвиђање биоактивности. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом.



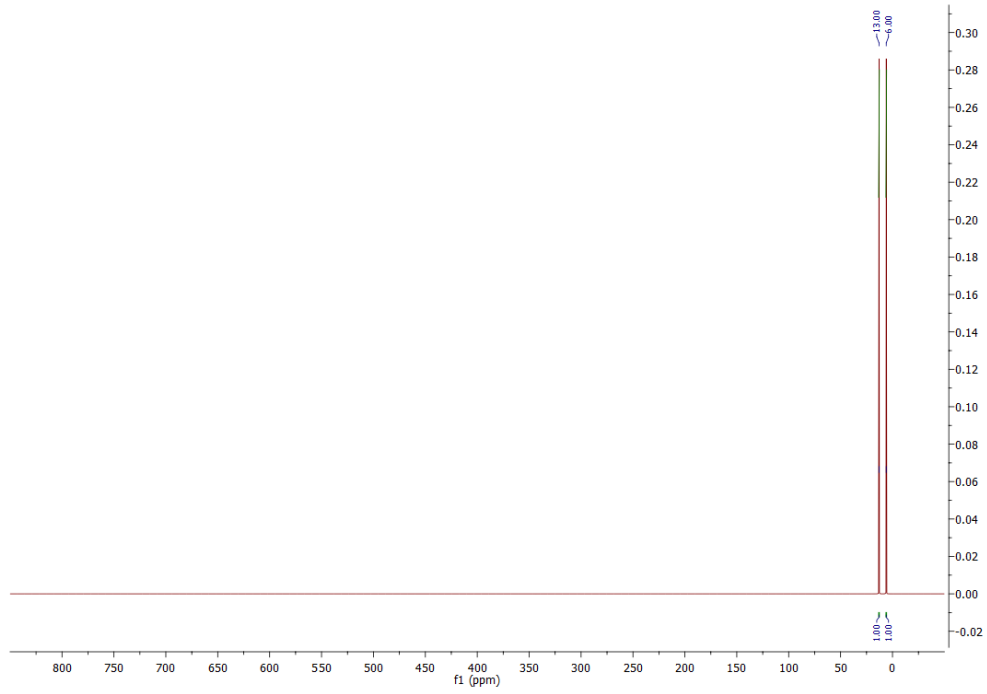
Слика ДМ19. Преклапање између дизајнираних једињења **3DPQ-7** (А), SBC плава, LBC зелена; **3DPQ-11** (Б), SBC љубичаста, LBC ружичаста; **3DPQ-10** (В), SBC зелена, LBC црвена; **3DPQ-5** (Г), SBC плава, LBC наранџаста; **3DPQ-8** (Д), SBC ружичаста, LBC зелена; **3DPQ-6** (Ђ) SBC зелена, LBC жута; и **1ERE**, ЕС плава, унутар ER α активног центра. Бочни низови аминокиселина приказани су у белој боји. Ради јасније презентације, H12 хеликс представљен је плавом бојом као круцијални граничник парцијалне агонисте и једињења са SERM односно SERD фармакологијом



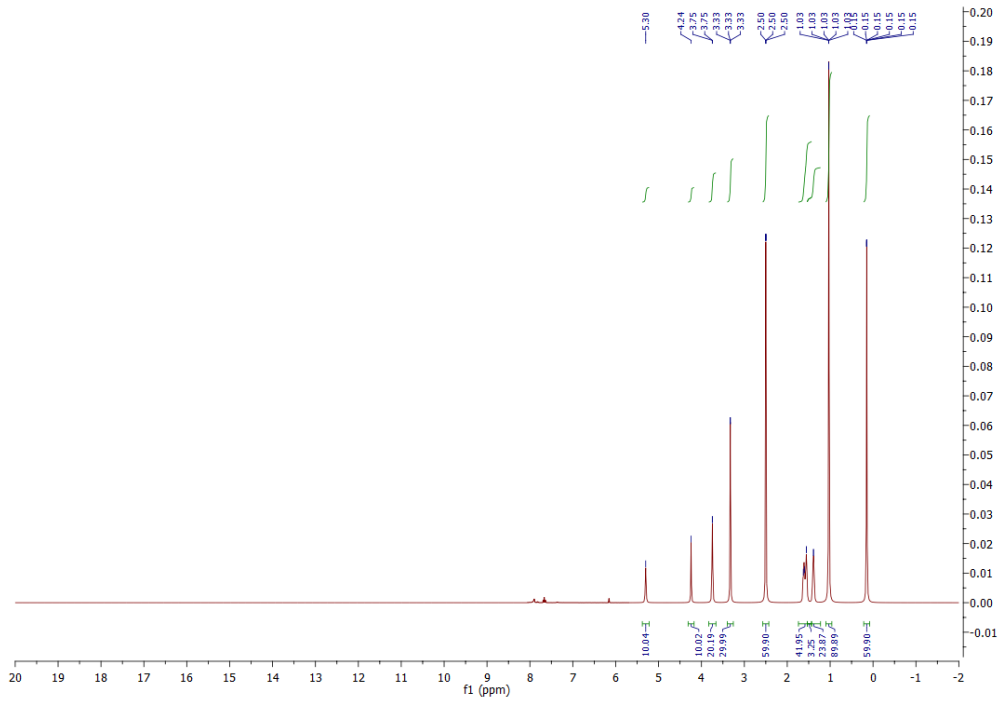
Слика ДМ21. ^1H NMR спектар једињења **R1**.



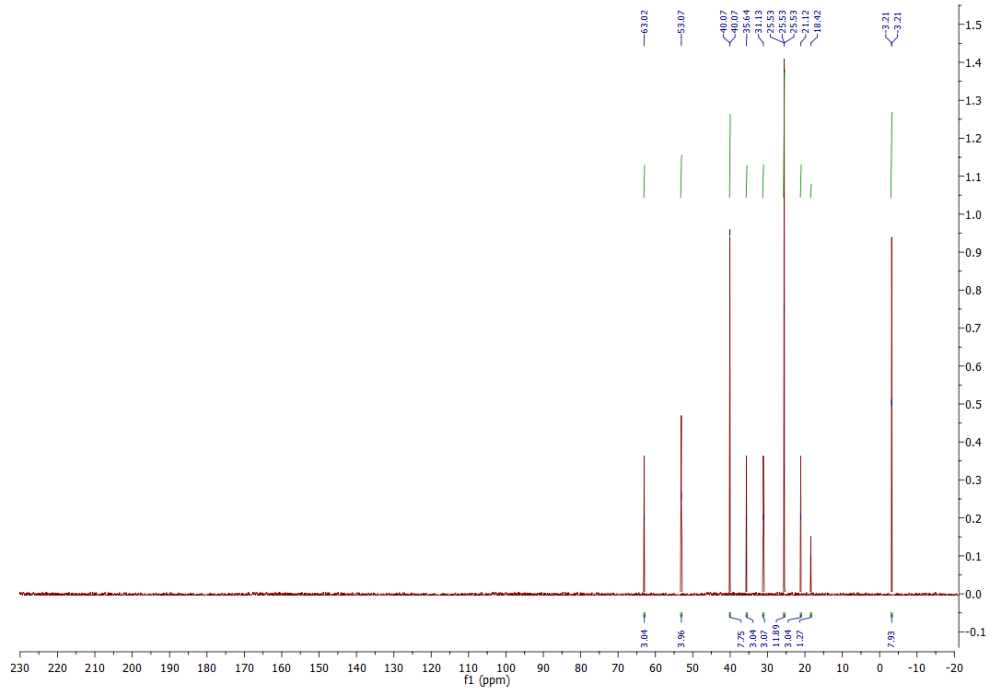
Слика ДМ22. ^{13}C NMR спектар једињења **R1**.



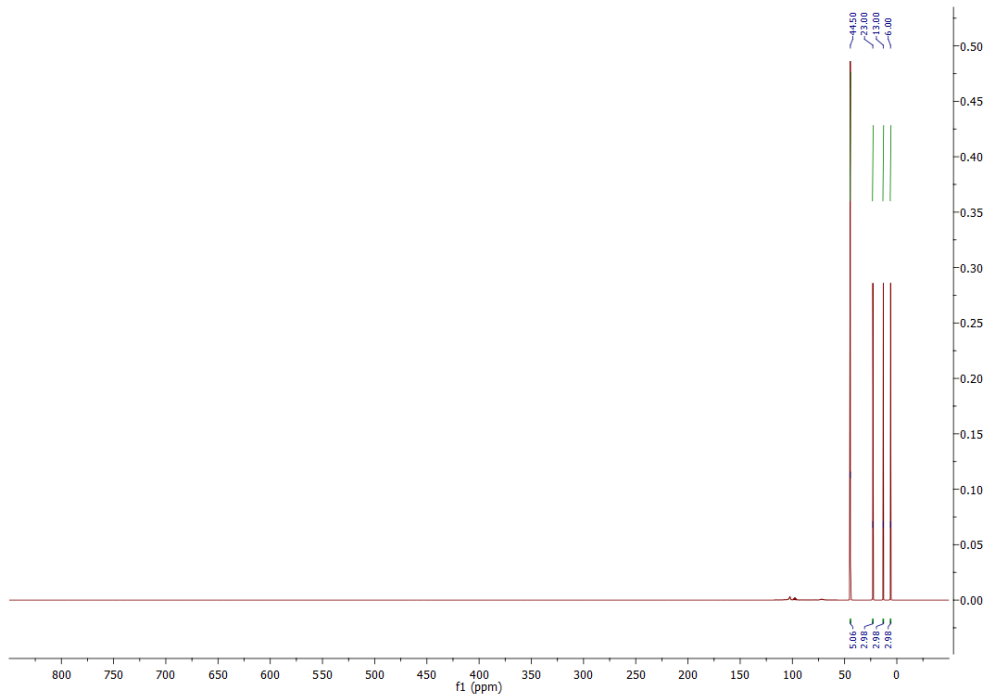
Слика ДМ23. ^{17}O NMR спектар једињења **R1**.



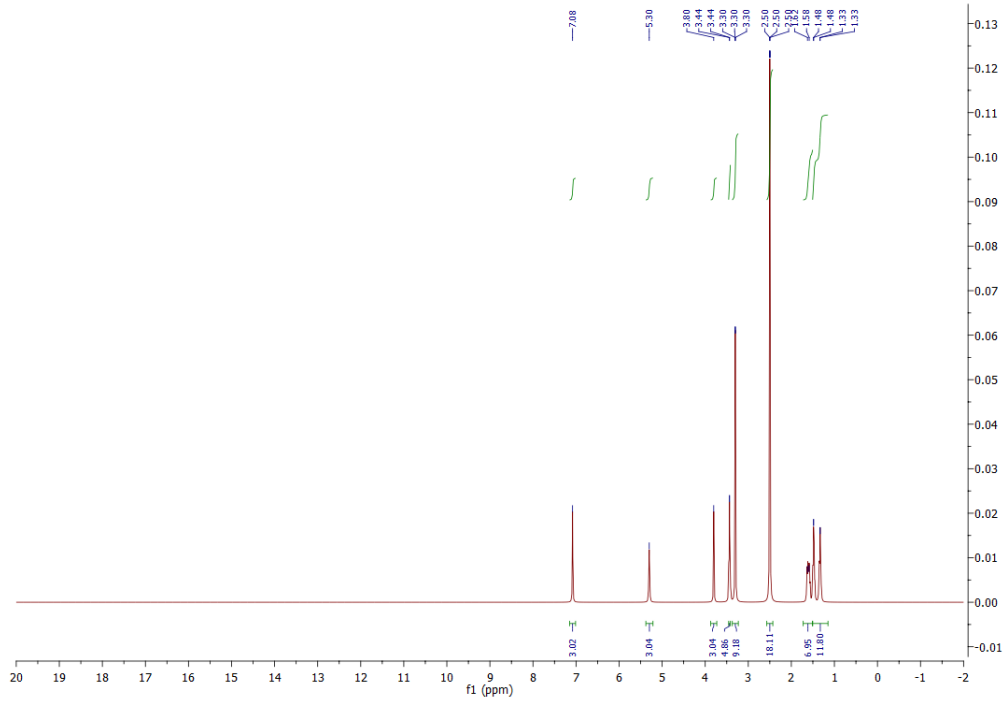
Слика ДМ24. ^1H NMR спектар једињења **R2**.



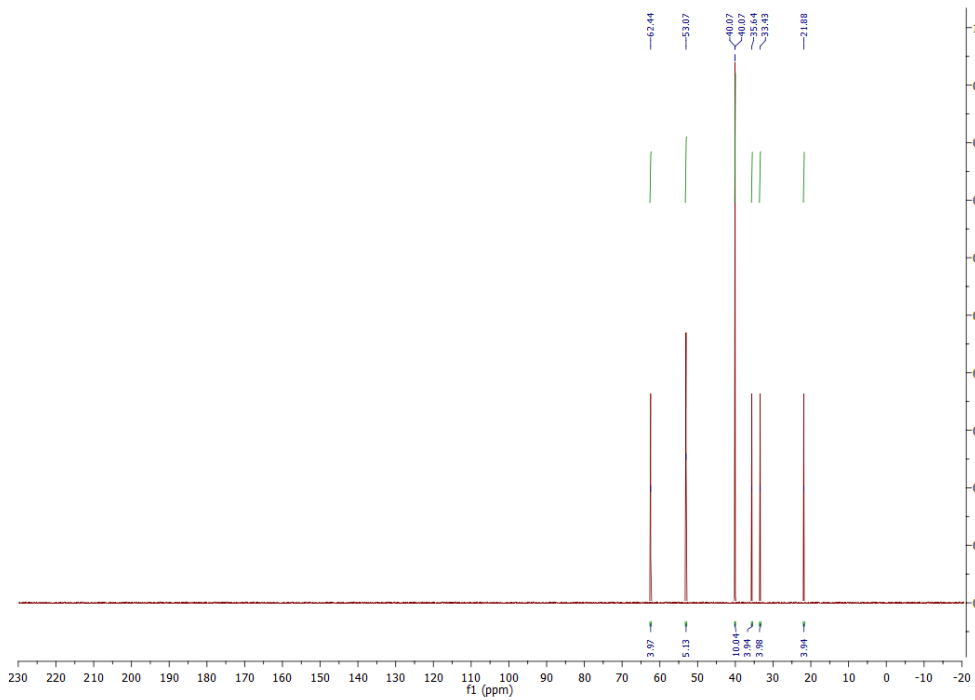
Слика ДМ25. ^{13}C NMR спектар једињења **R2**.



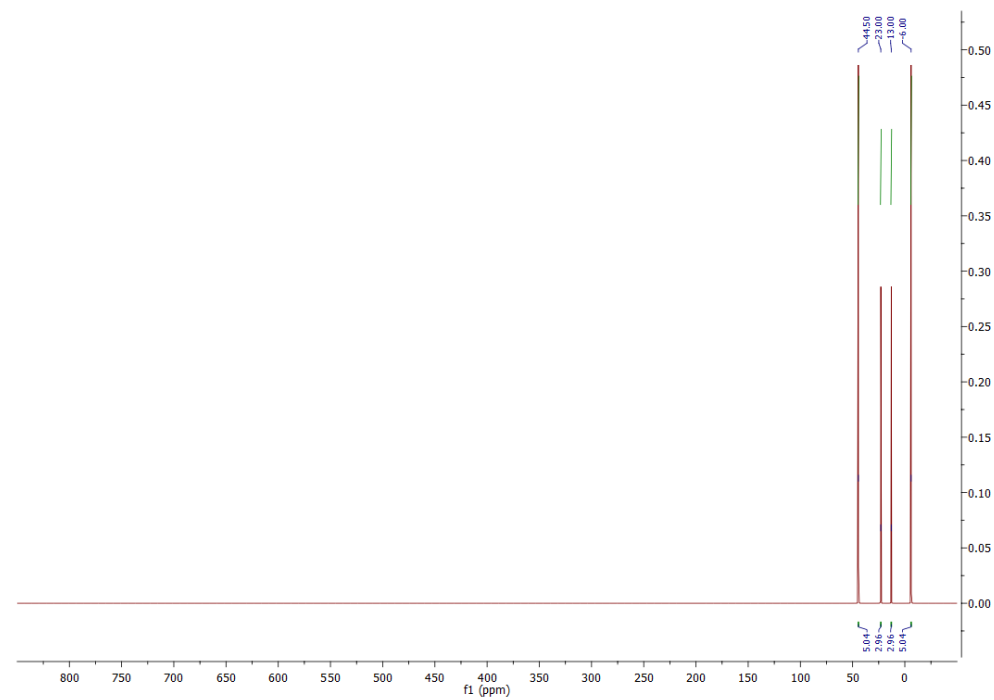
Слика ДМ26. ^{17}O NMR спектар једињења **R2**.



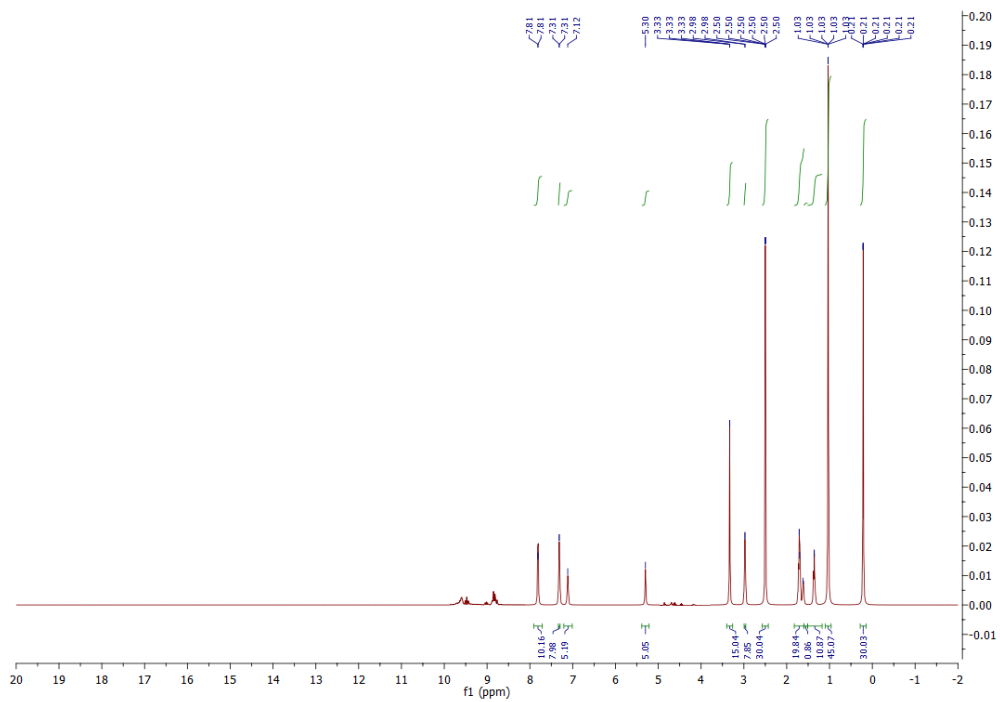
Слика ДМ27. ¹H NMR спектар једињења **R3**.



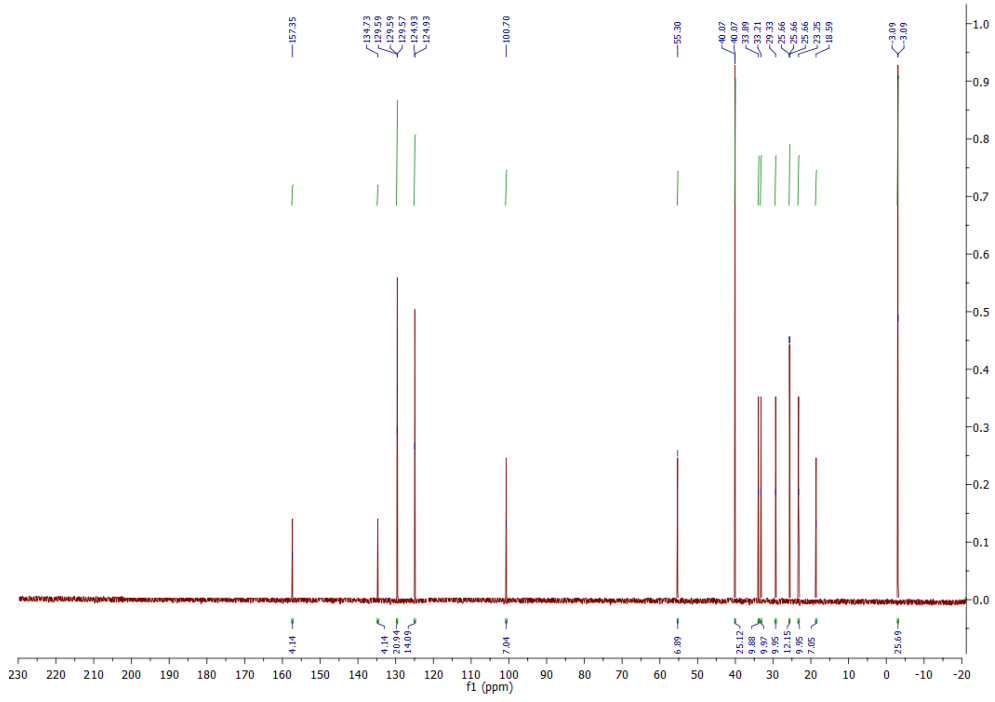
Слика ДМ28. ¹³C NMR спектар једињења **R3**.



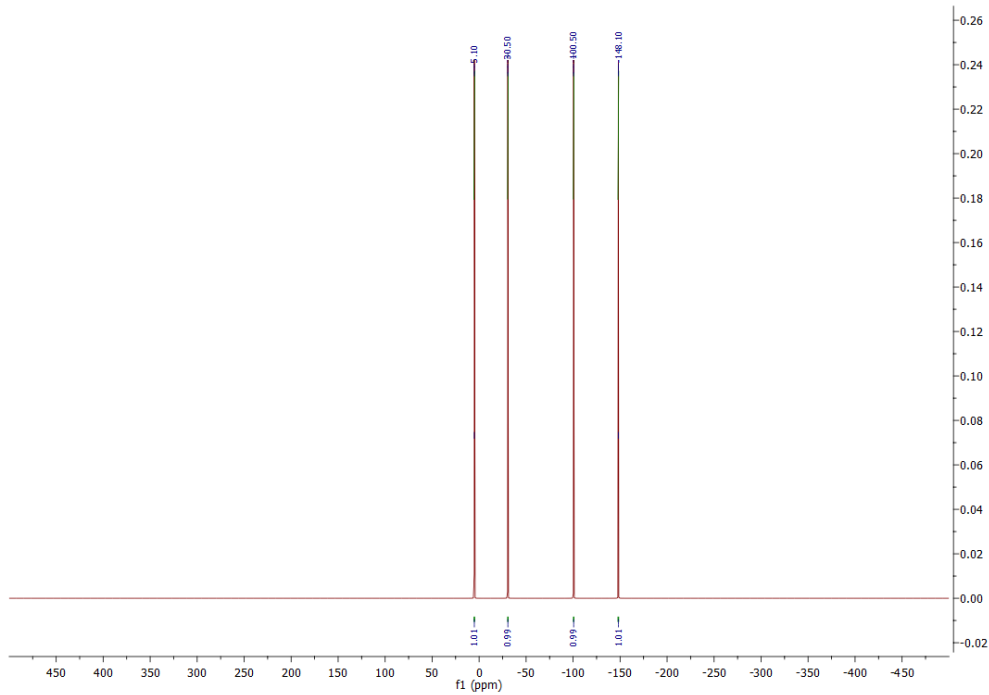
Слика ДМ29. ^{17}O NMR спектар једињења **R3**.



Слика ДМ30. ^1H NMR спектар једињења **R4**.



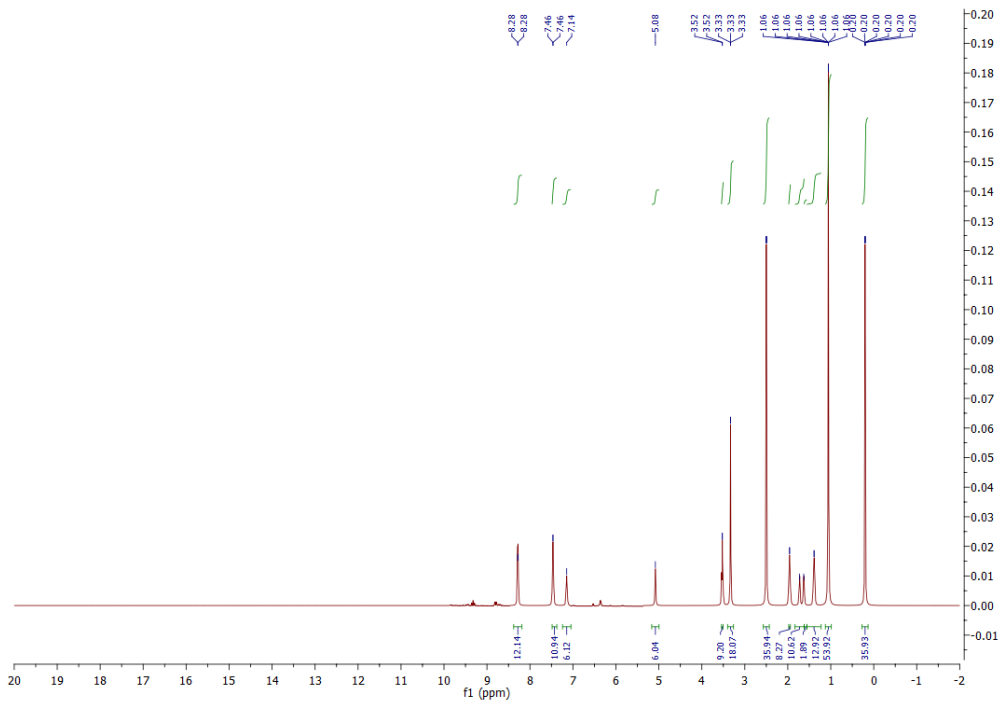
Слика ДМ31. ^{13}C NMR спектар једињења **R4**.



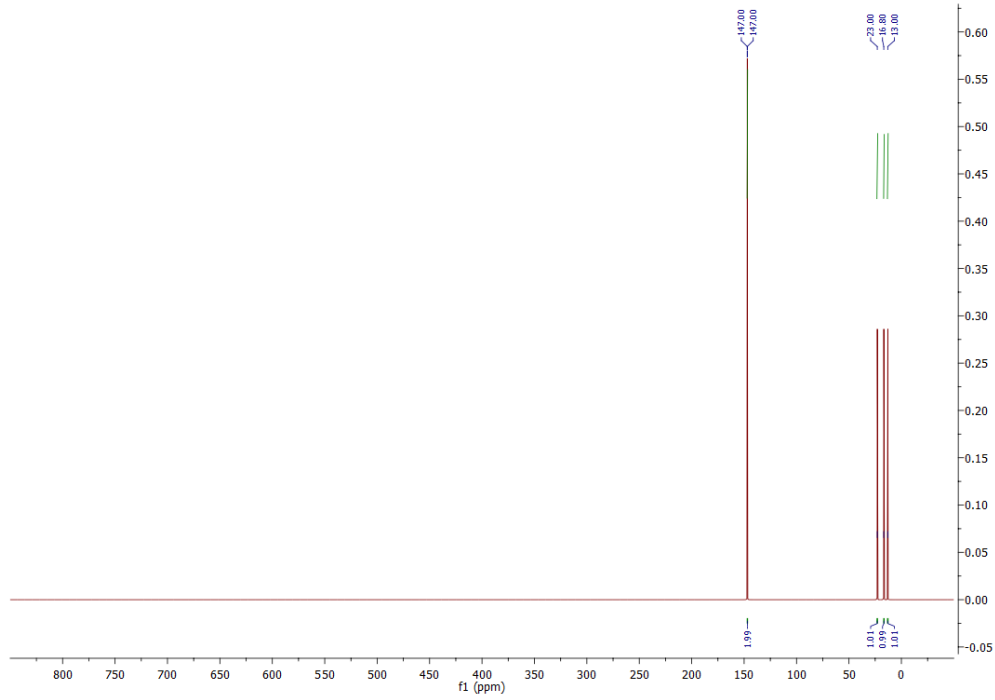
Слика ДМ32. ^{15}N NMR спектар једињења **R4**.



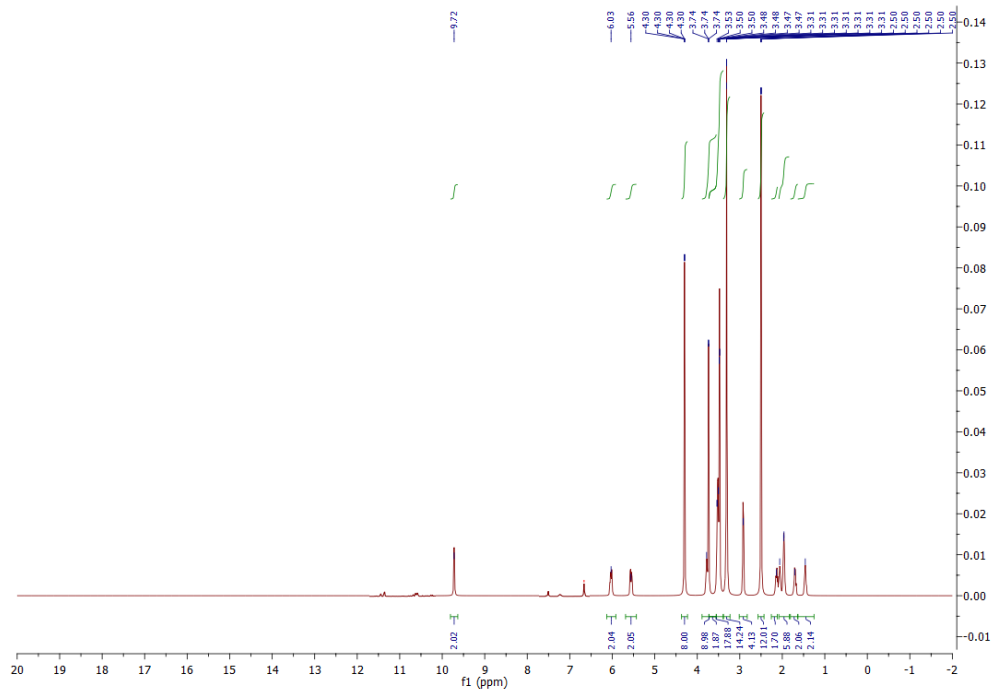
Слика ДМ33. ^{17}O NMR спектар једињења **R4**.



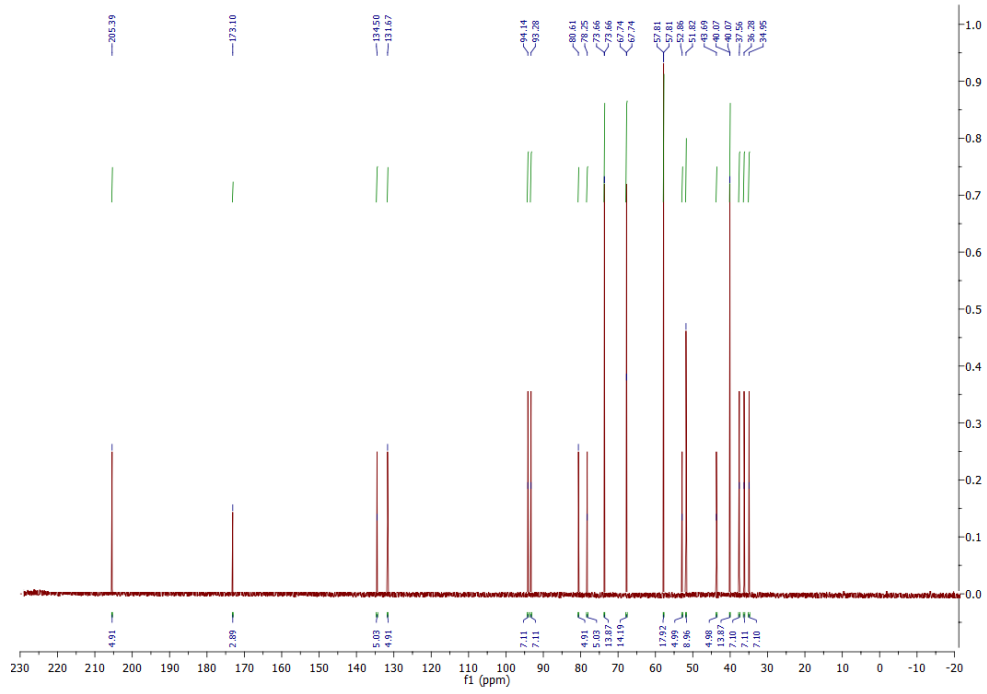
Слика ДМ34. ^1H NMR спектар једињења **R5**.



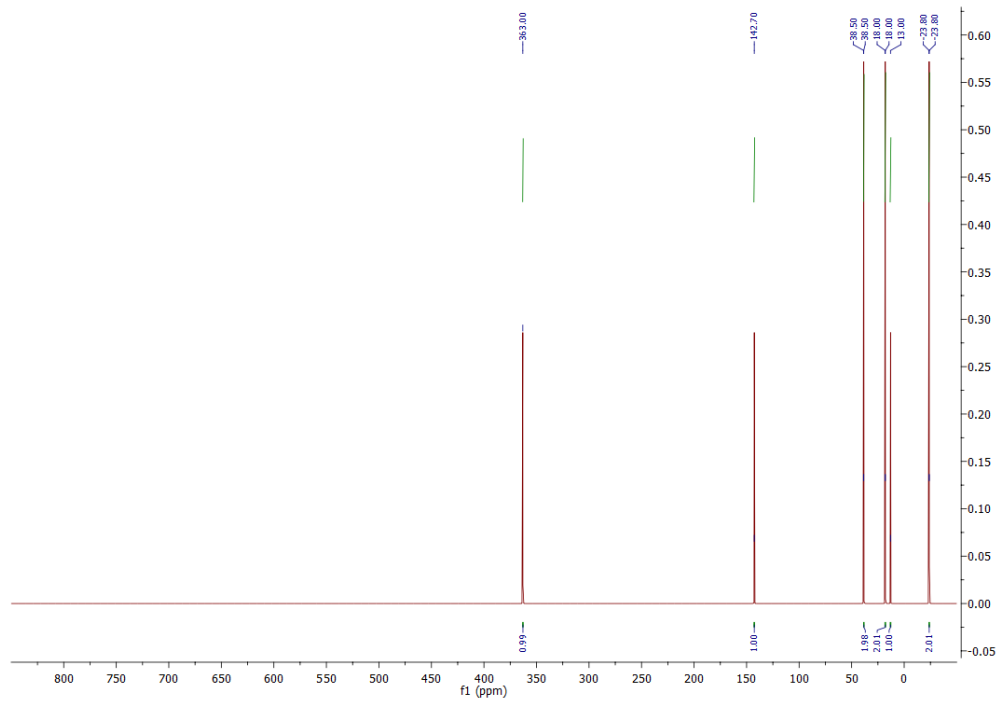
Слика ДМ37. ^{17}O NMR спектар једињења **R5**.



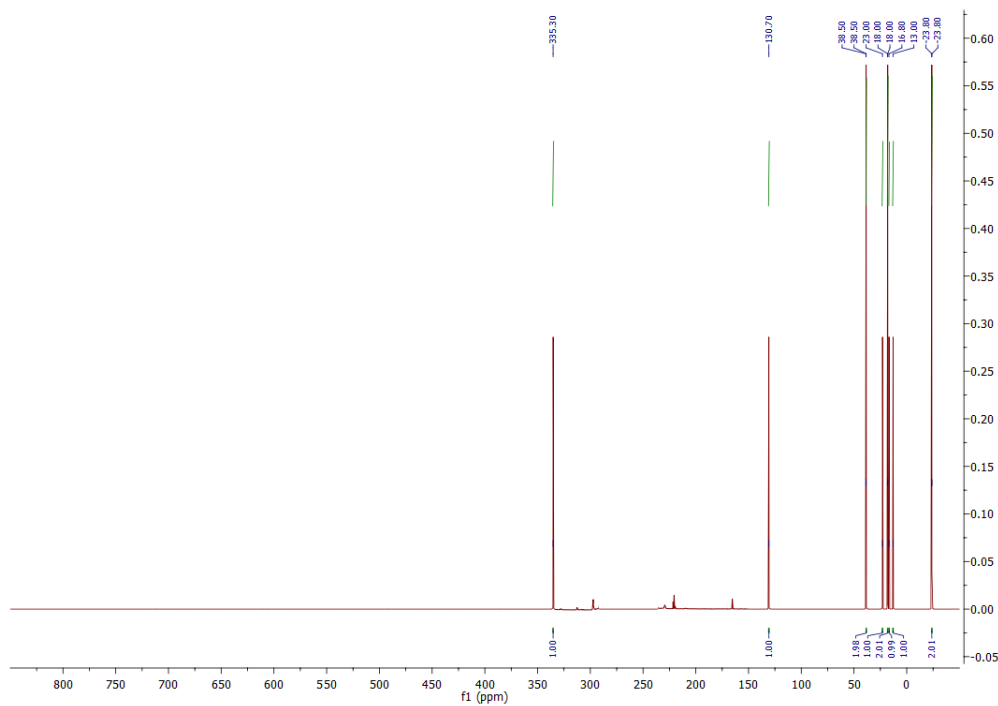
Слика ДМ38. ^1H NMR спектар једињења **R6**.



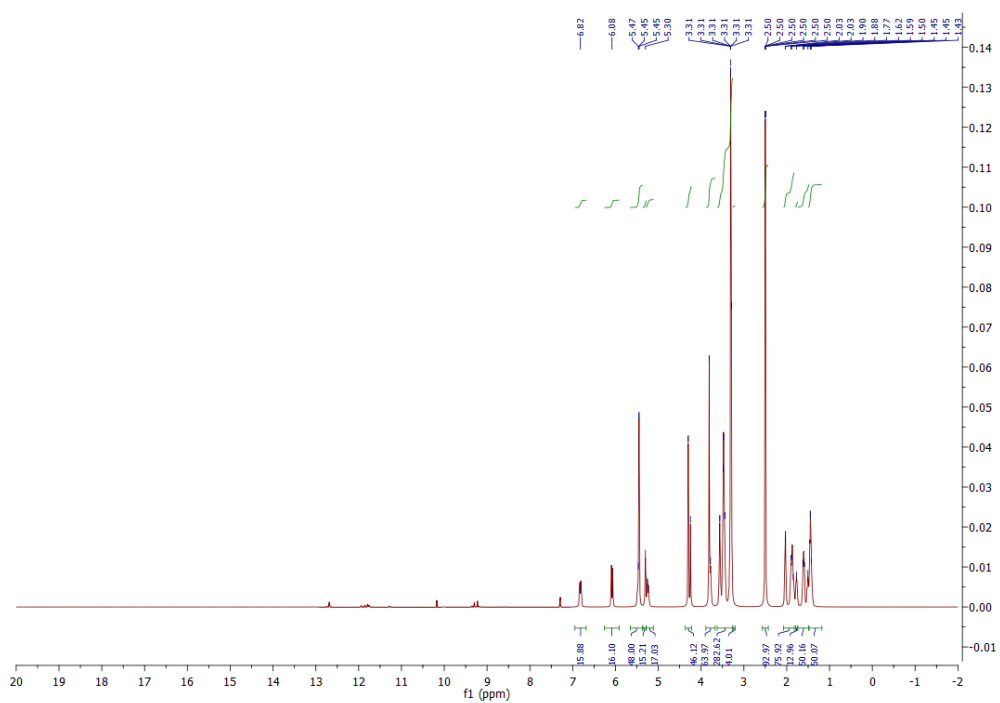
Слика ДМ39. ^{13}C NMR спектар једињења **R6**.



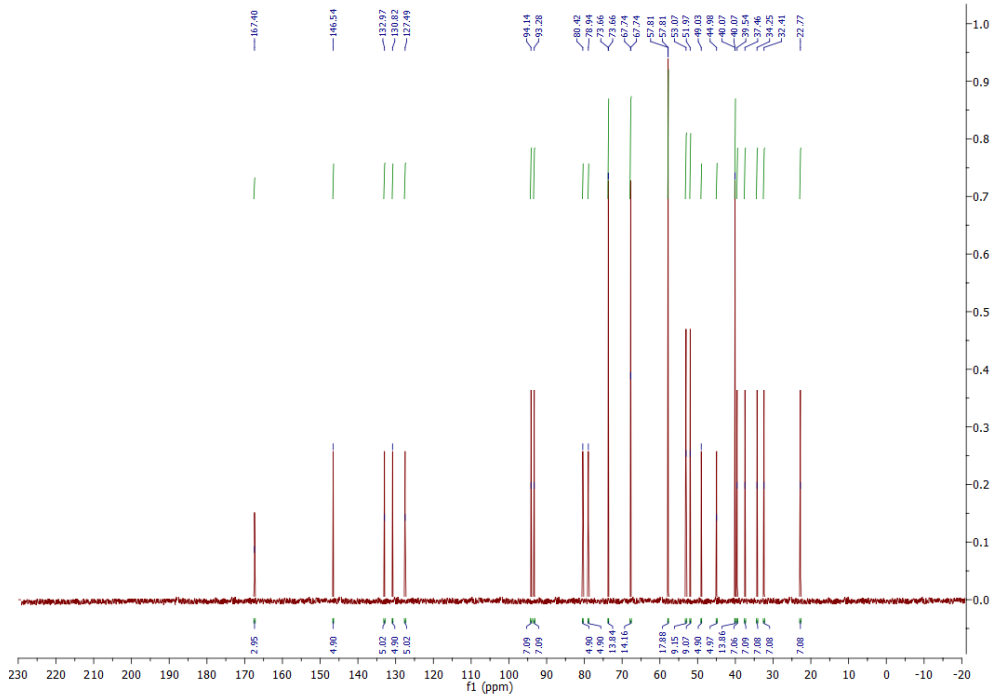
Слика ДМ40. ^{17}O NMR спектар једињења **R6**.



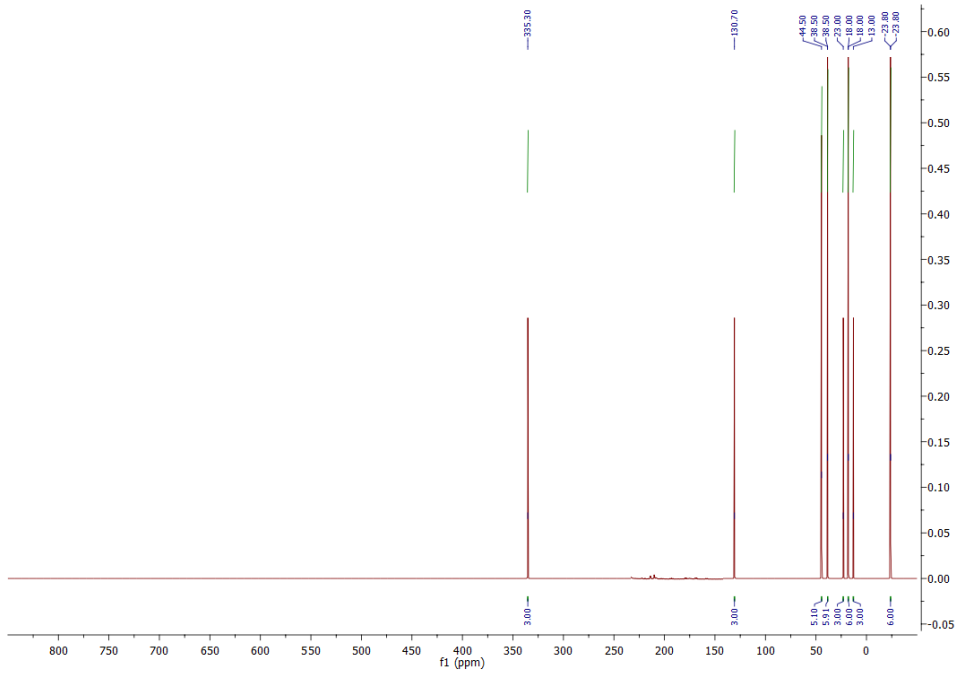
Слика ДМ43. ^{17}O NMR спектар једињења **R7**.



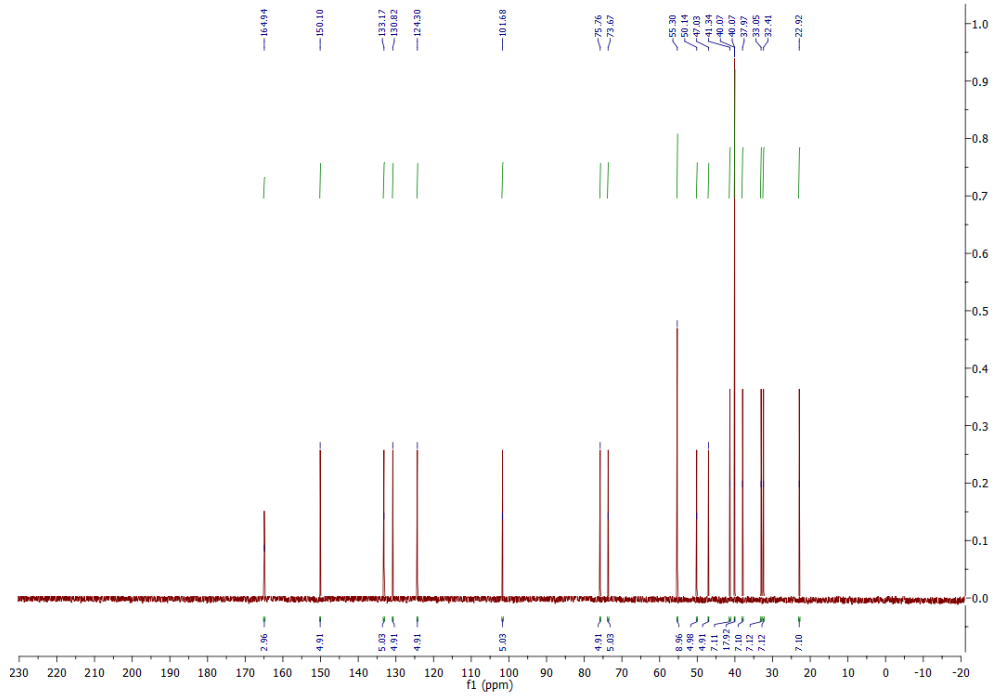
Слика ДМ447. ^1H NMR спектар једињења **R8**.



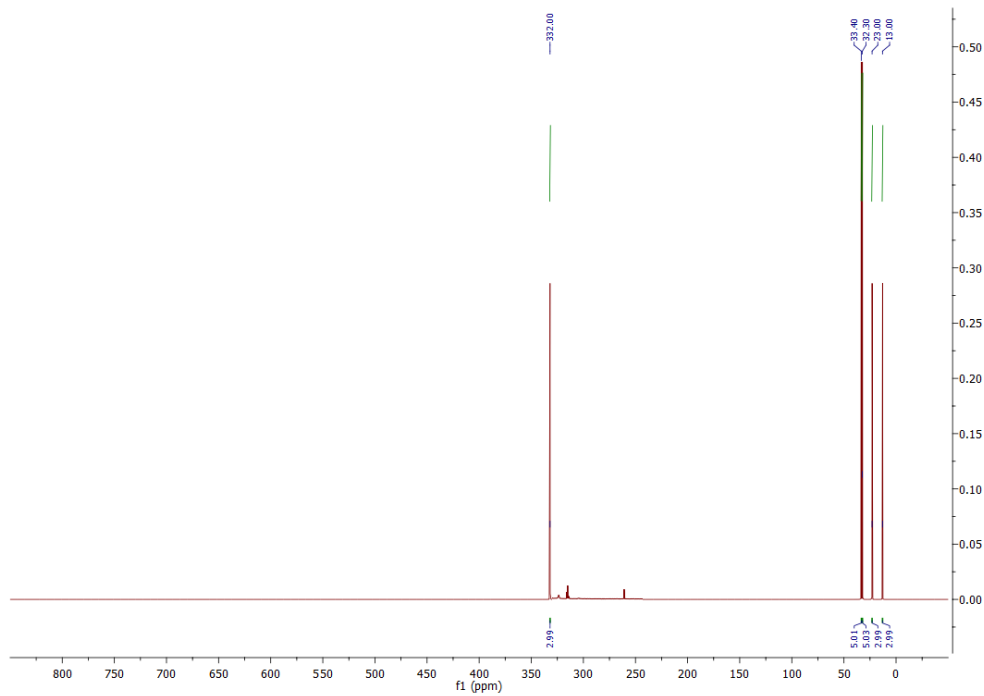
Слика ДМ45. ^{13}C NMR спектар једињења **R8**.



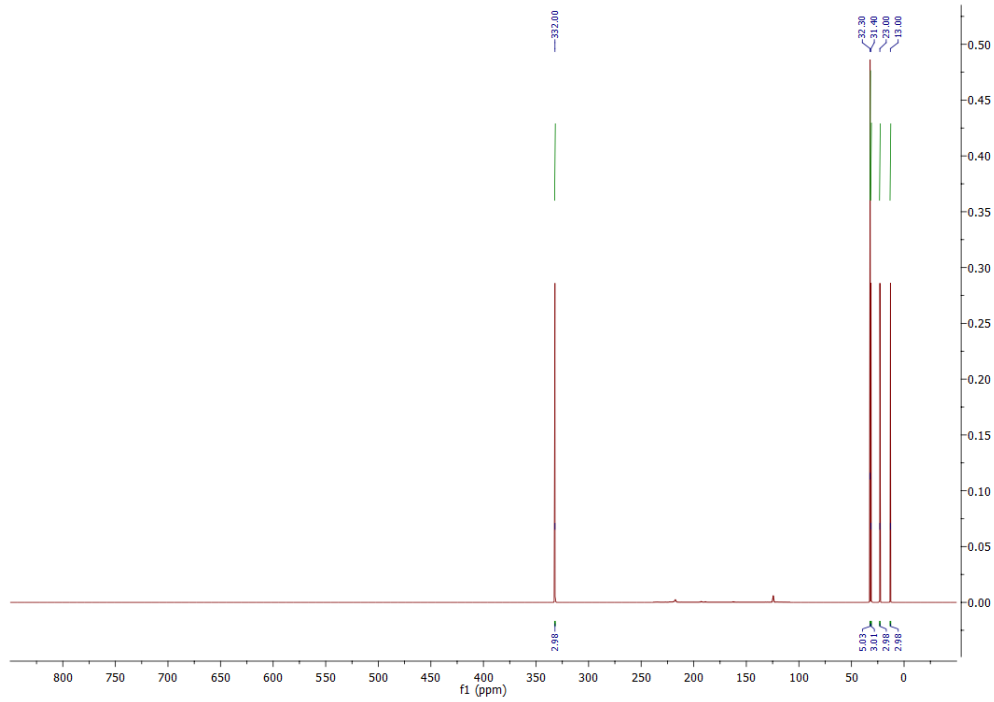
Слика ДМ46. ^{17}O NMR спектар једињења **R8**.



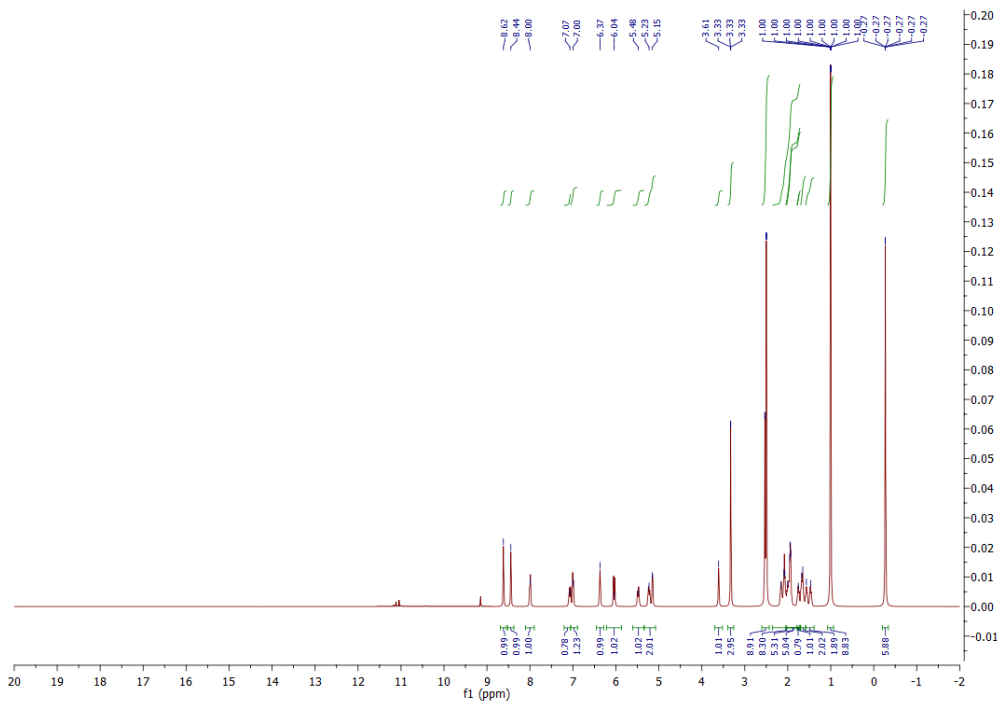
Слика ДМ51. ^{13}C NMR спектар једињења ВФА-D2.



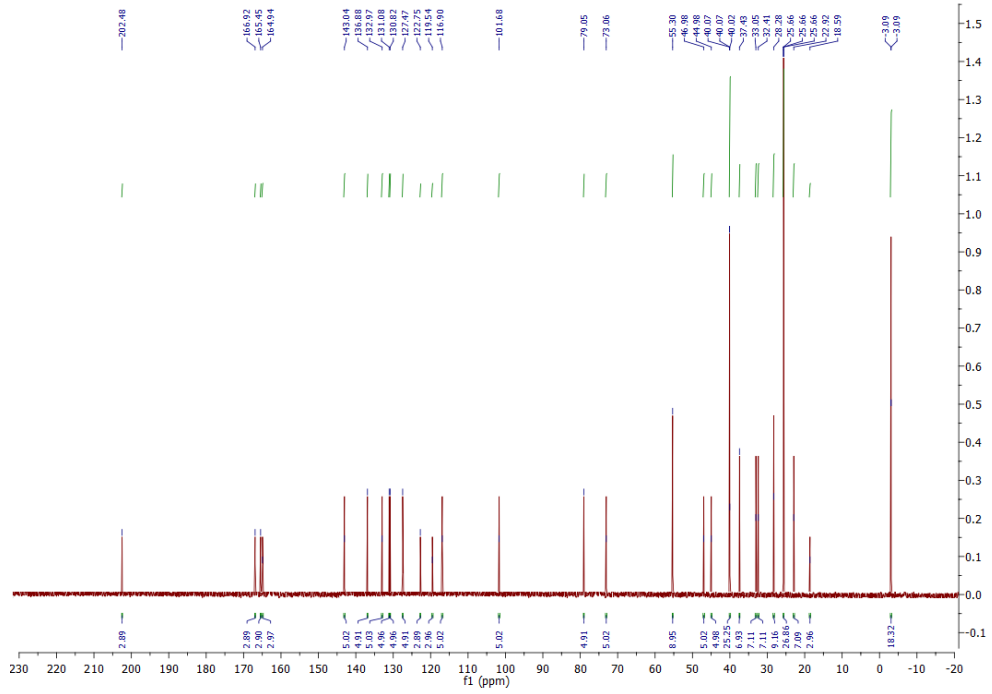
Слика ДМ52. ^{17}O NMR спектар једињења ВФА-D2.



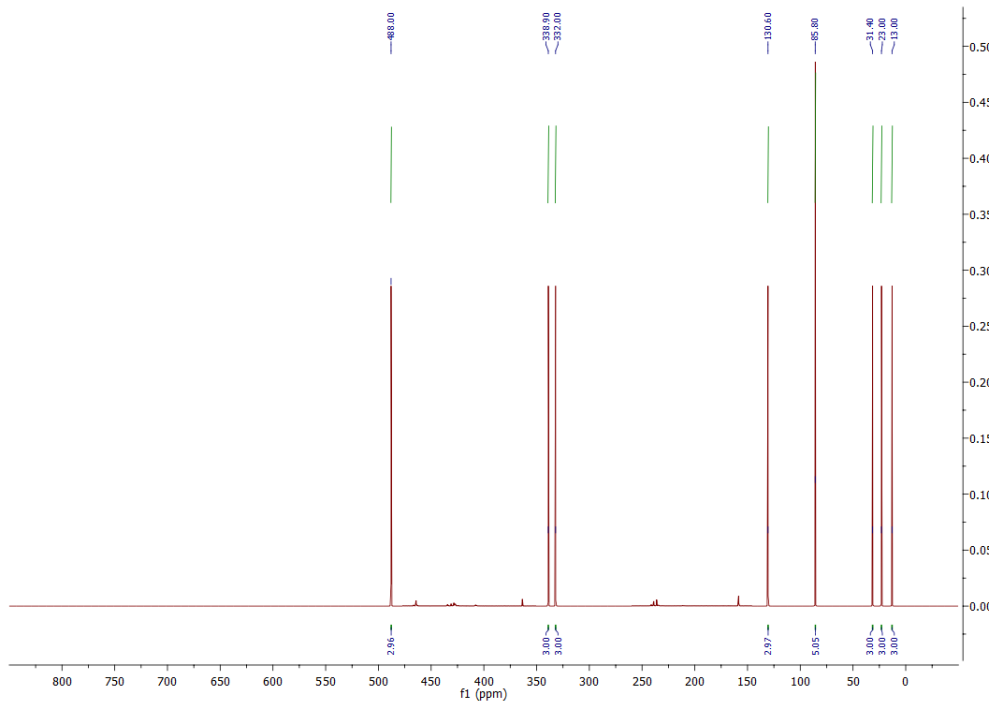
Слика ДМ55. ^{17}O NMR спектар једињења **ВФА-D3**.



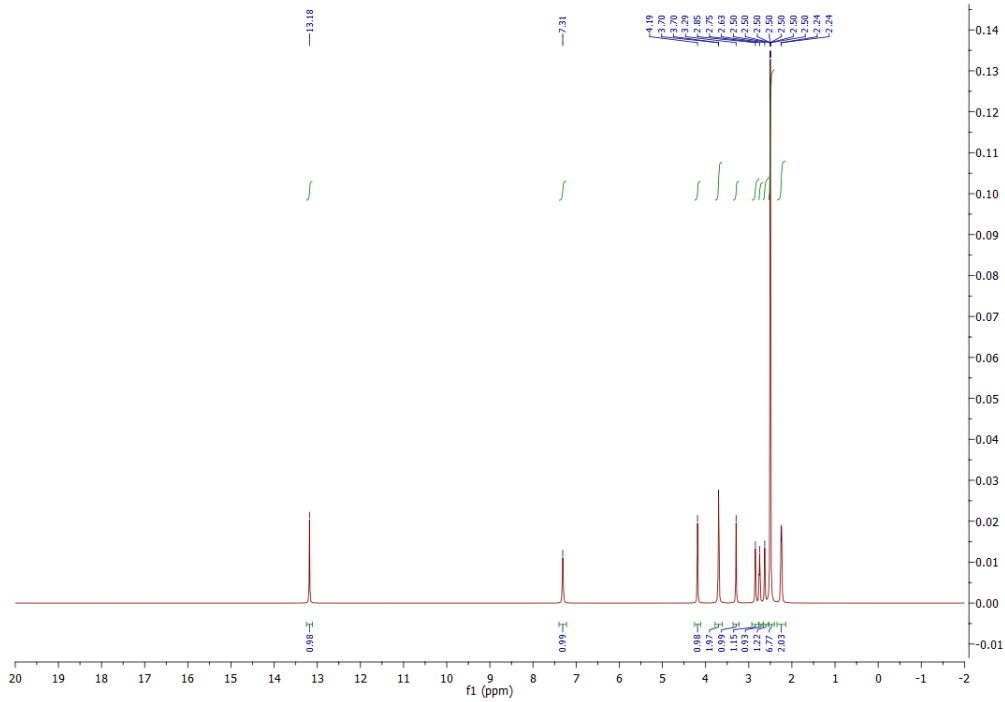
Слика ДМ56. ^1H NMR спектар једињења **ВФА-D4**.



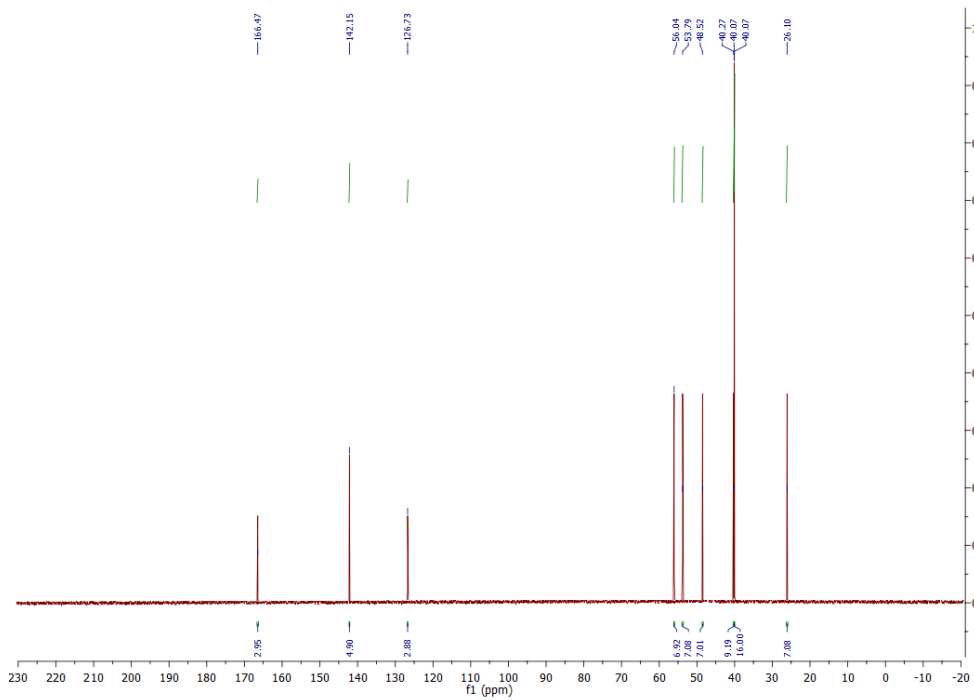
Слика ДМ57. ^{13}C NMR спектар једињења **BFA-D4**.



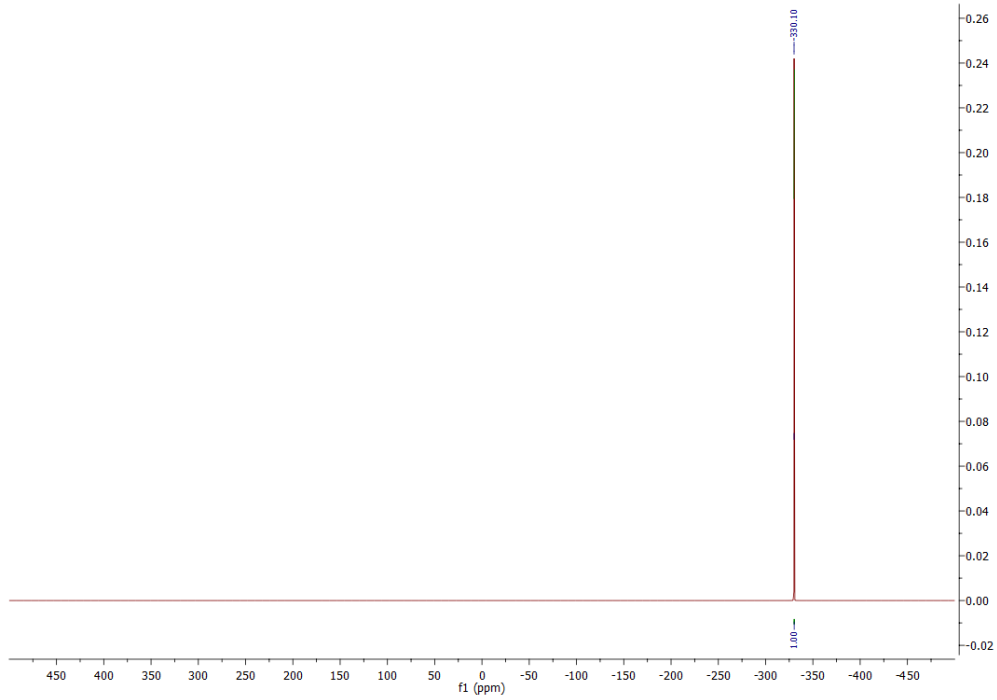
Слика ДМ58. ^{17}O NMR спектар једињења **DFA-D4**.



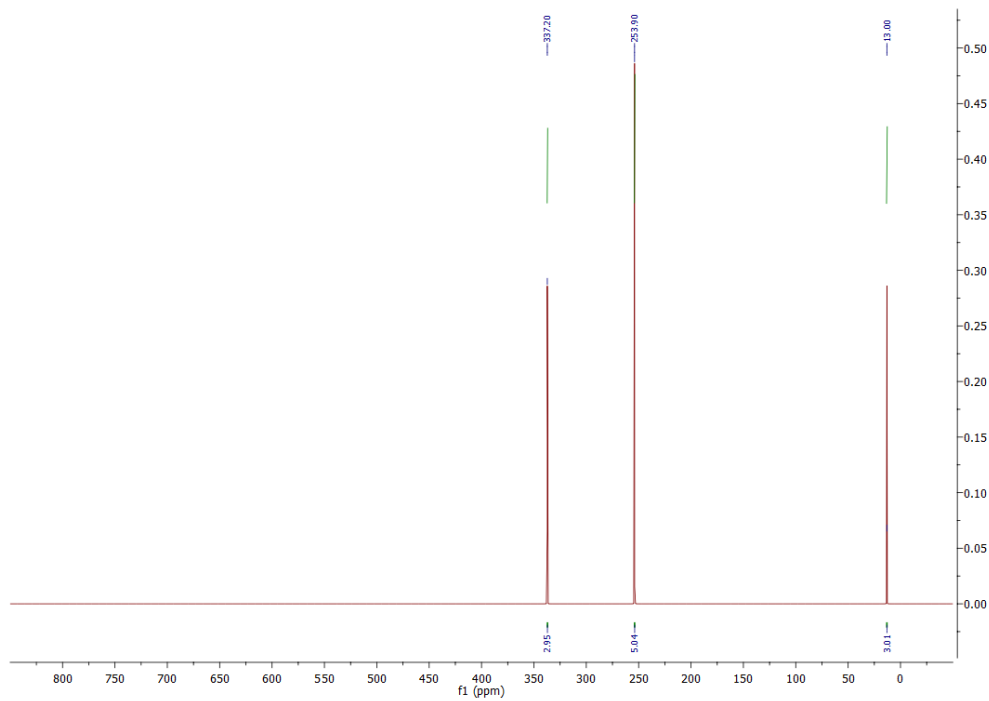
Слика ДМ59. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R3**.



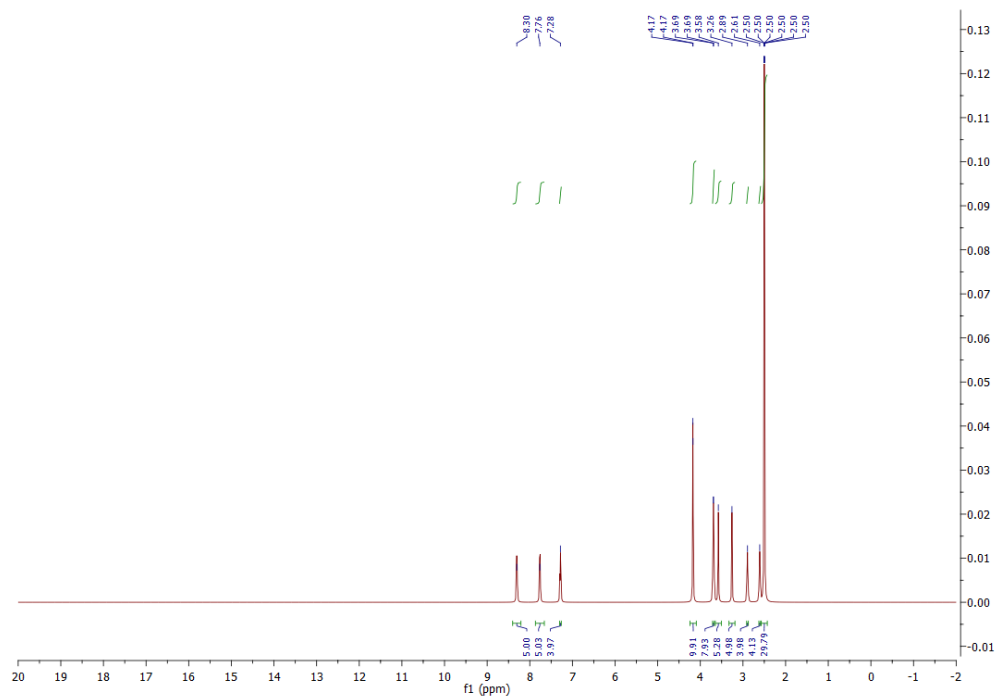
Слика ДМ60. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R3**.



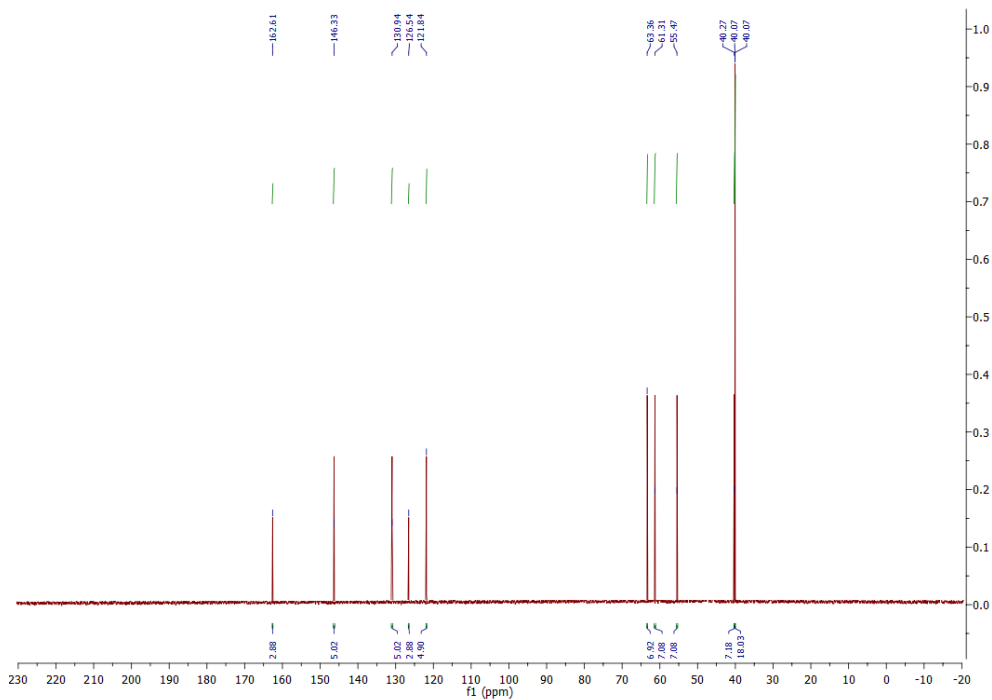
Слика ДМ61. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R3**.



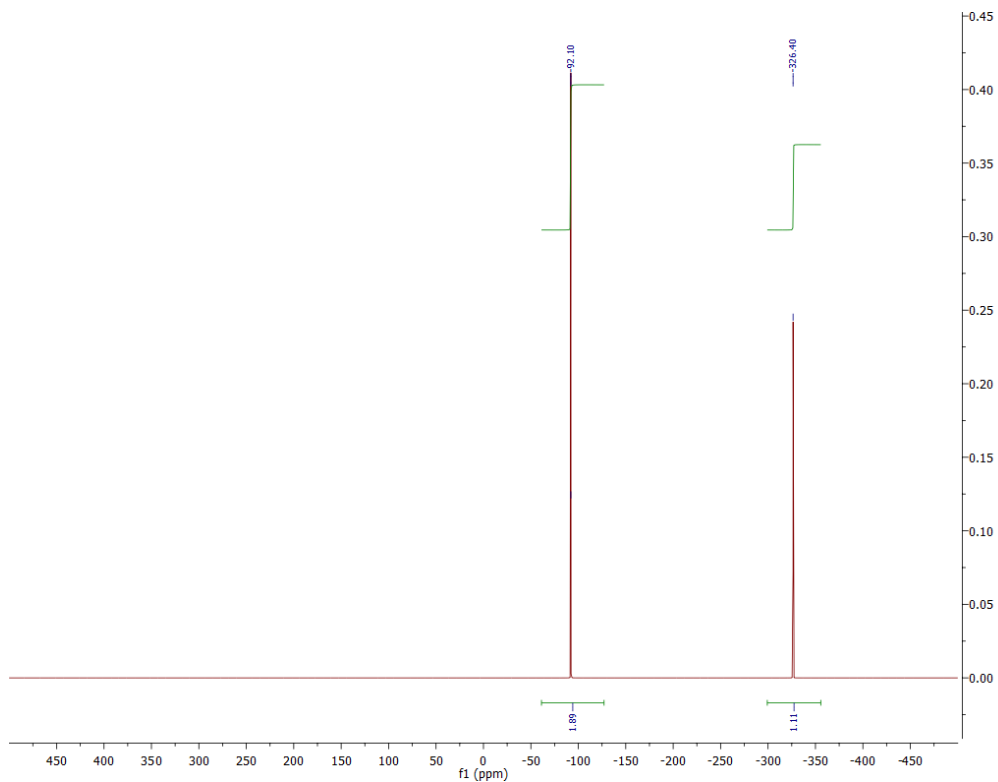
Слика ДМ62. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-R3**.



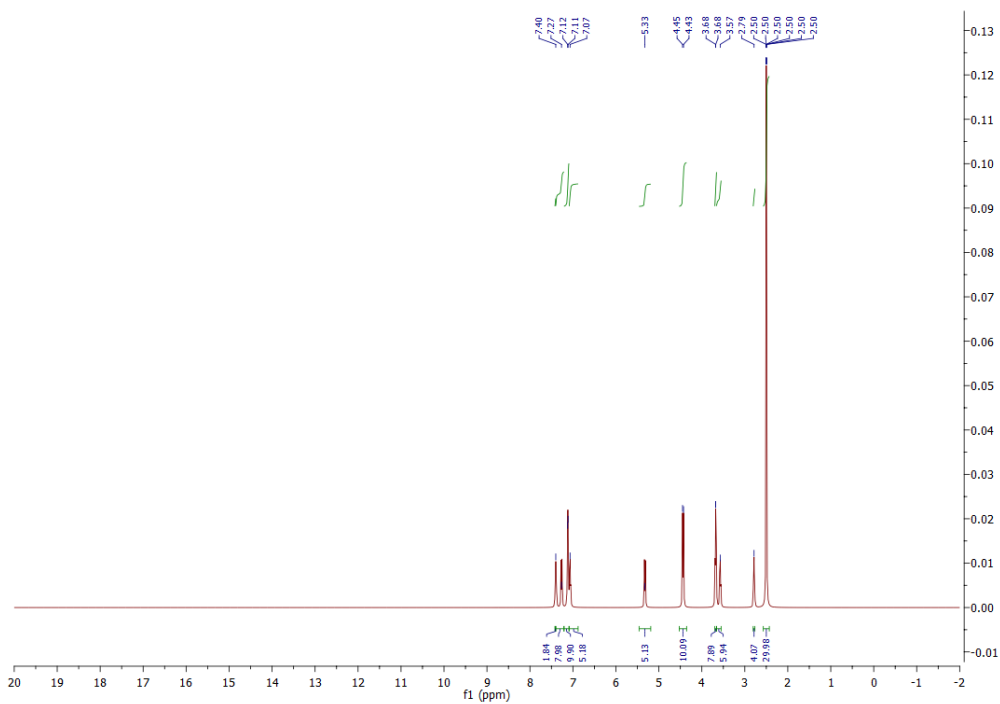
Слика ДМ63. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R6**.



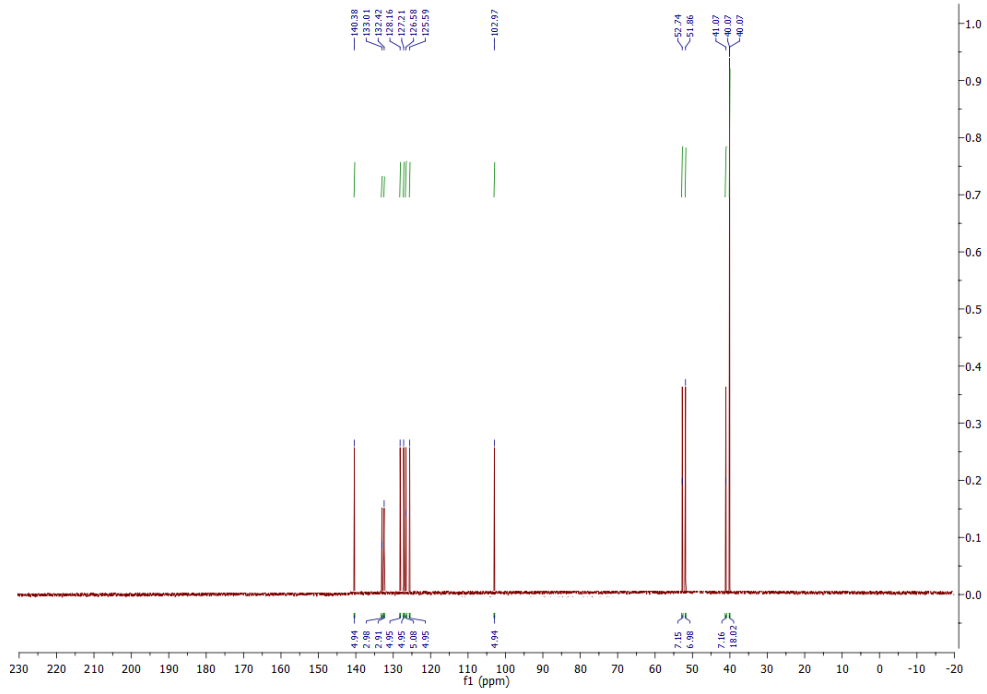
Слика ДМ64. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R6**.



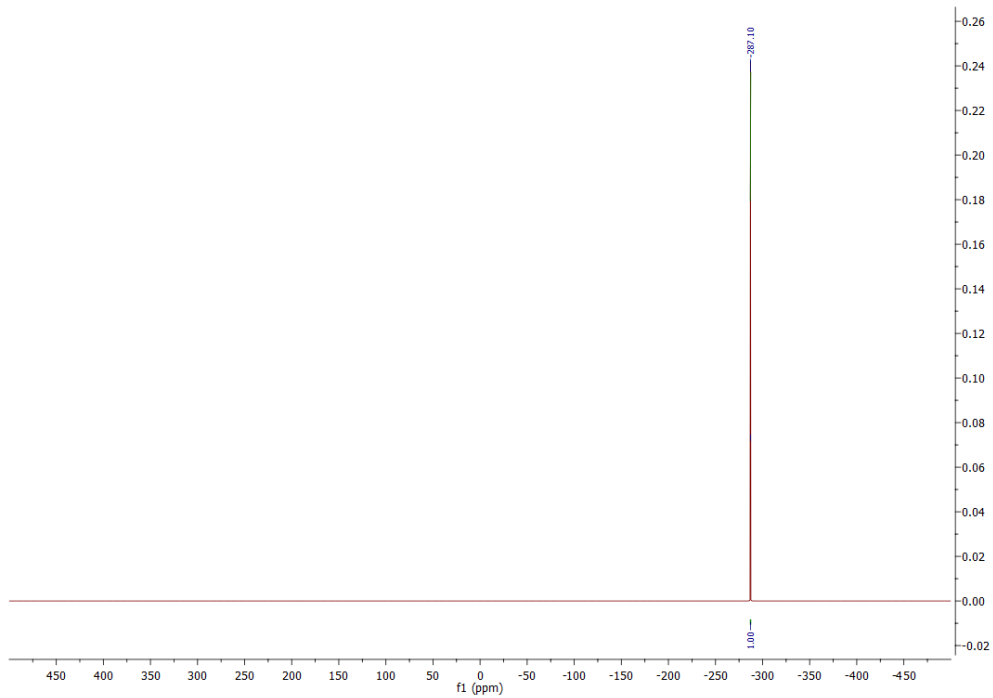
Слика ДМ65. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R6**.



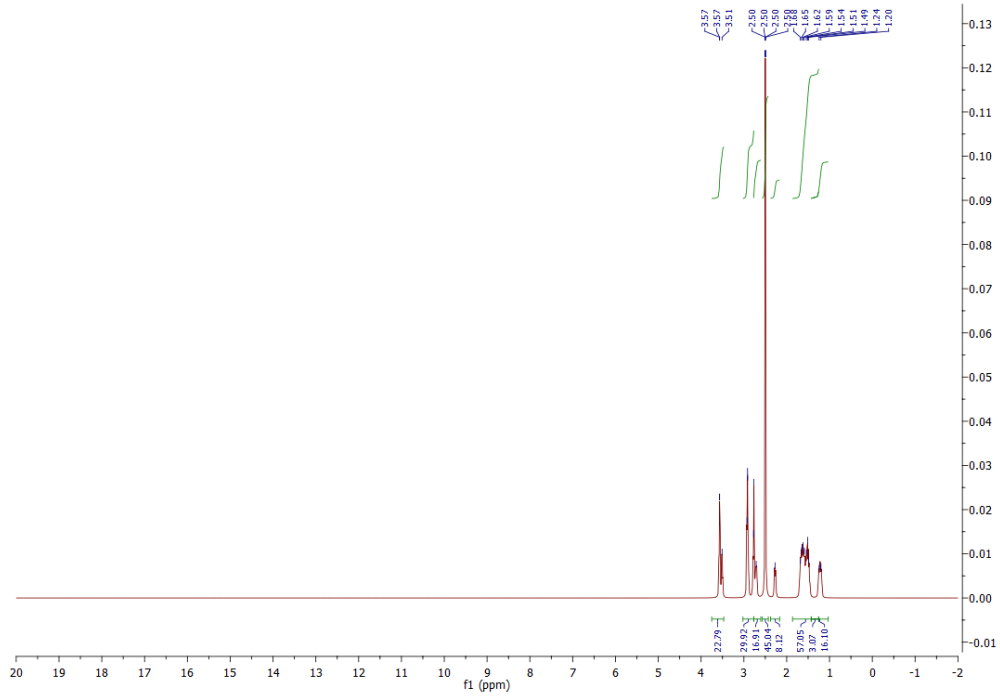
Слика ДМ66. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R7**.



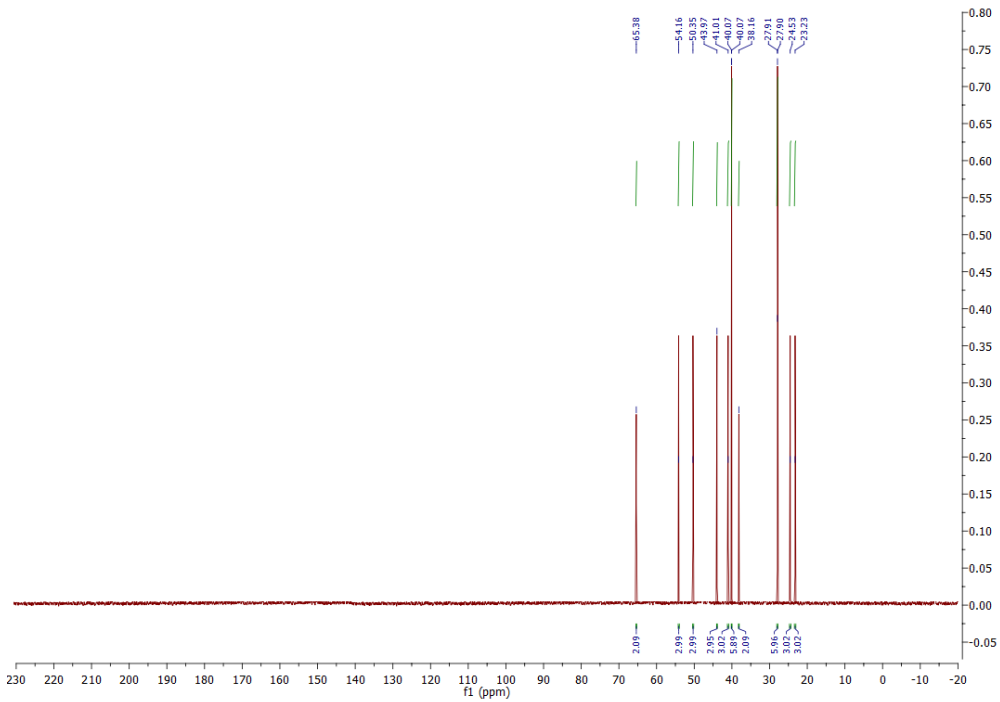
Слика ДМ67. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R7**.



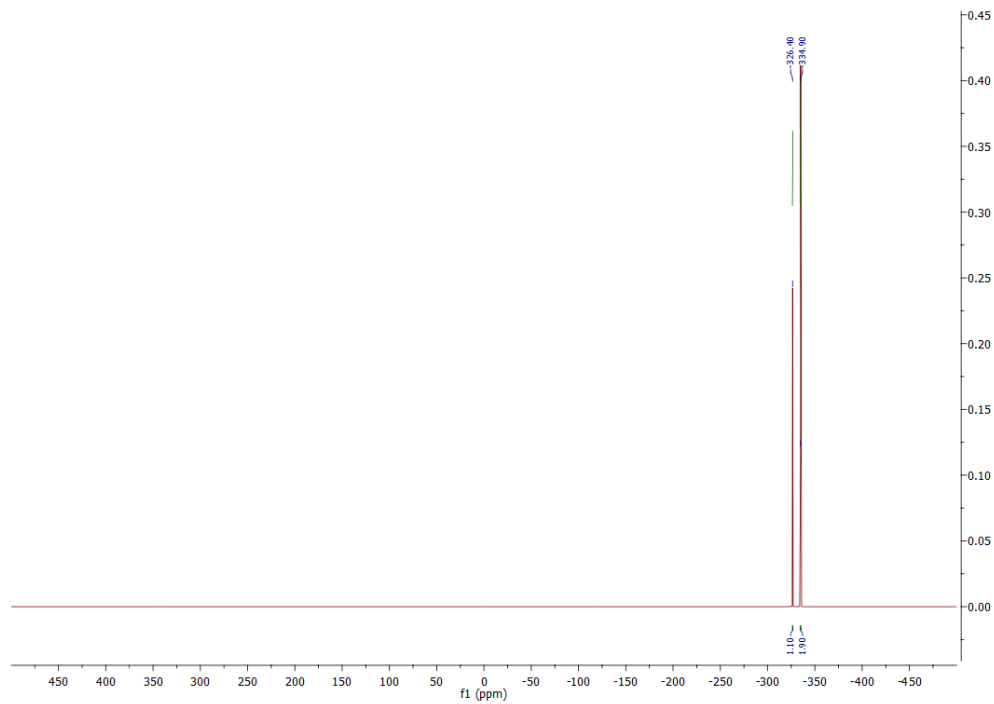
Слика ДМ68. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R7**.



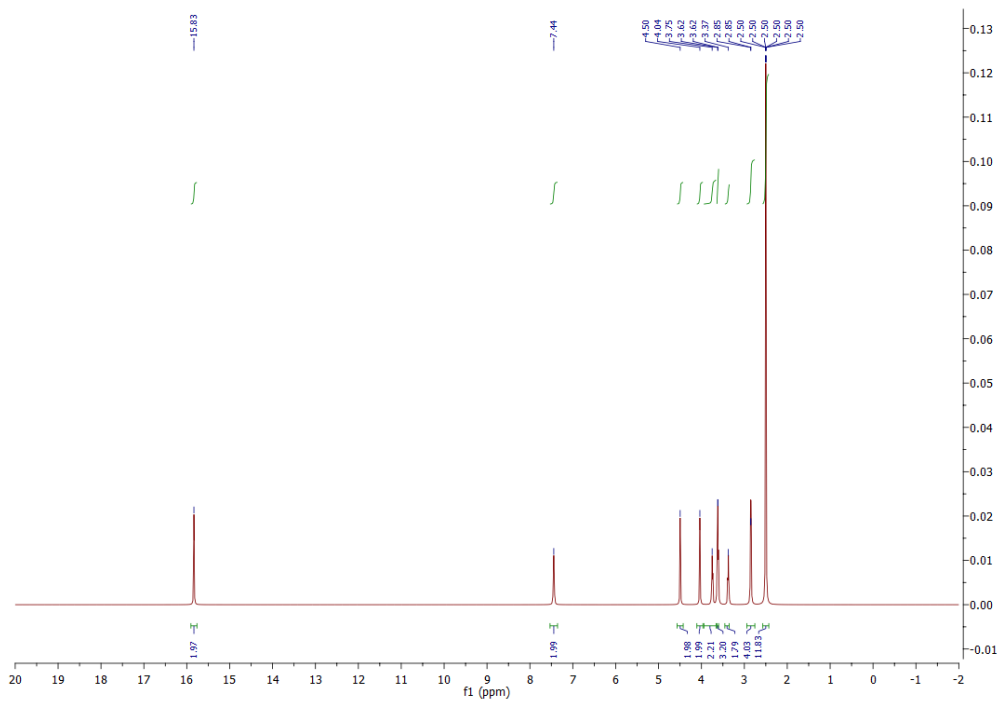
Слика ДМ69. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R8**.



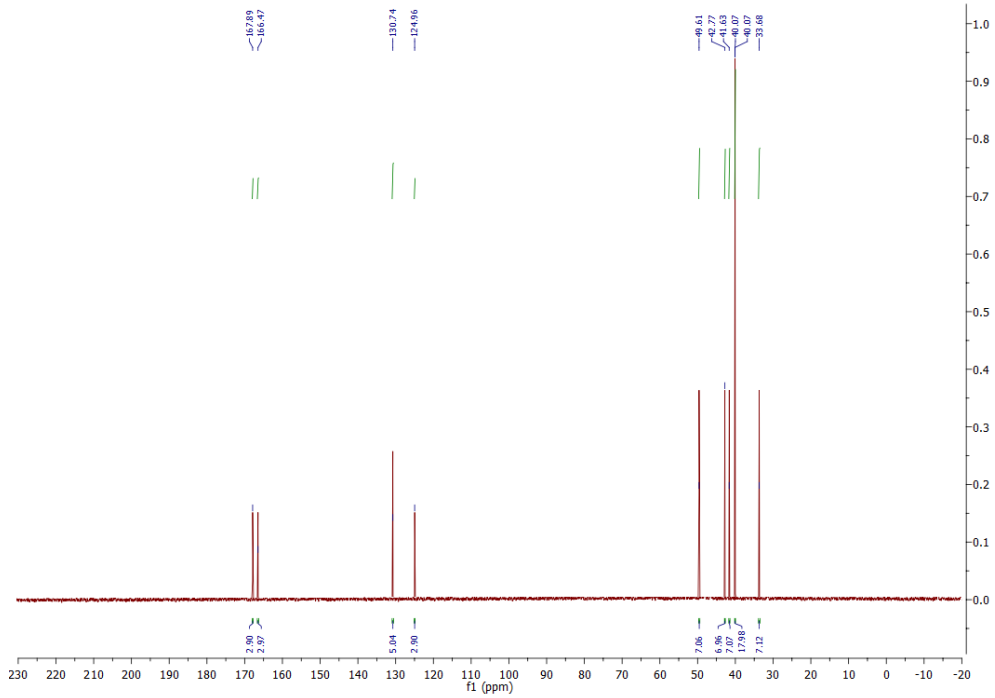
Слика ДМ70. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R8**.



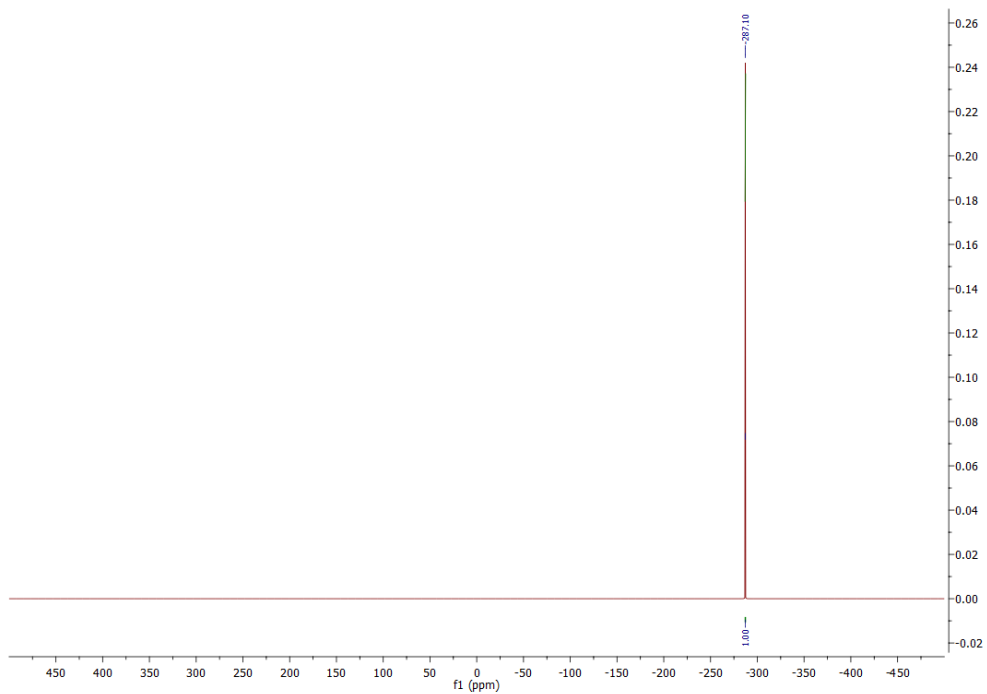
Слика ДМ71. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R8**.



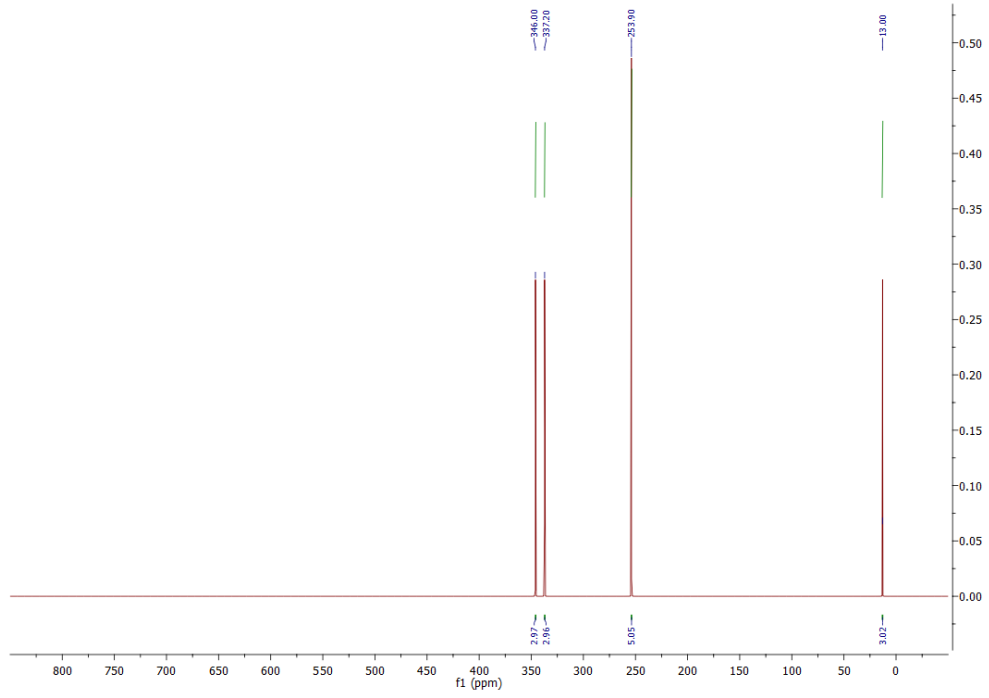
Слика ДМ72. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R9**.



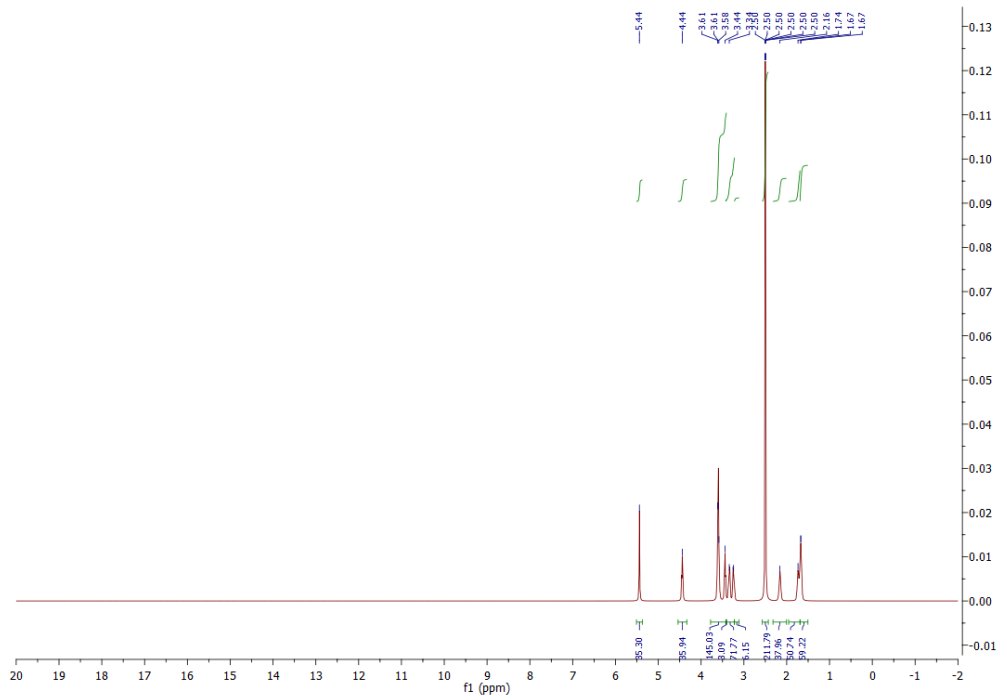
Слика ДМ73. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R9**.



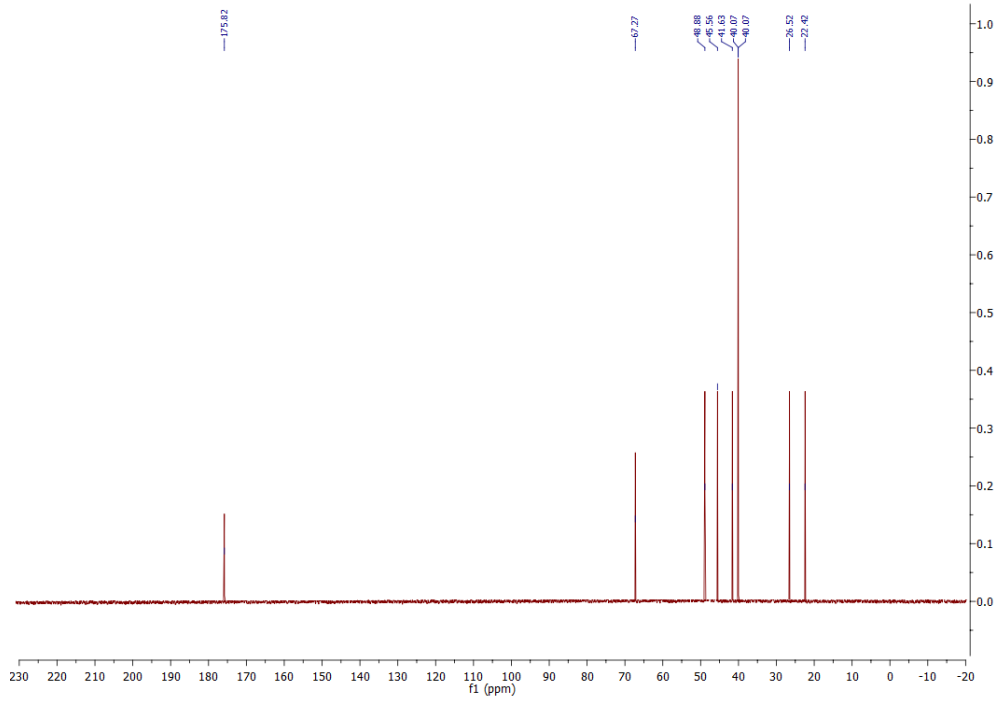
Слика ДМ74. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R9**.



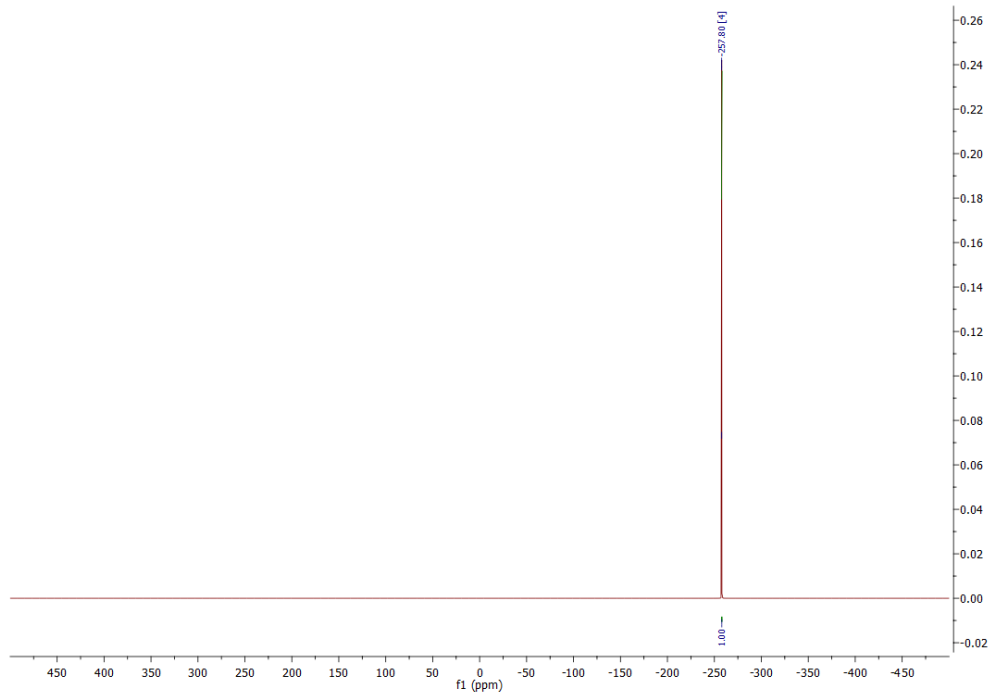
Слика ДМ75. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-R9**.



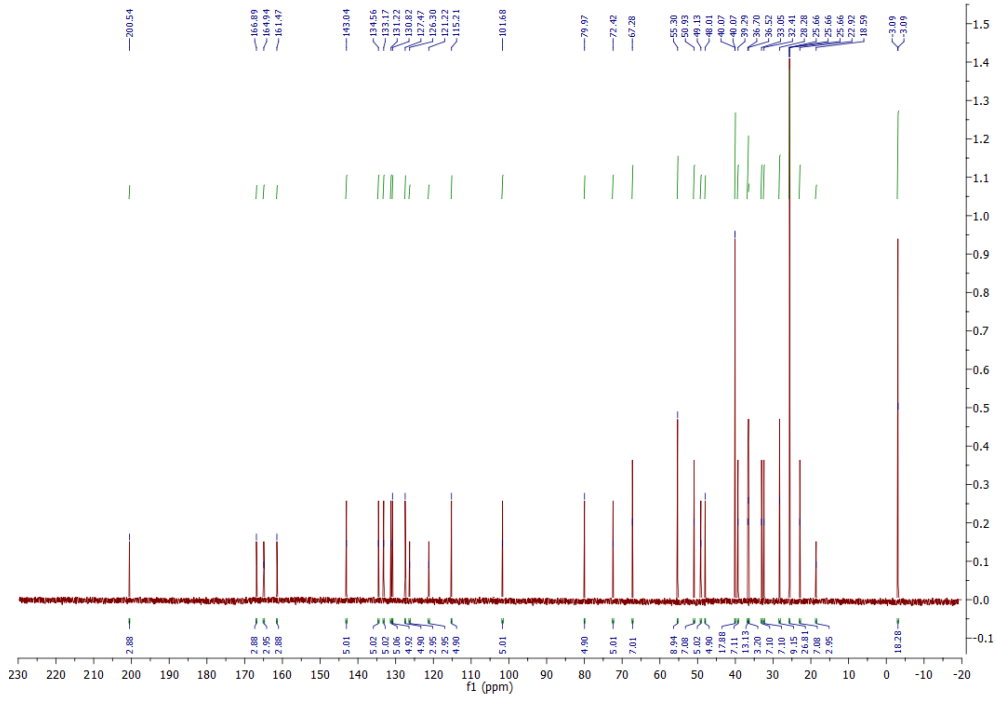
Слика ДМ76. ^1H NMR спектар једињења **Pro-R12**.



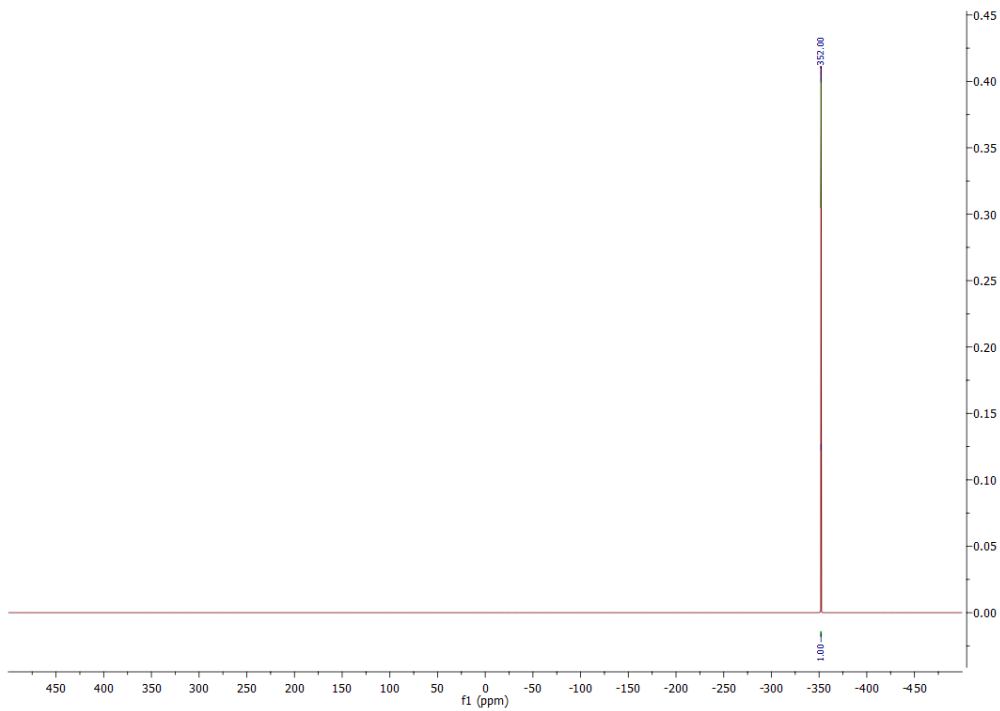
Слика ДМ77. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-R12**.



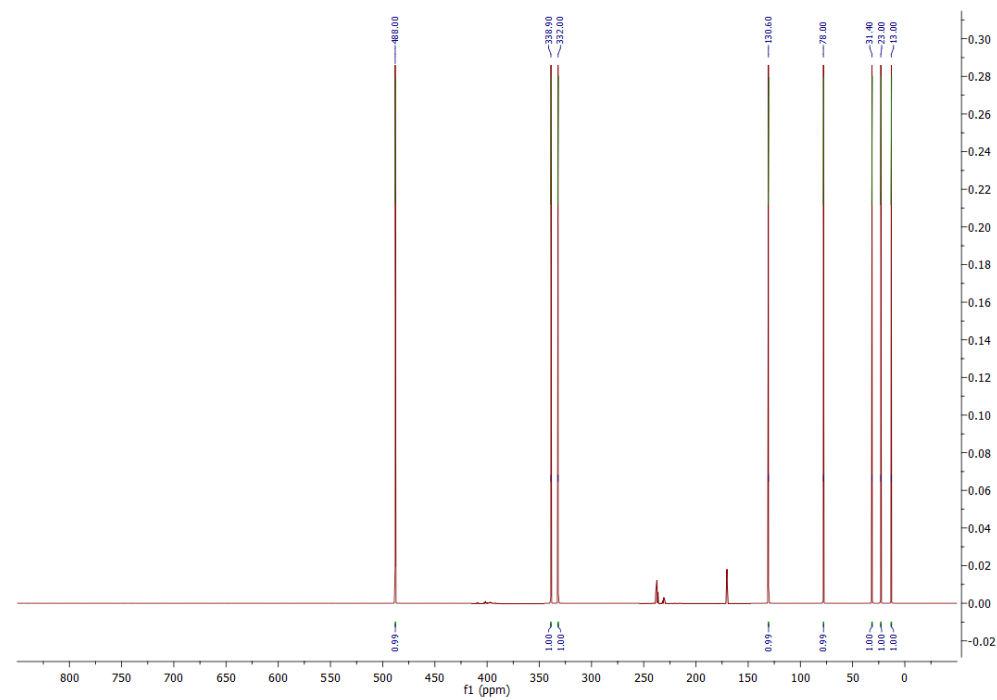
Слика ДМ78. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-R12**.



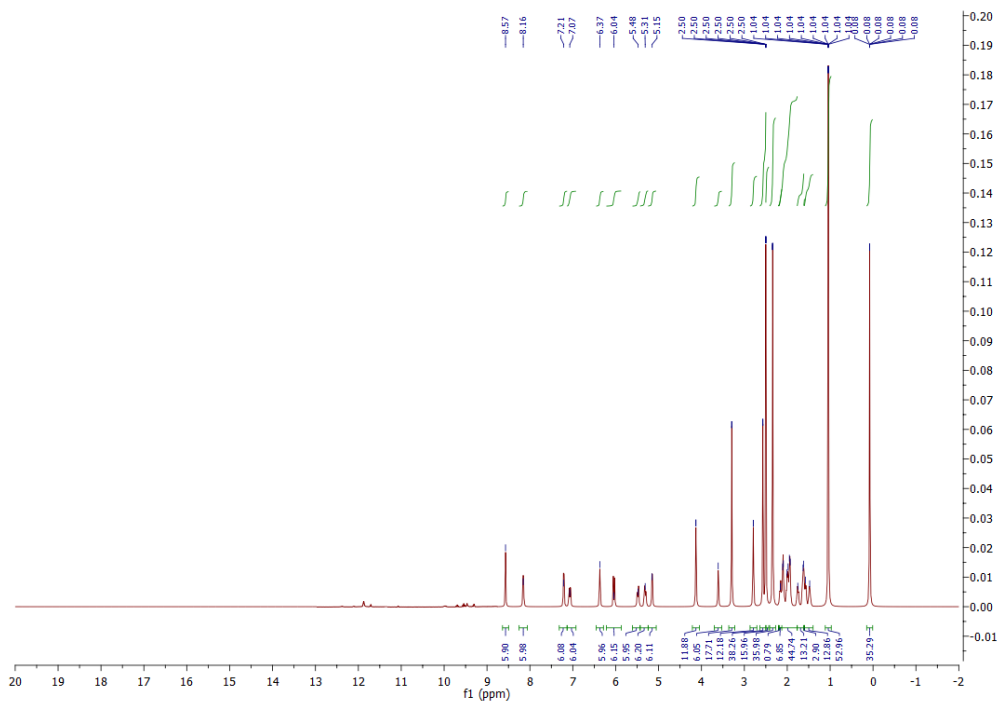
Слика ДМ81. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-1**.



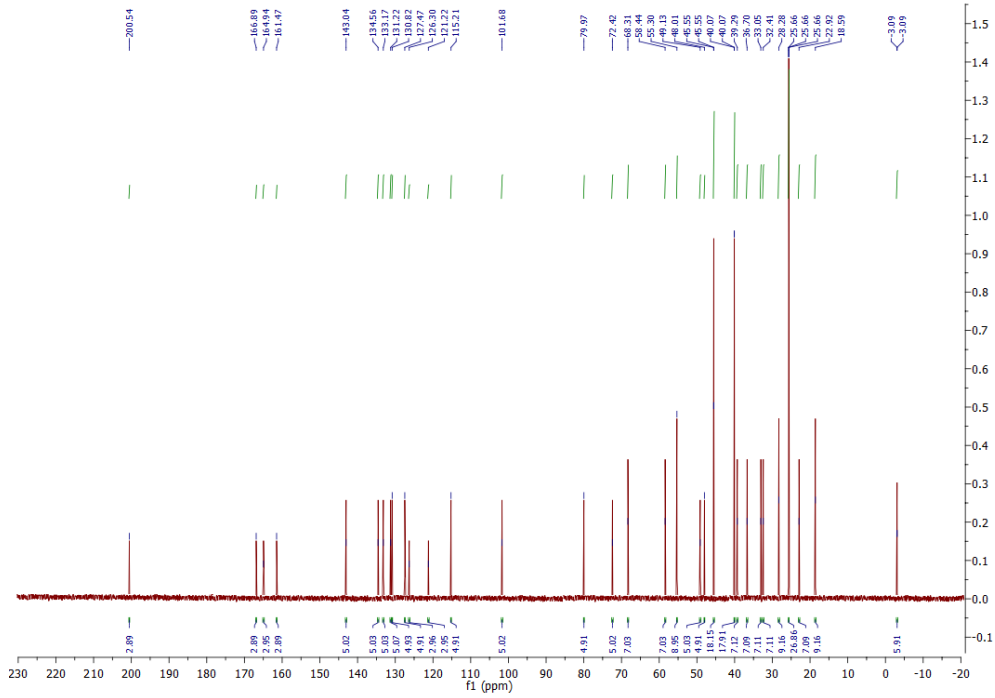
Слика ДМ8. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-1**.



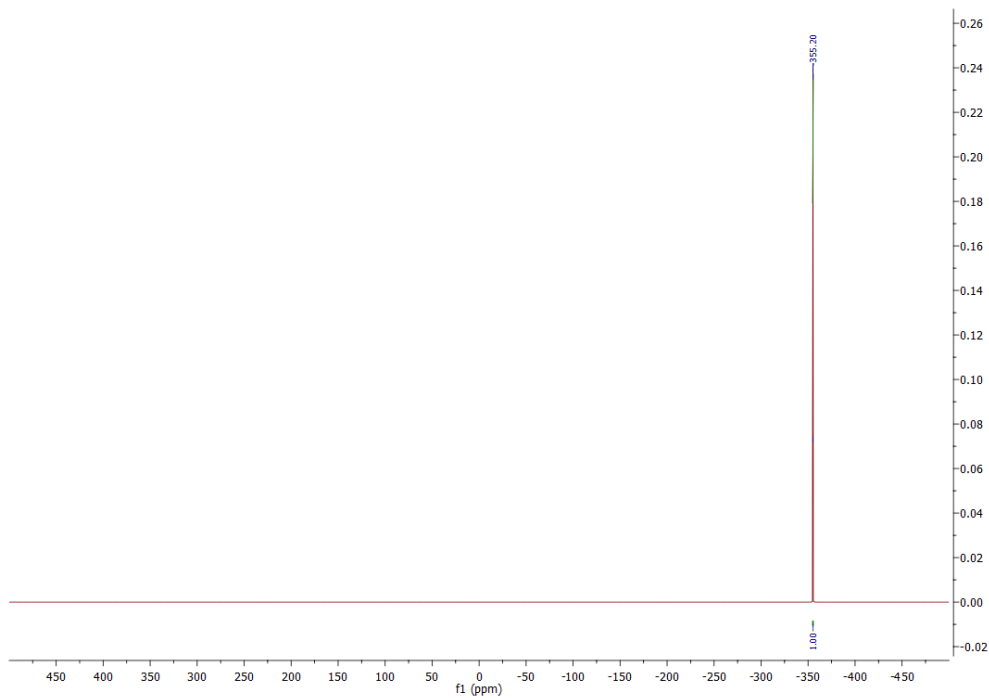
Слика ДМ83. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-1**.



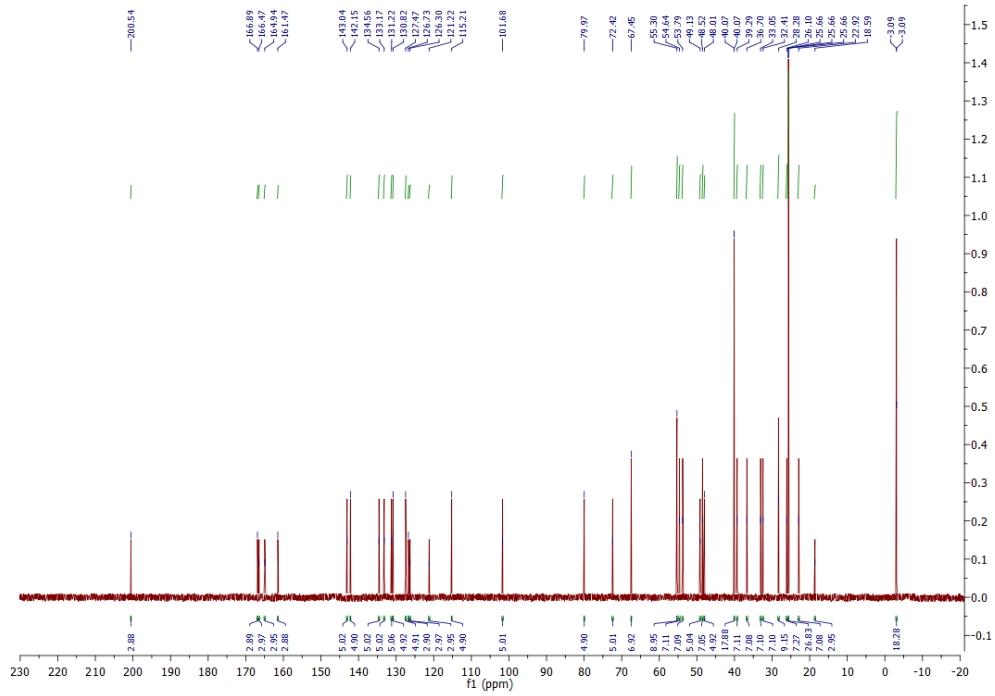
Слика ДМ84. ^1H NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-2**.



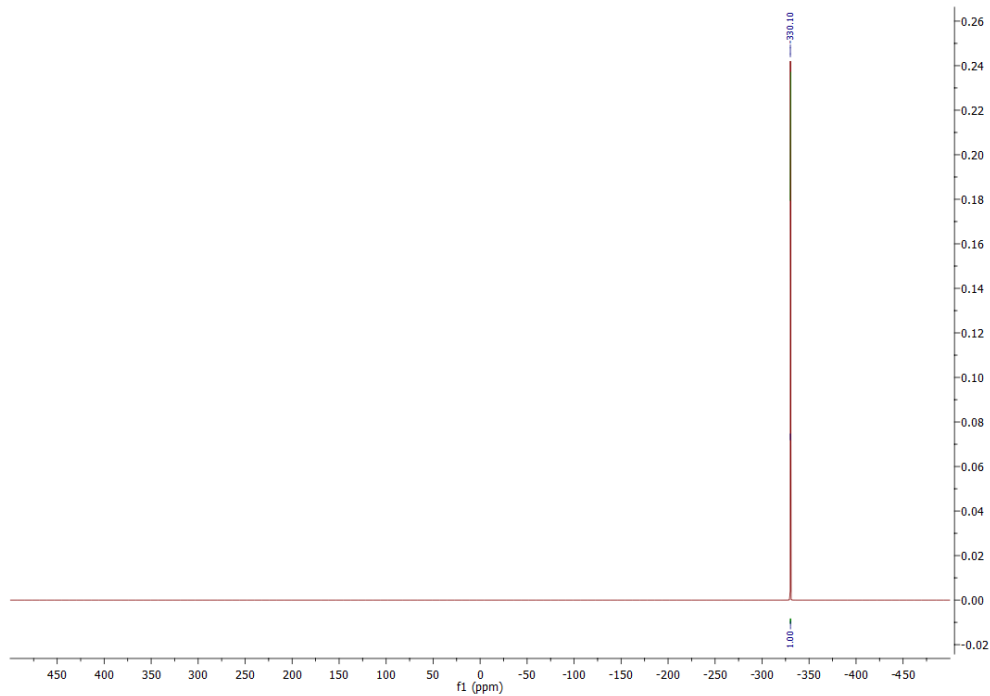
Слика ДМ85. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-2**.



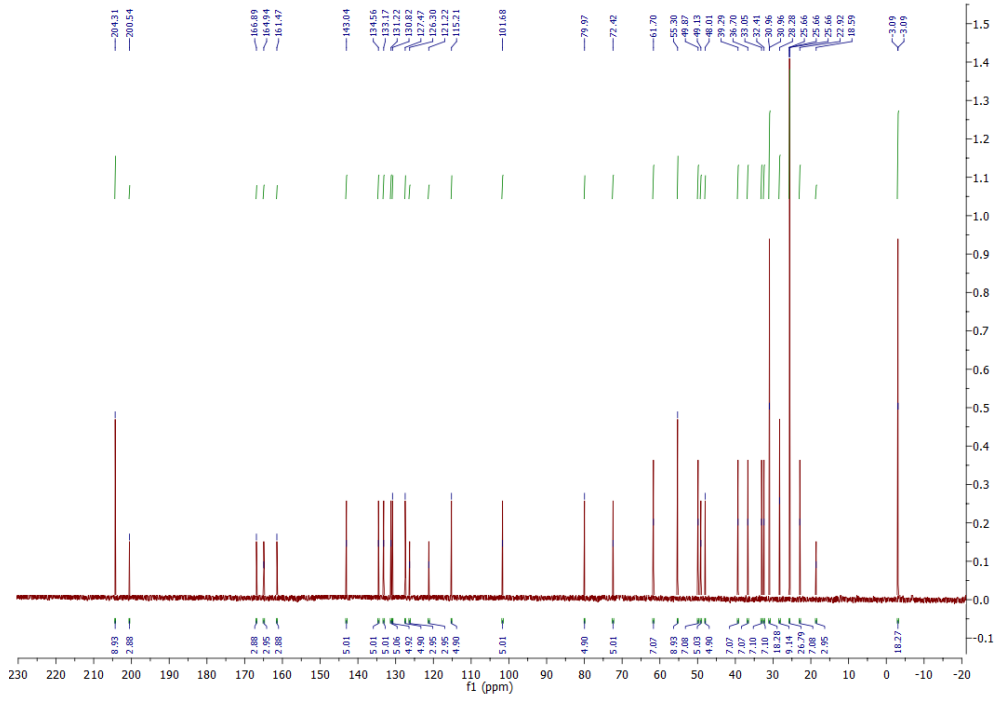
Слика ДМ86. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-2**.



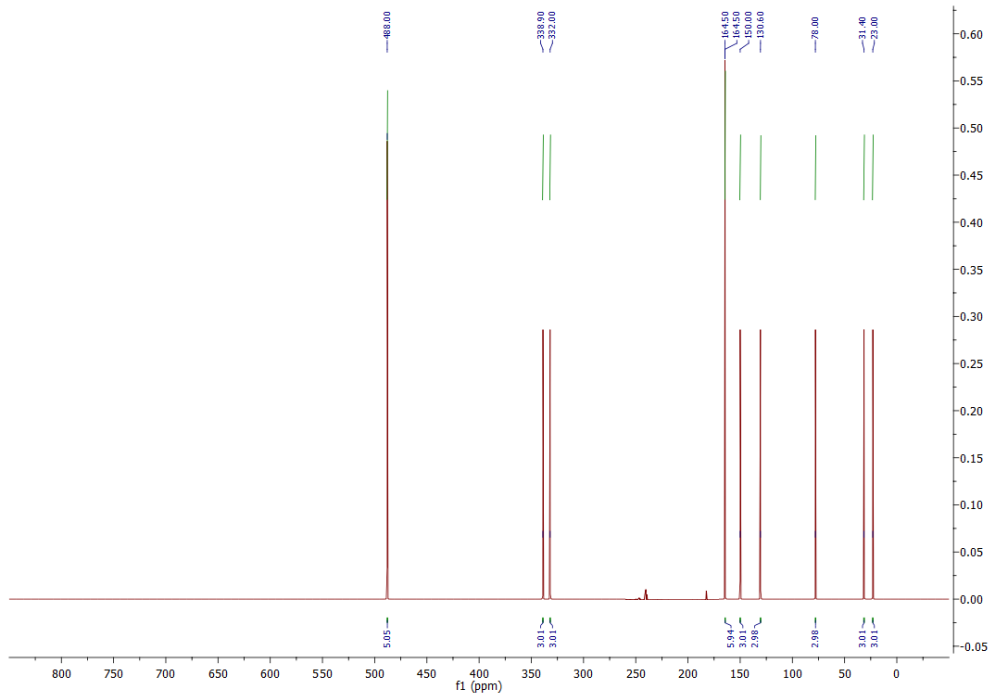
Слика ДМ89. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-3**.



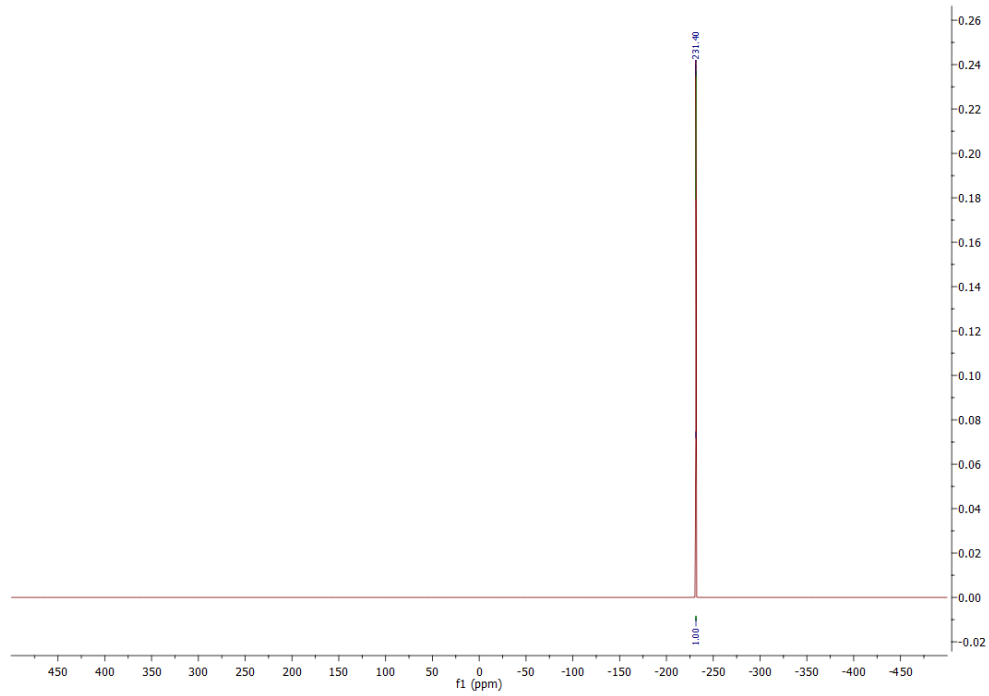
Слика ДМ90. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-3**.



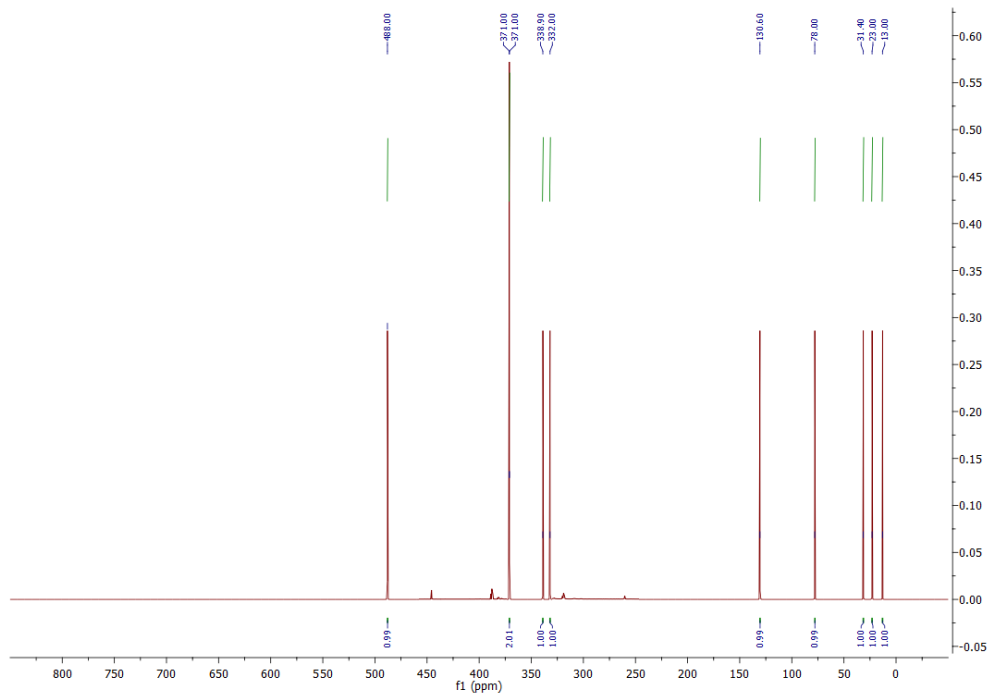
Слика ДМ93. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-4**.



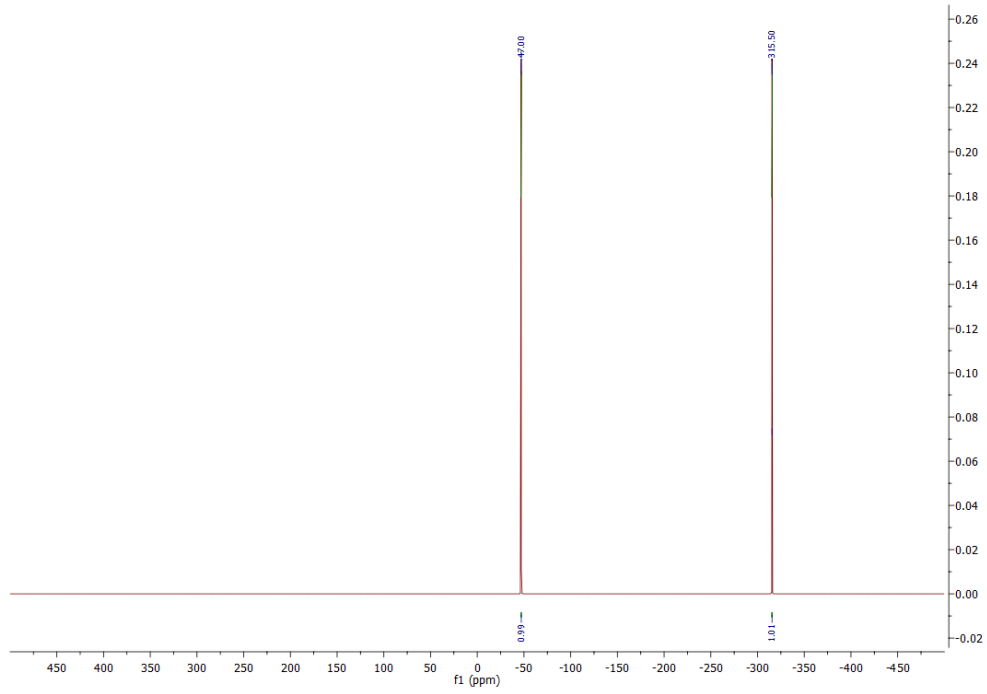
Слика ДМ94. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-4**.



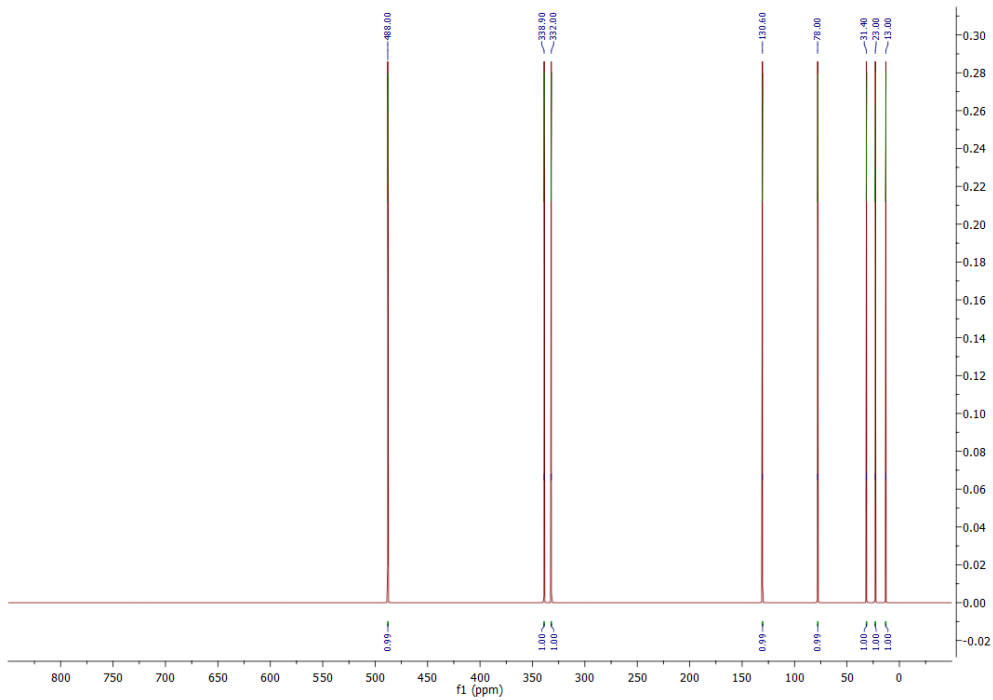
Слика ДМ97. ¹⁵N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-5**.



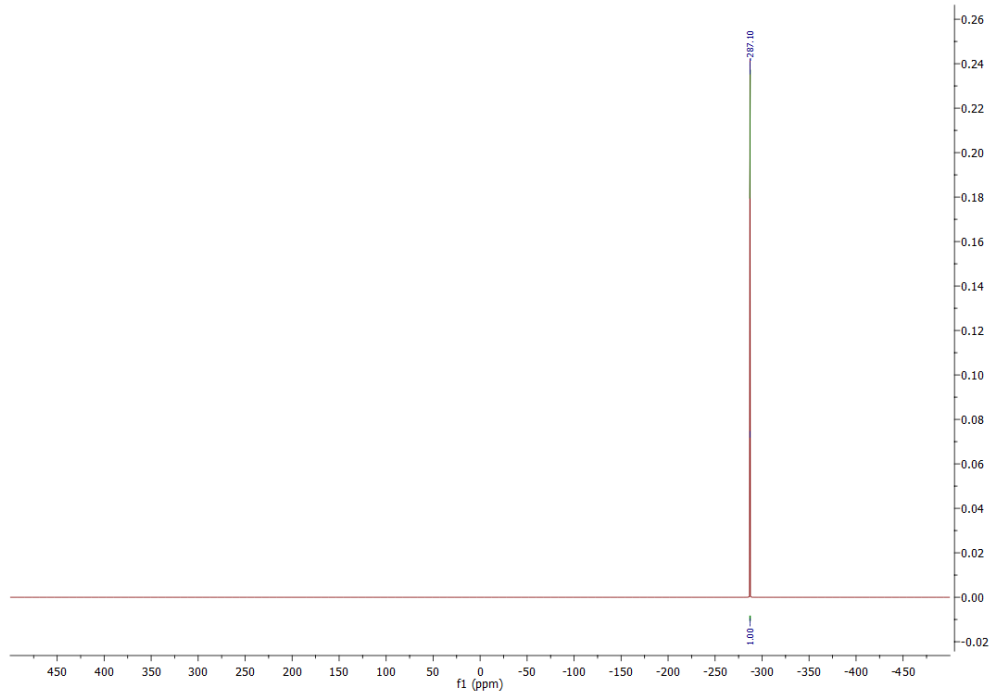
Слика ДМ98. ¹⁷O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-5**.



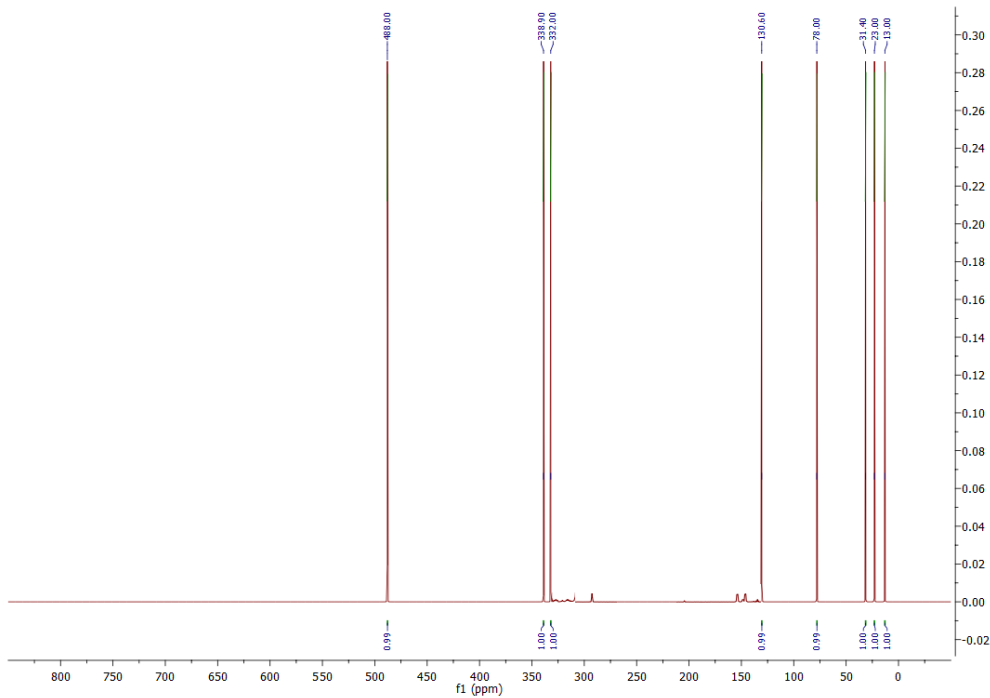
Слика ДМ101. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-6**.



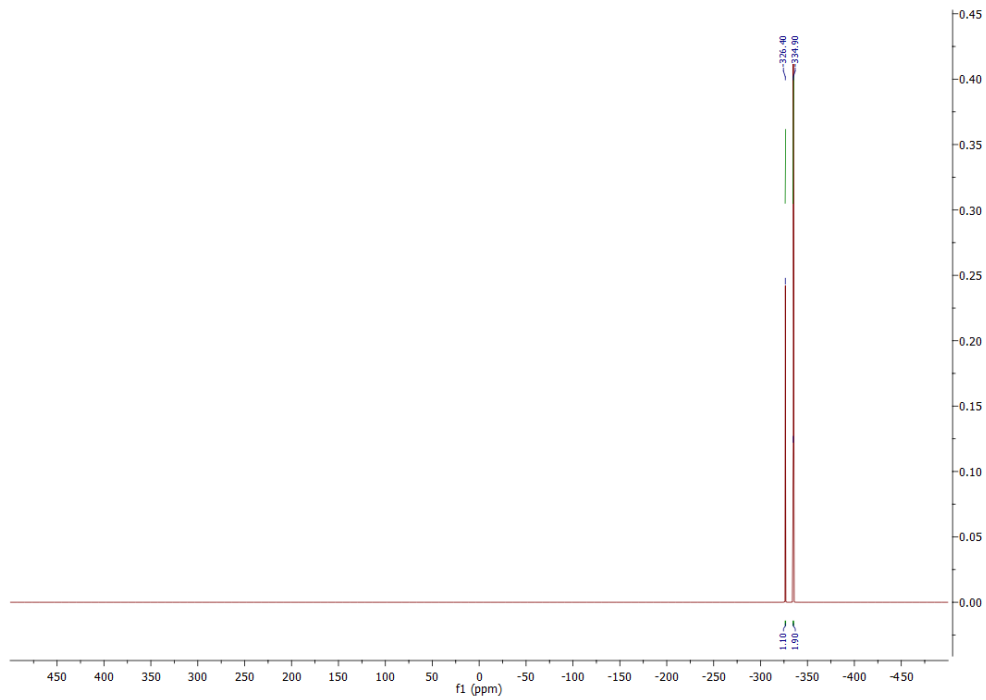
Слика ДМ102. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-6**.



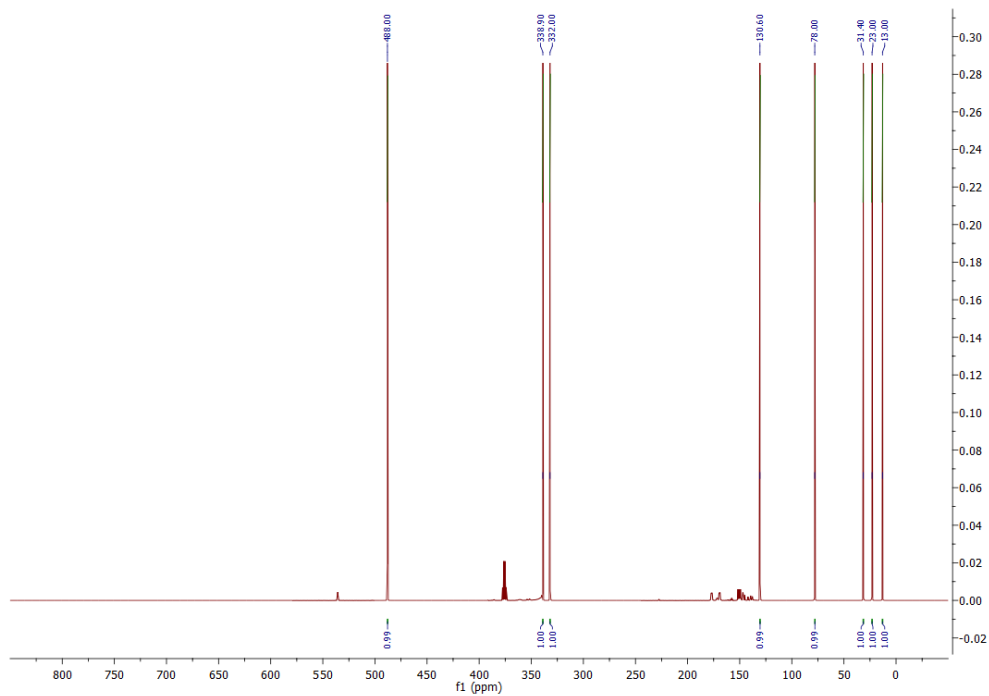
Слика ДМ105. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-7**.



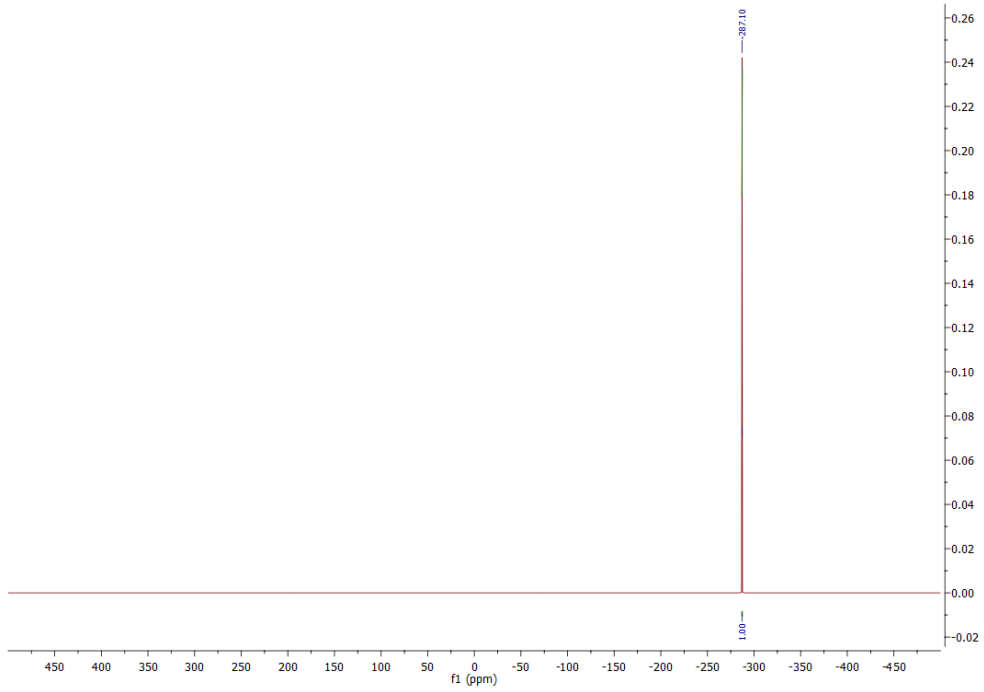
Слика ДМ106. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-7**.



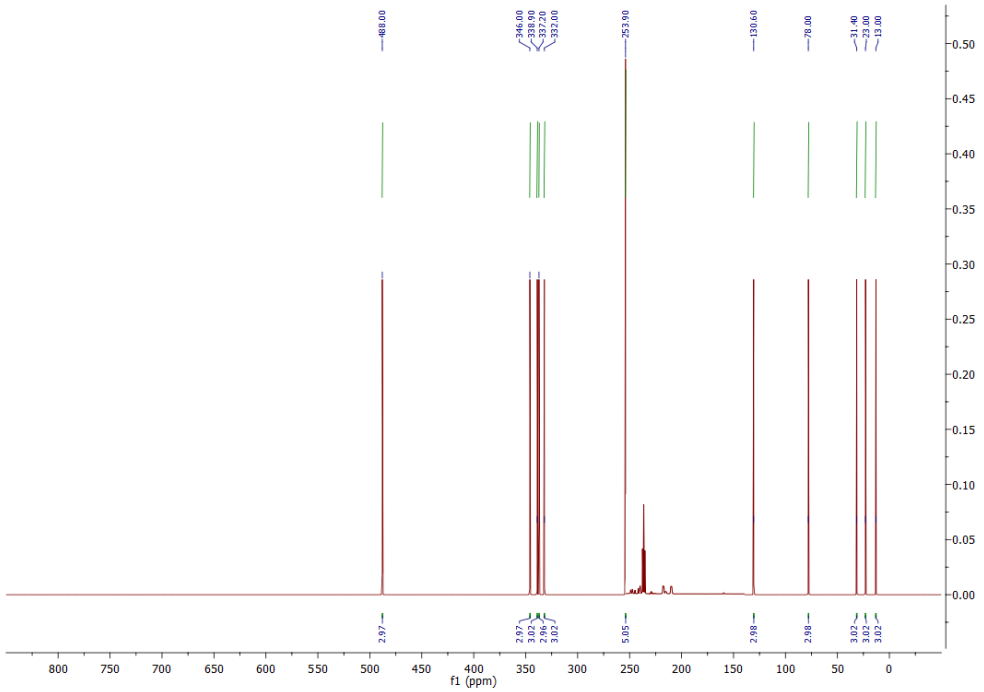
Слика ДМ109. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-8**.



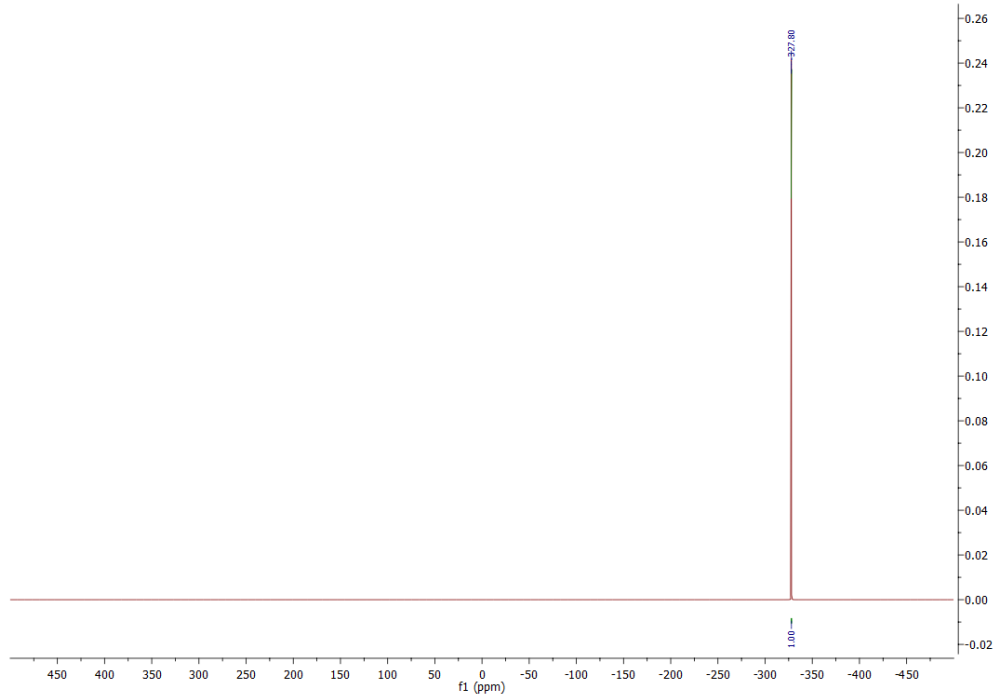
Слика ДМ110. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-8**.



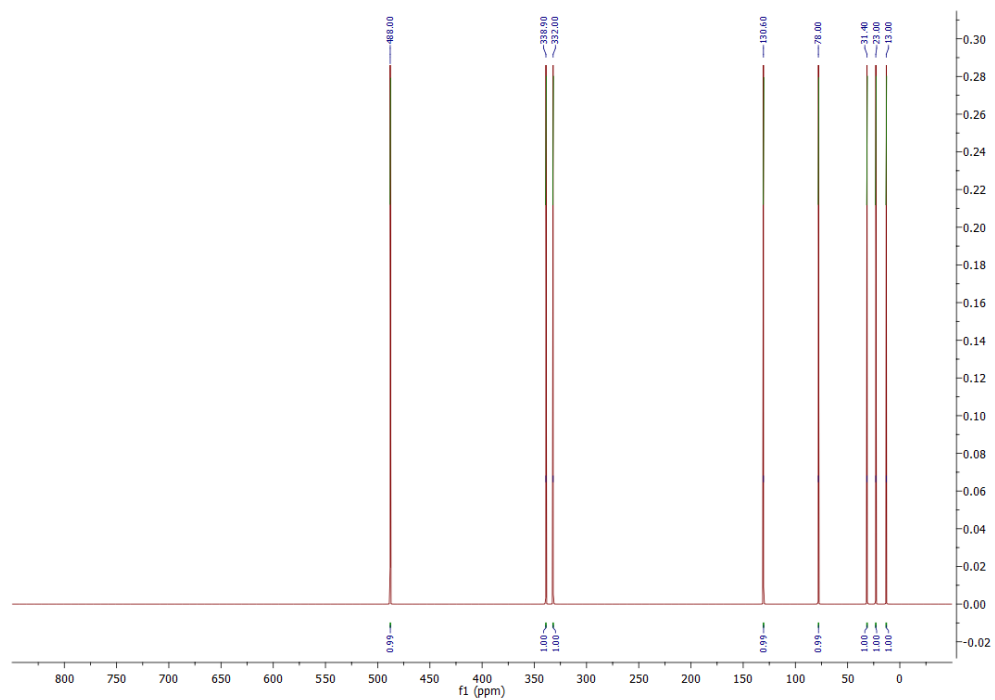
Слика ДМ113. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-9**.



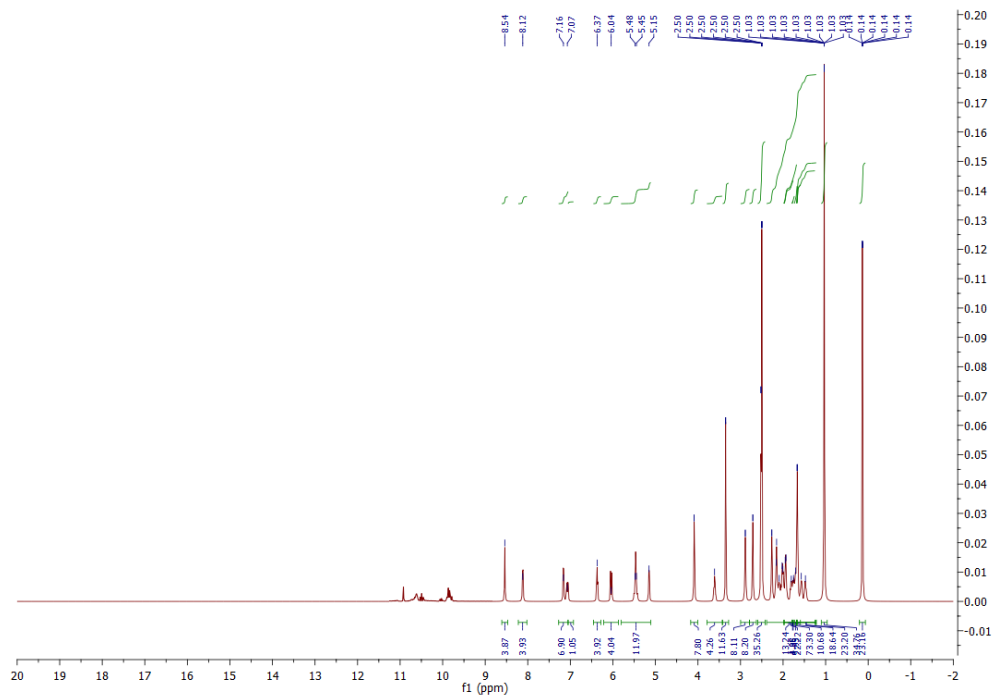
Слика ДМ114. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-9**.



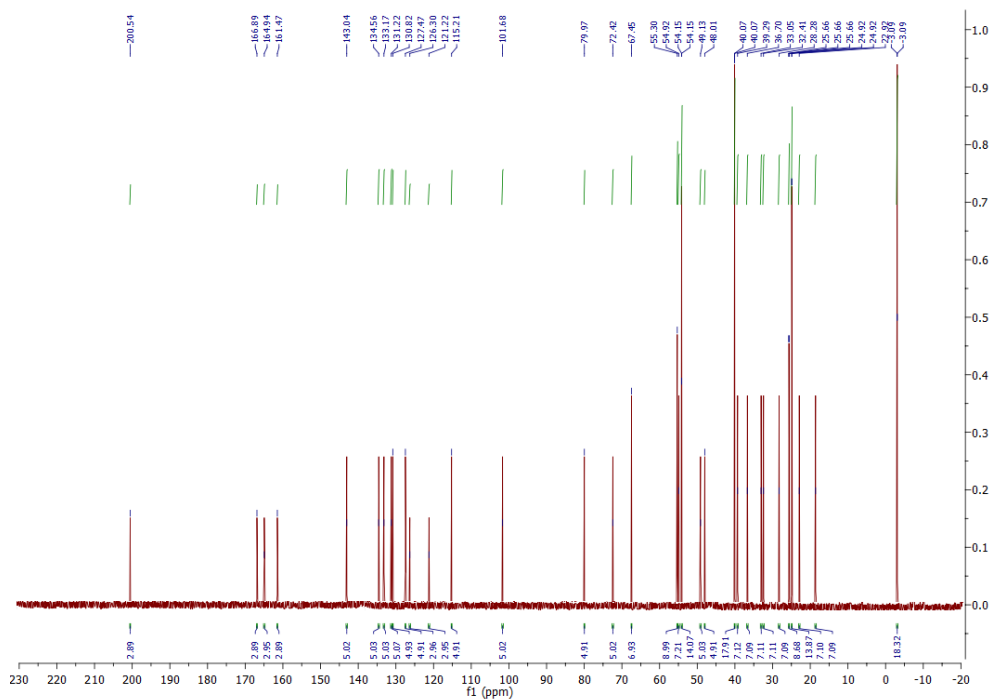
Слика ДМ117. ¹⁵N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-10**.



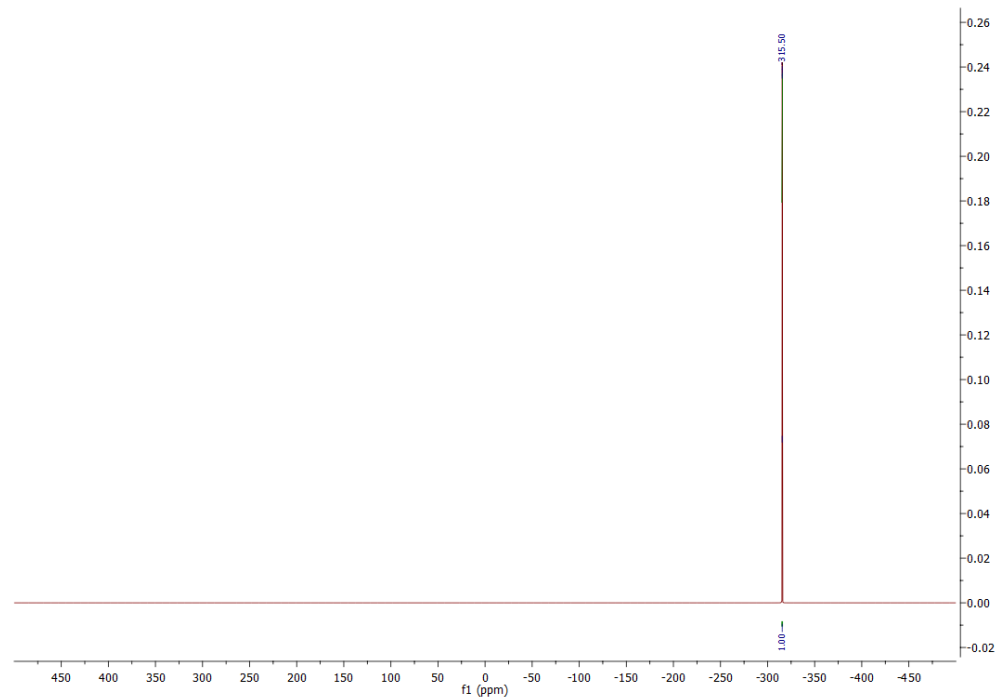
Слика ДМ118. ¹⁷O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-10**.



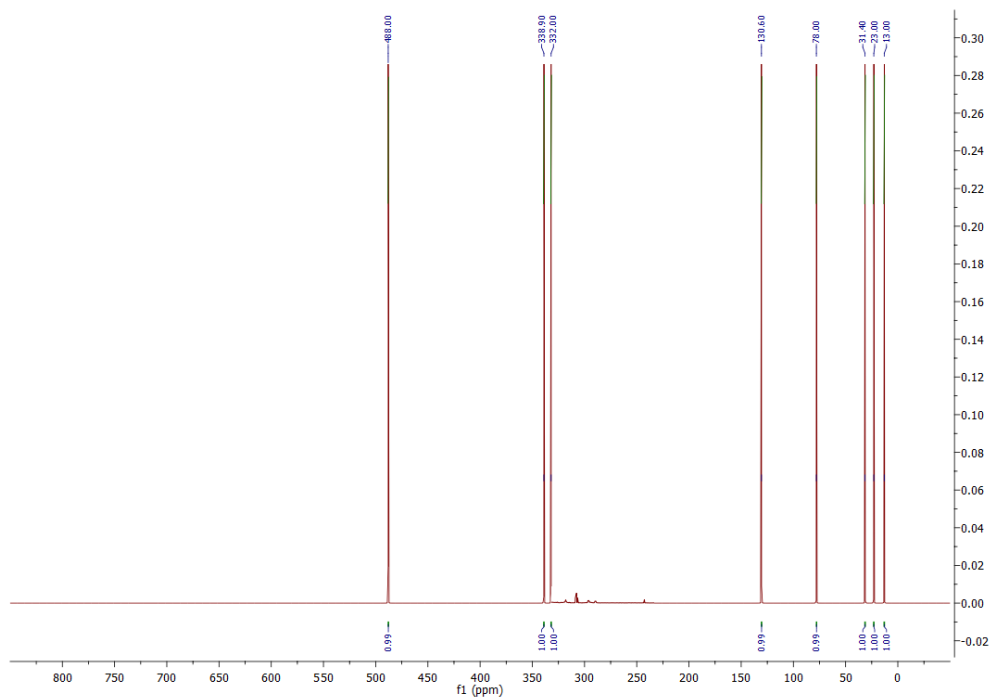
Слика ДМ119. ^1H NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-11**.



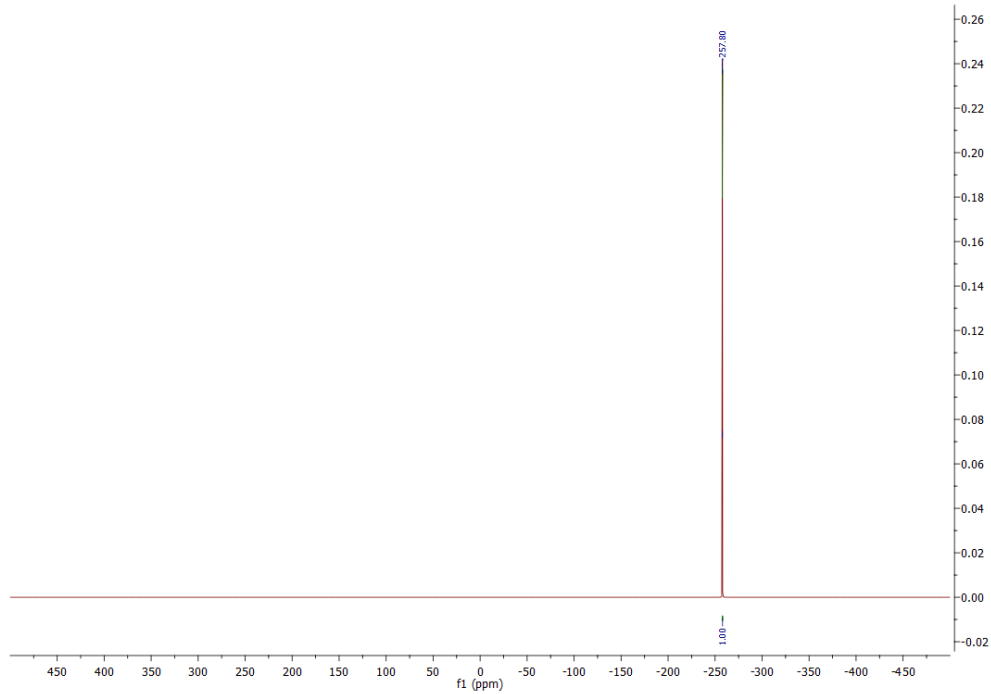
Слика ДМ120. ^{13}C NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-11**.



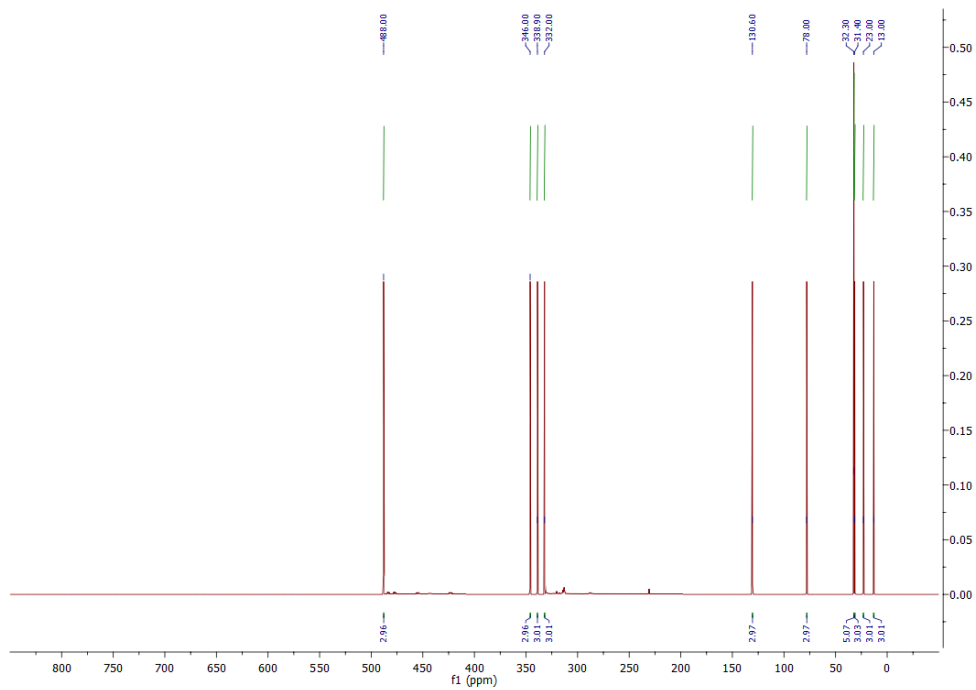
Слика ДМ121. ^{15}N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-11**.



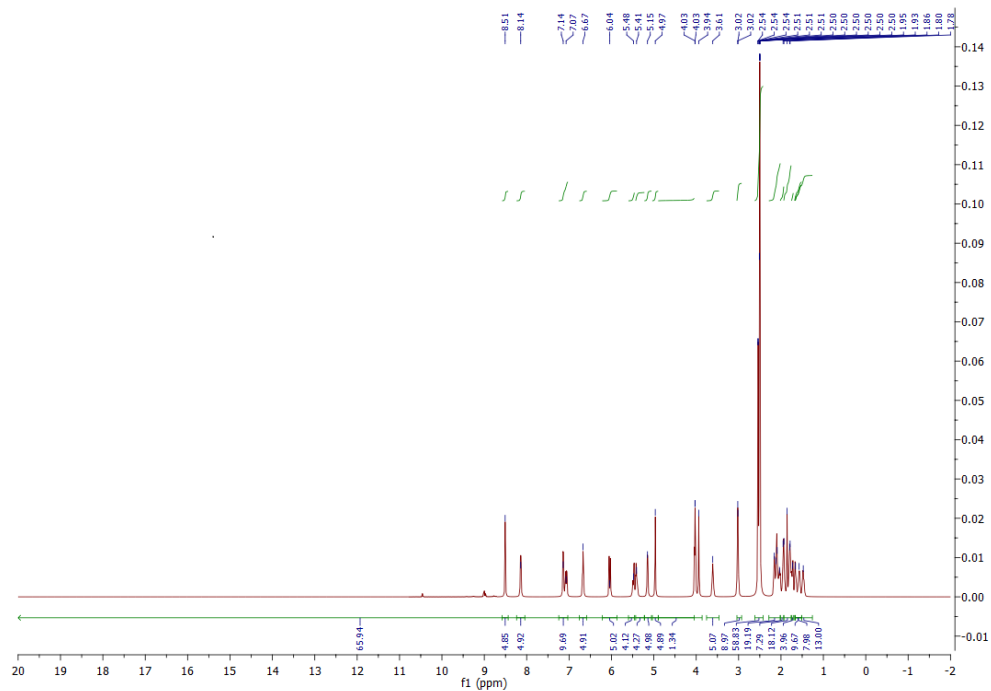
Слика ДМ122. ^{17}O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-11**.



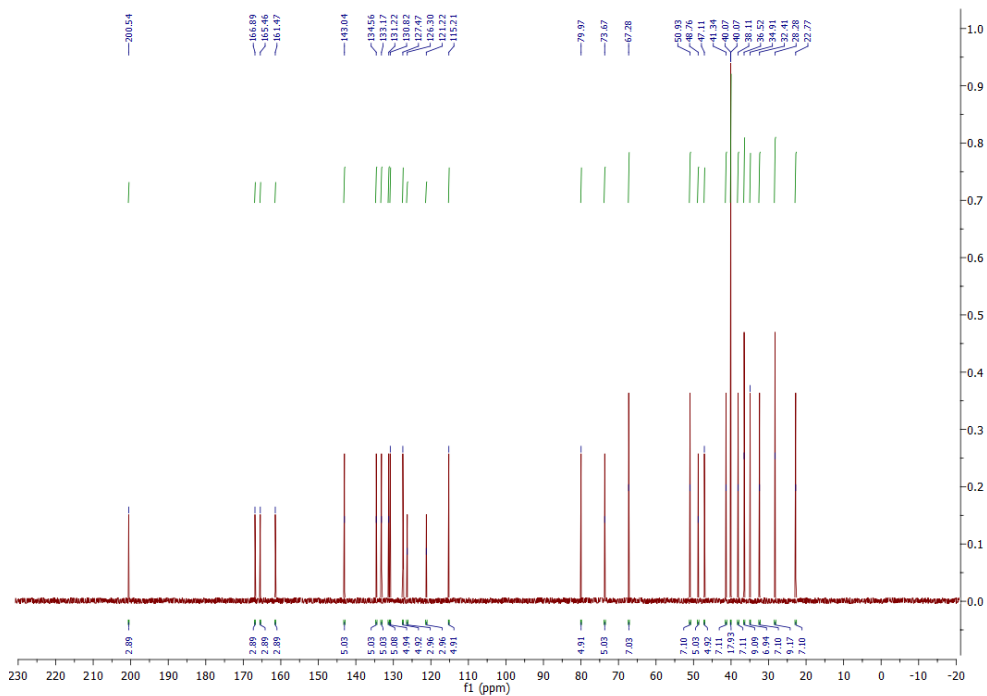
Слика ДМ125. ¹⁵N NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-12**.



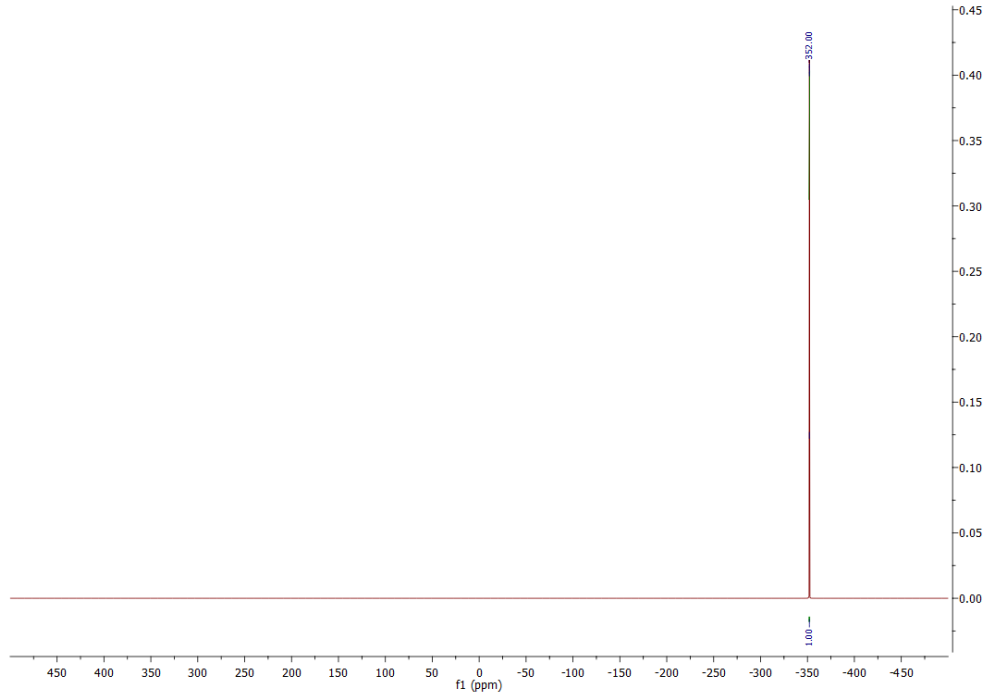
Слика ДМ126. ¹⁷O NMR спектар једињења **Pro-3DPQ-12**.



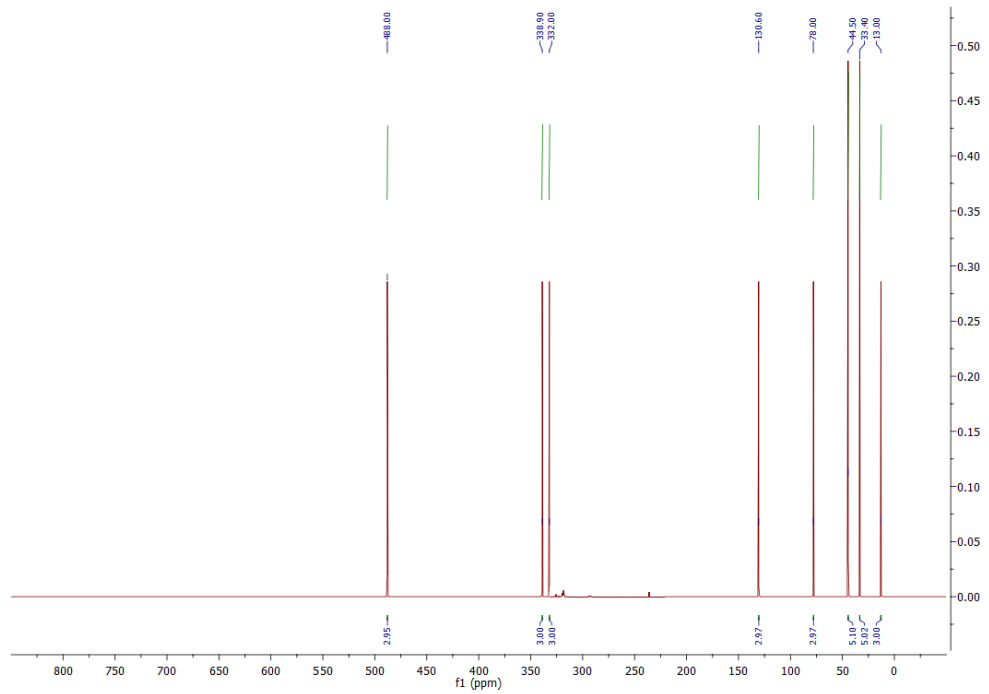
Слика ДМ127. ^1H NMR спектар једињења 3DPQ-1.



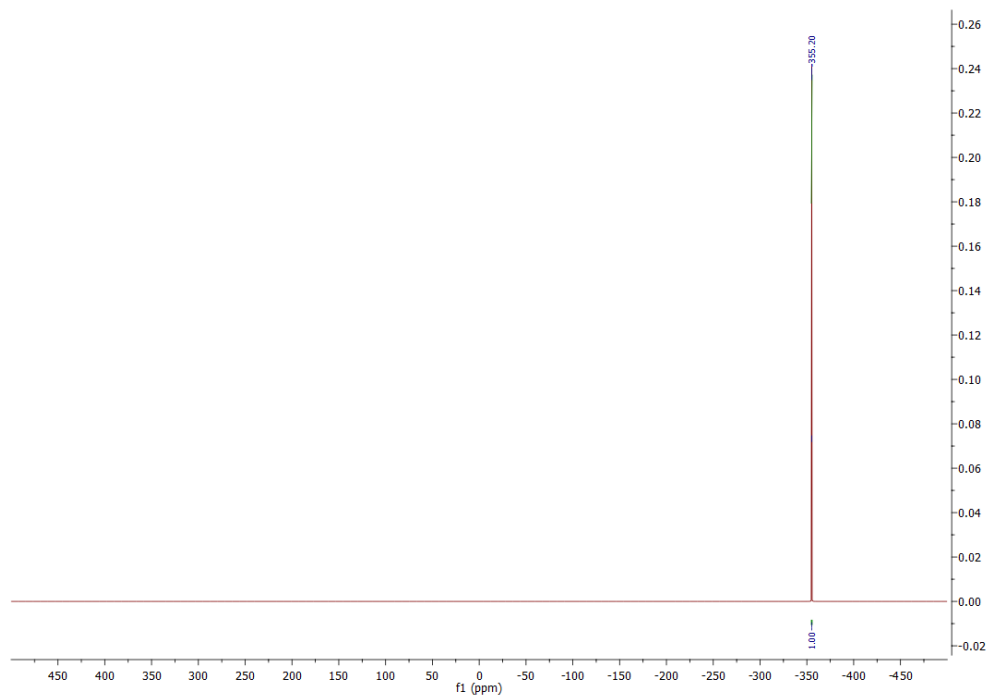
Слика ДМ128. ^{13}C NMR спектар једињења 3DPQ-1.



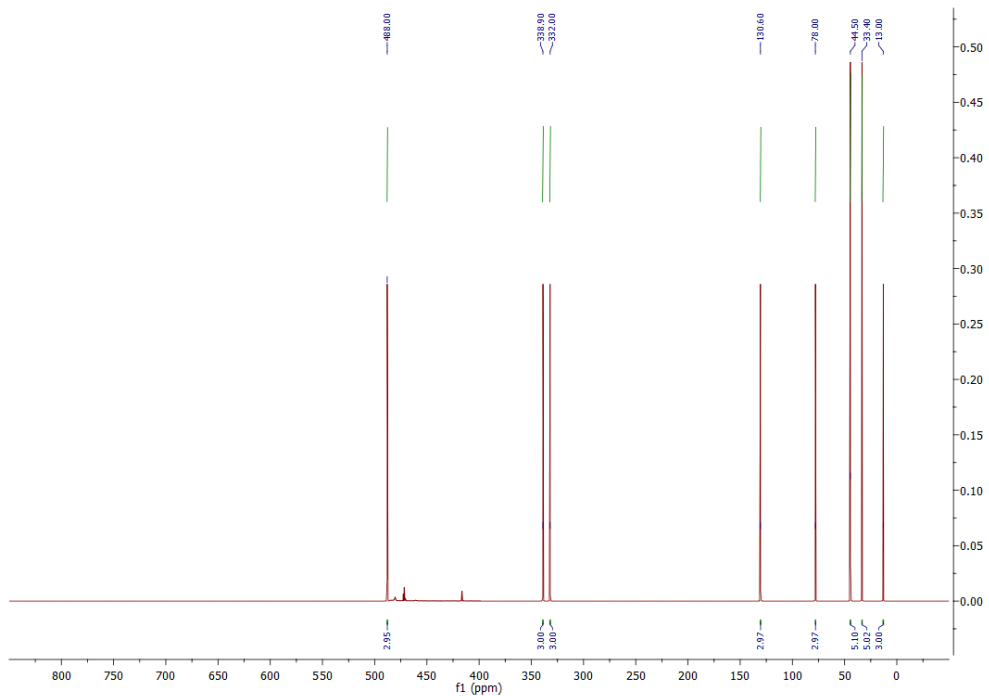
Слика ДМ129. ^{15}N NMR спектар једињења **3DPQ-1**.



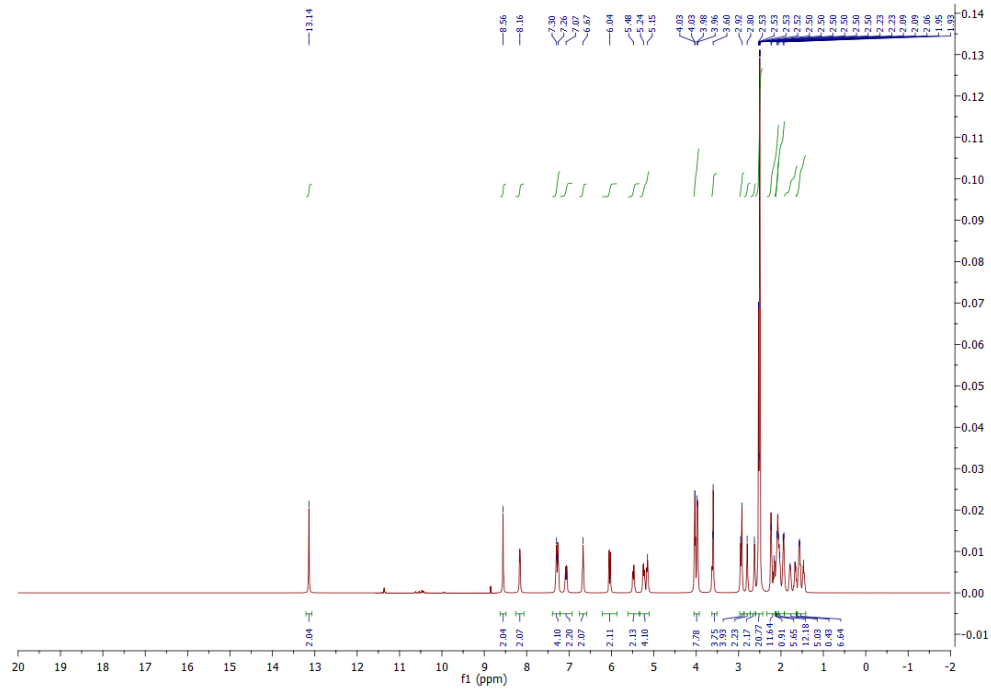
Слика ДМ130. ^{17}O NMR спектар једињења **3DPQ-1**.



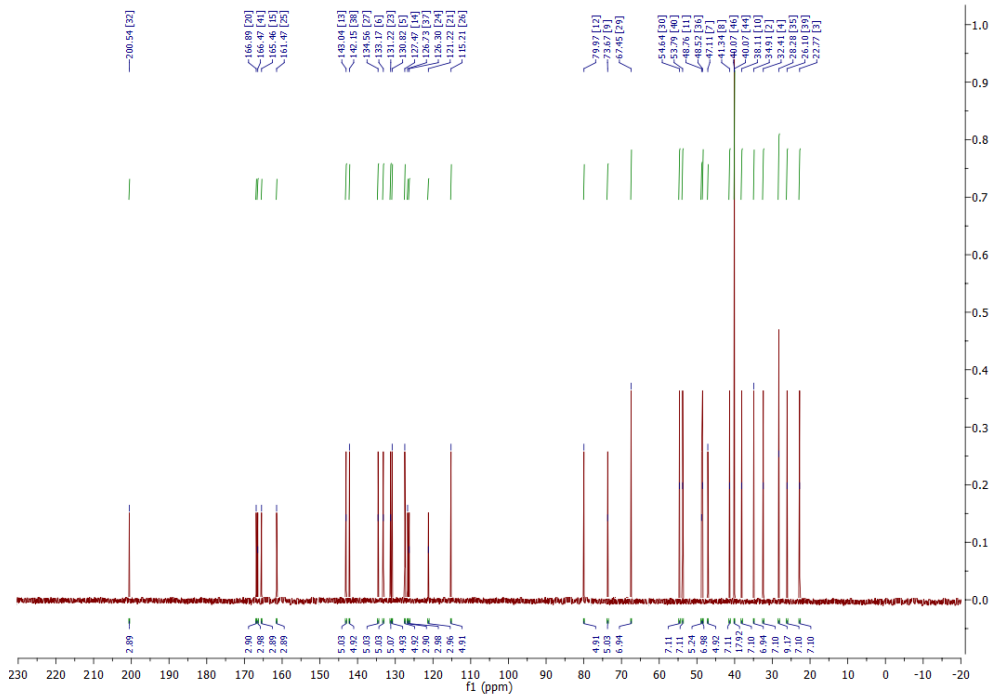
Слика ДМ133. ^{15}N NMR спектар једињења **ZDPQ-2**.



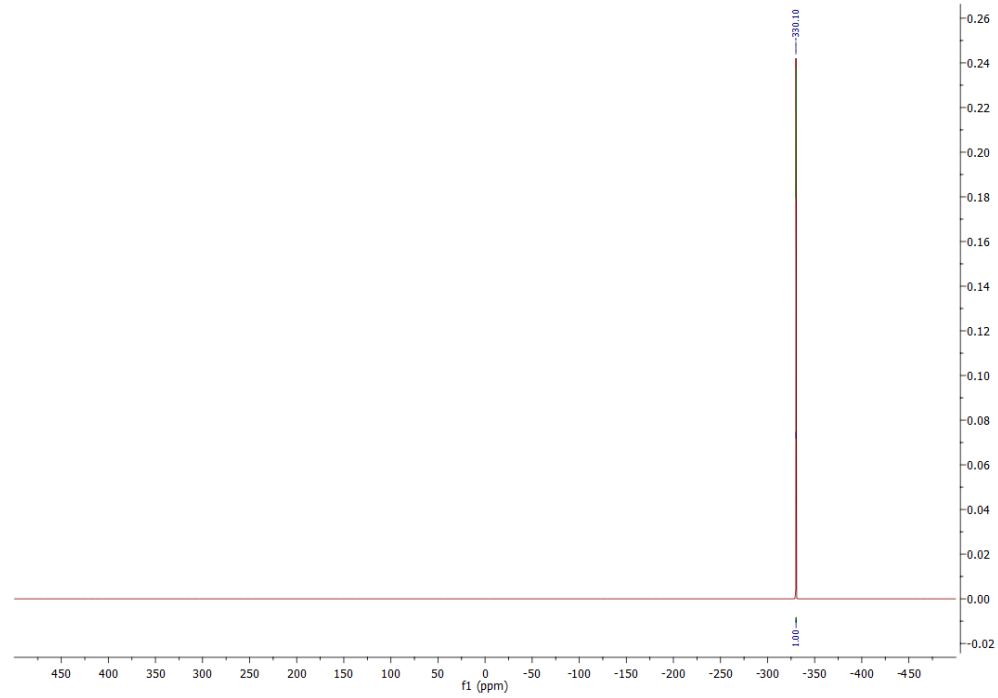
Слика ДМ134. ^{17}O NMR спектар једињења **ZDPQ-2**.



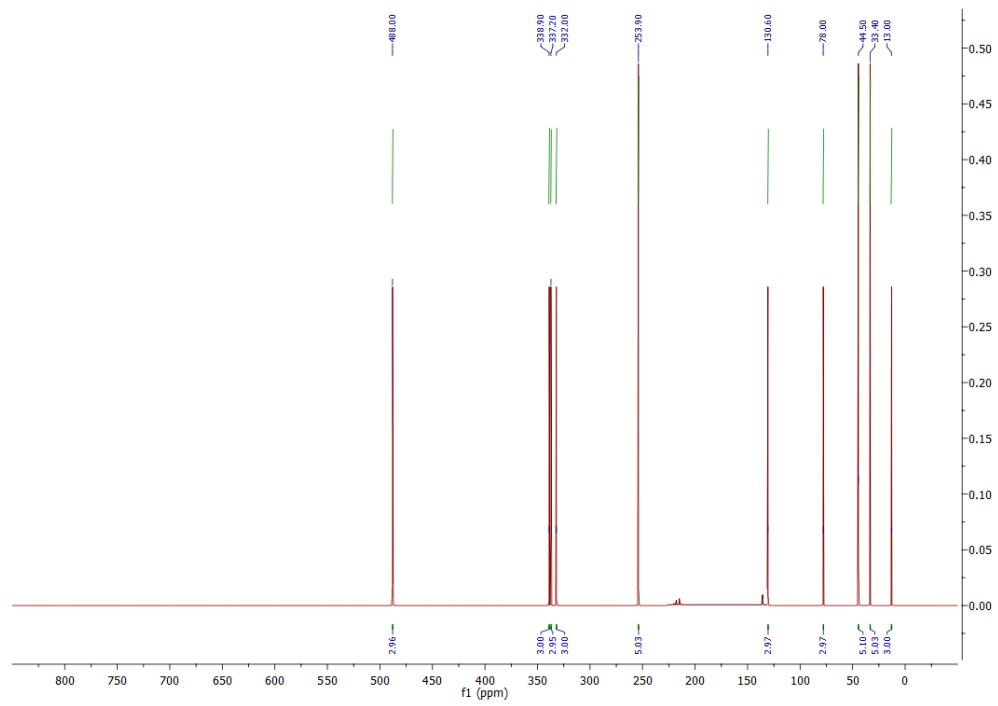
Слика ДМ135. ¹H NMR спектар једињења 3DPQ-3.



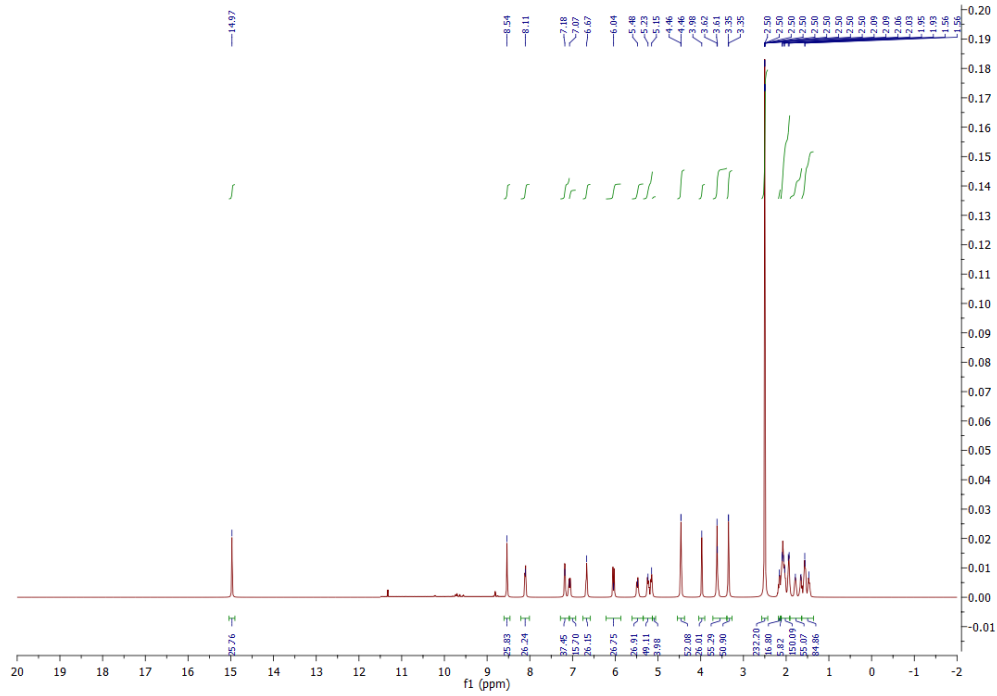
Слика ДМ136. ¹³C NMR спектар једињења 3DPQ-3.



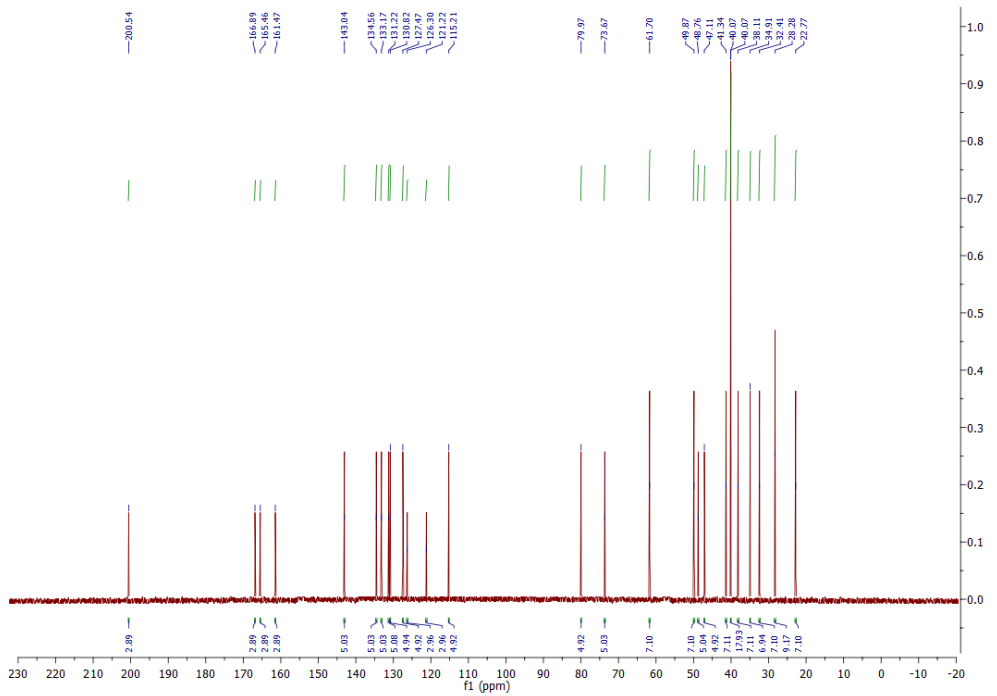
Слика ДМ137. ^{15}N NMR спектар једињења **3DPQ-3**.



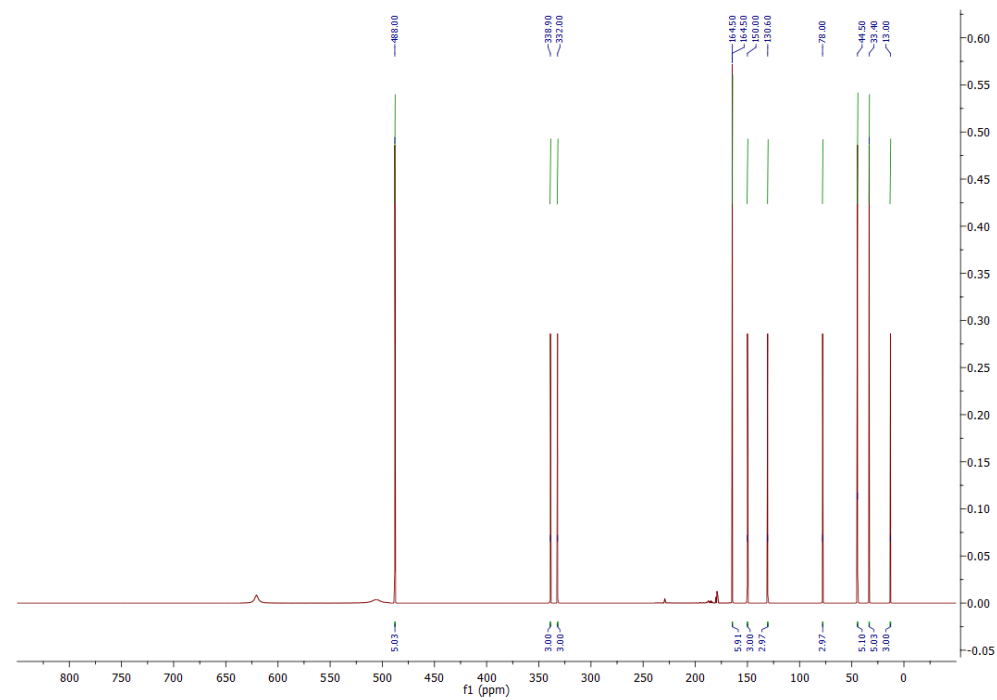
Слика ДМ138. ^{17}O NMR спектар једињења **3DPQ-3**.



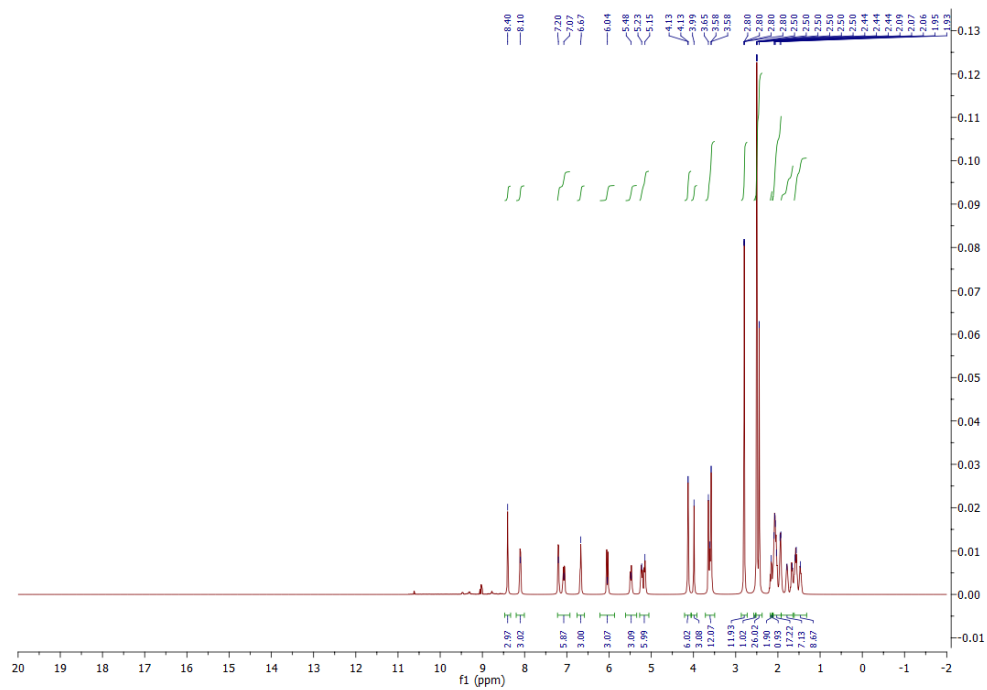
Слика ДМ139. ^1H NMR спектар једињења ЗДРQ-4.



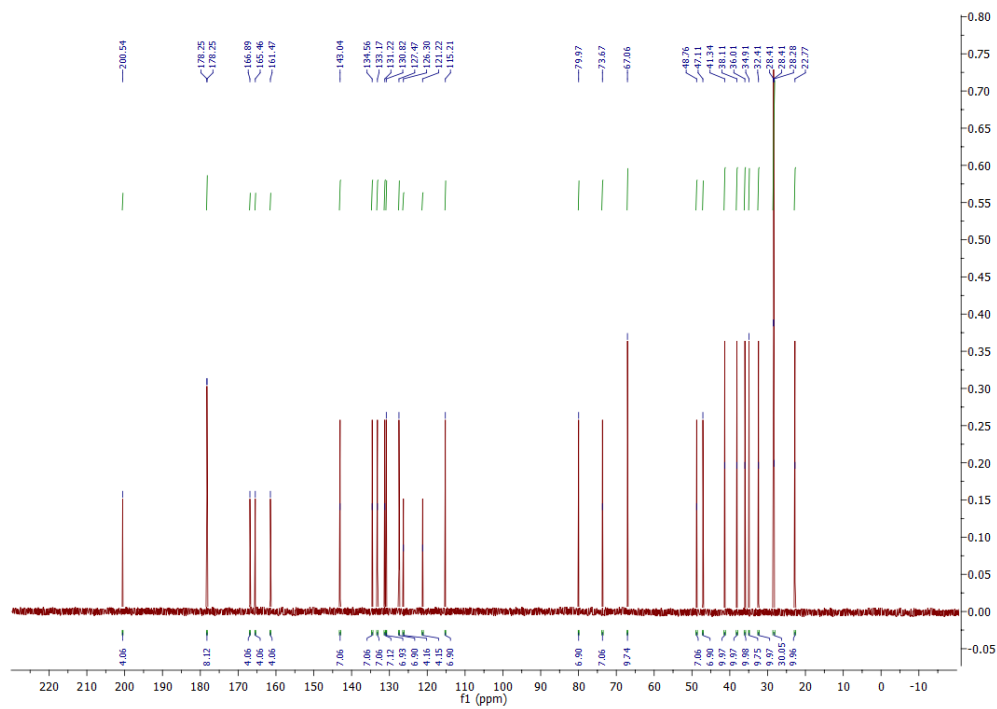
Слика ДМ140. ^{13}C NMR спектар једињења ЗДРQ-4.



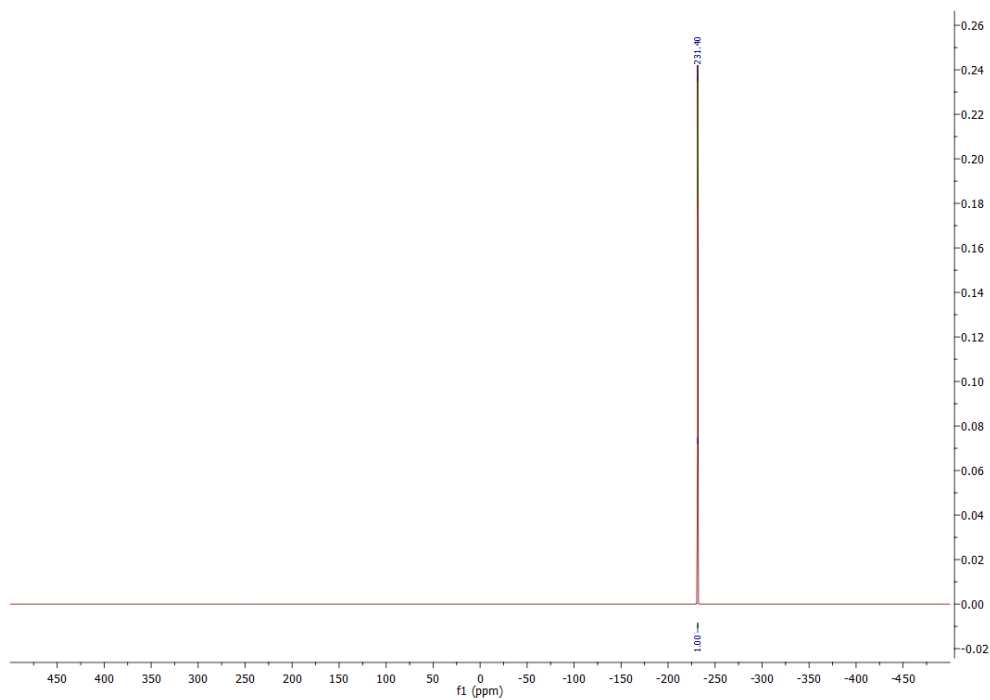
Слика ДМ141. ^{17}O NMR спектар једињења **3DPQ-4**.



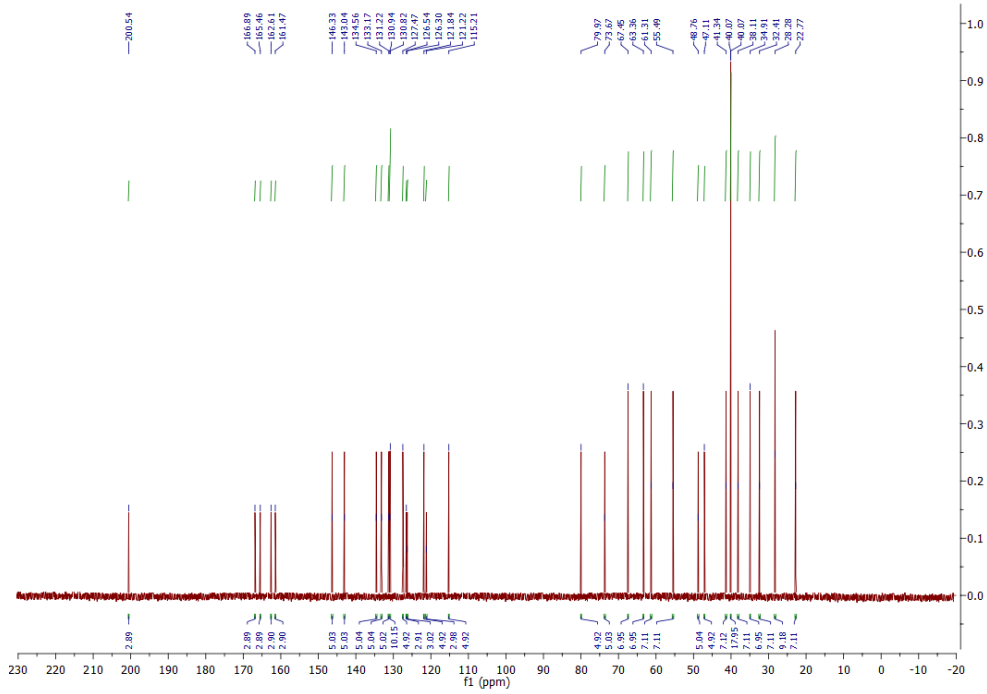
Слика ДМ142. ^1H NMR спектар једињења **3DPQ-5**.



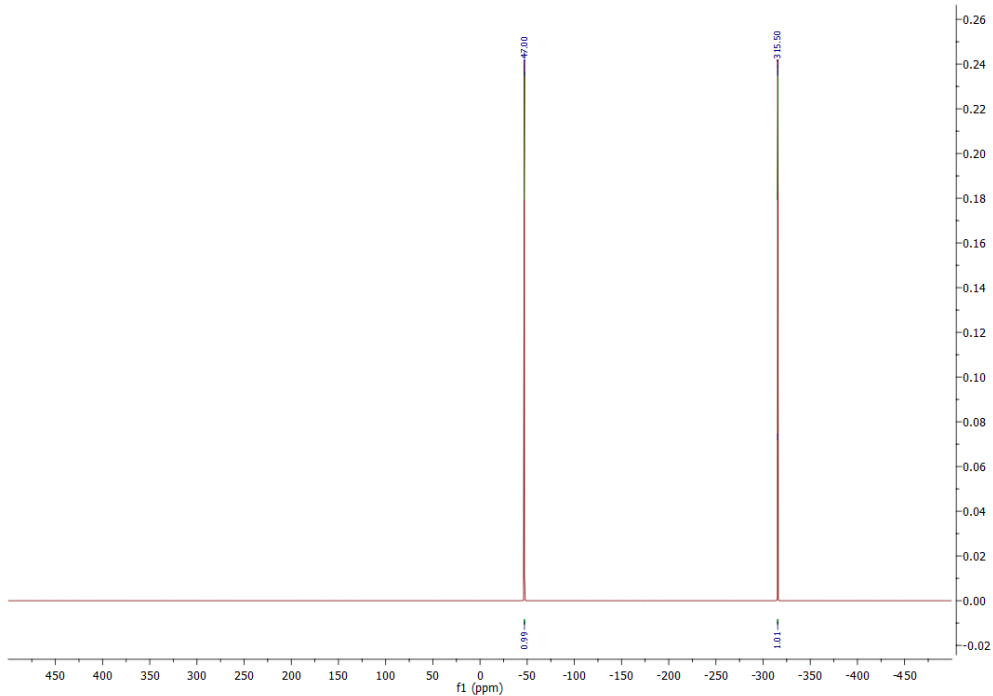
Слика ДМ143. ^{13}C NMR спектар једињења **ZDPQ-5**.



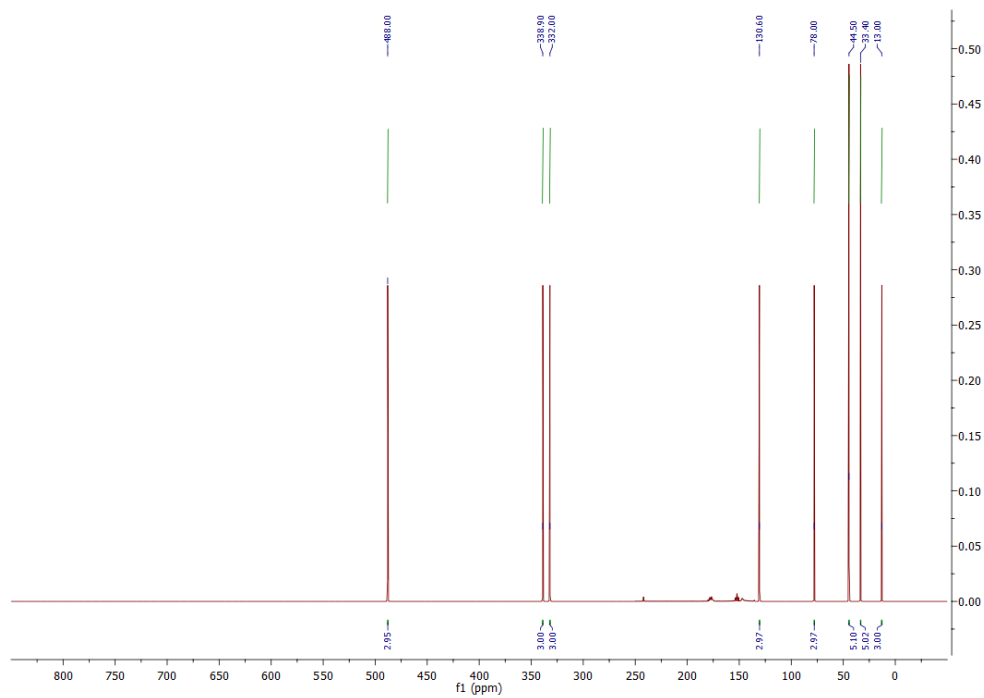
Слика ДМ144 ^{15}N NMR спектар једињења **ZDPQ-5**.



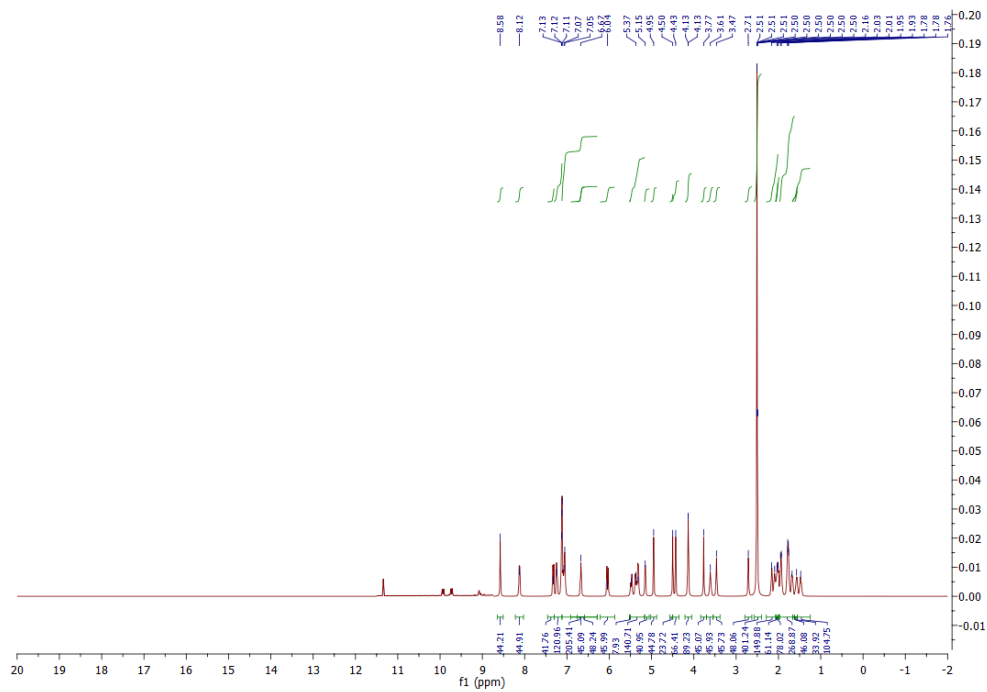
Слика ДМ147. ^{13}C NMR спектар једињења 3DPQ-6.



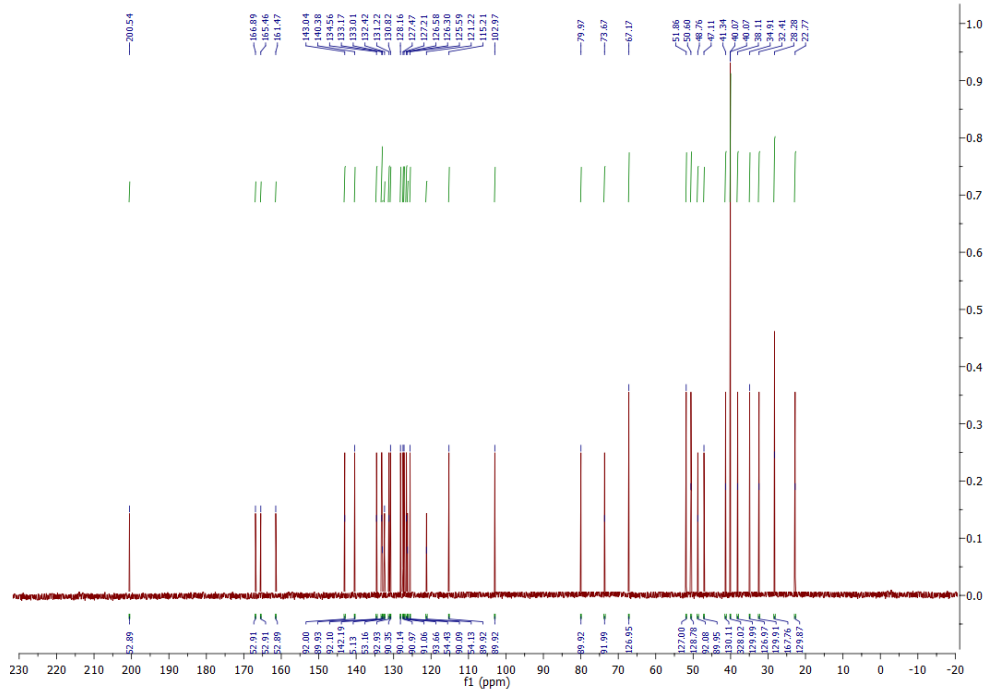
Слика ДМ148. ^{15}N NMR спектар једињења 3DPQ-6.



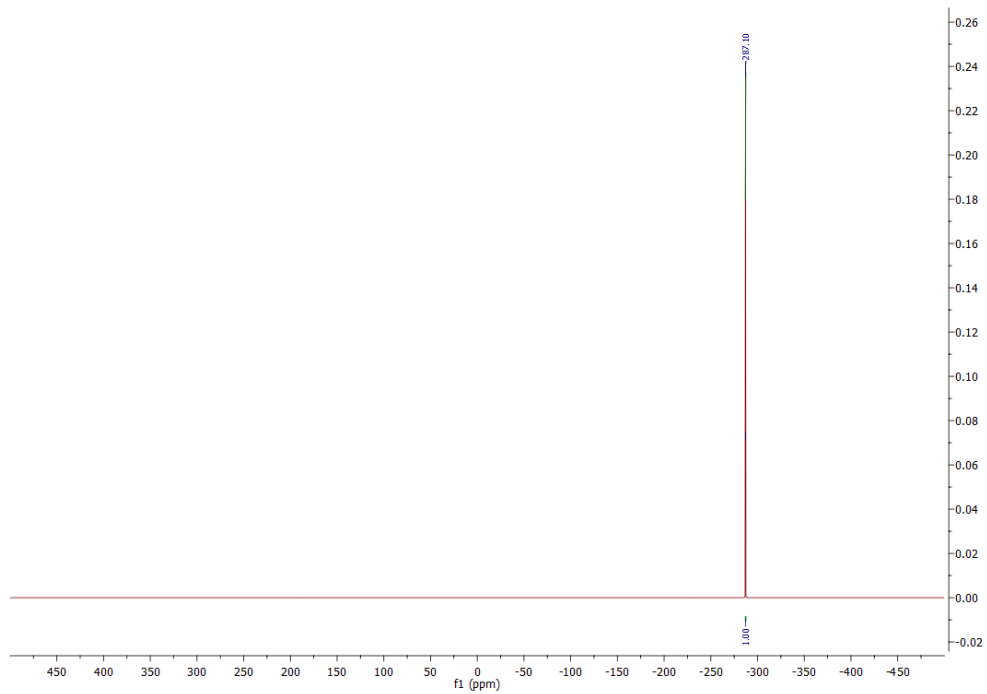
Слика ДМ149. ^{17}O NMR спектар једињења 3DPQ-6.



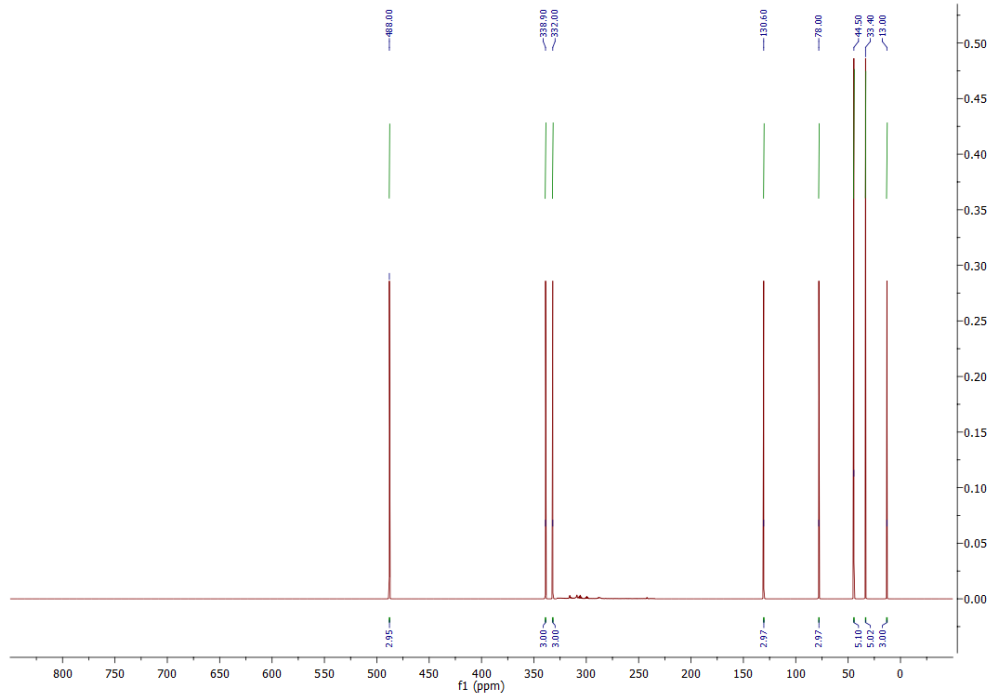
Слика ДМ150. ^1H NMR спектар једињења 3DPQ-7.



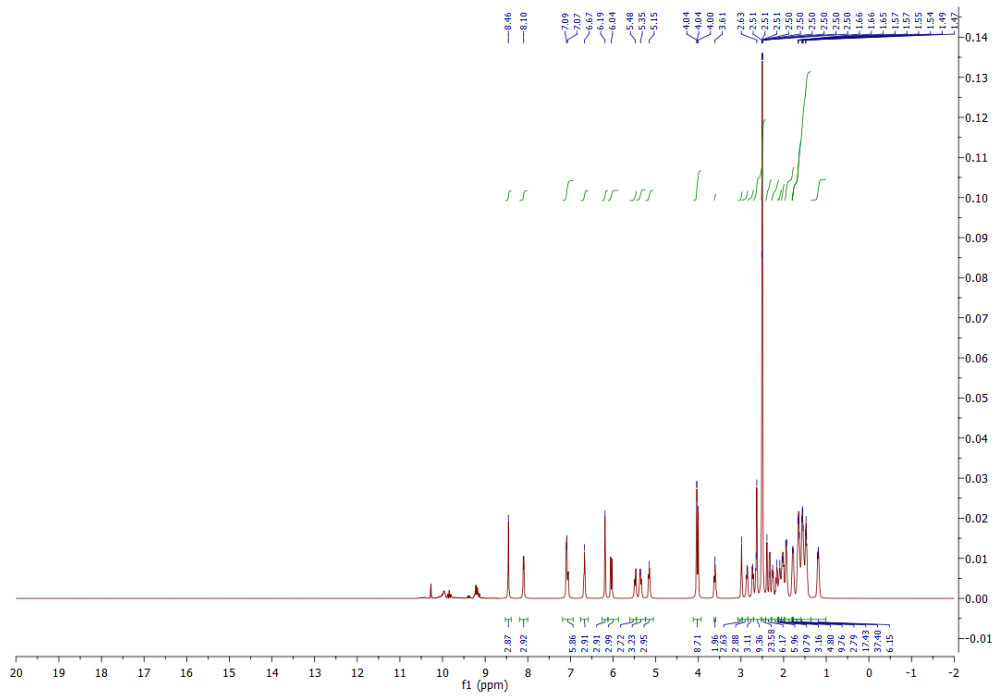
Слика ДМ151. ^{13}C NMR спектар једињења ЗДРQ-7.



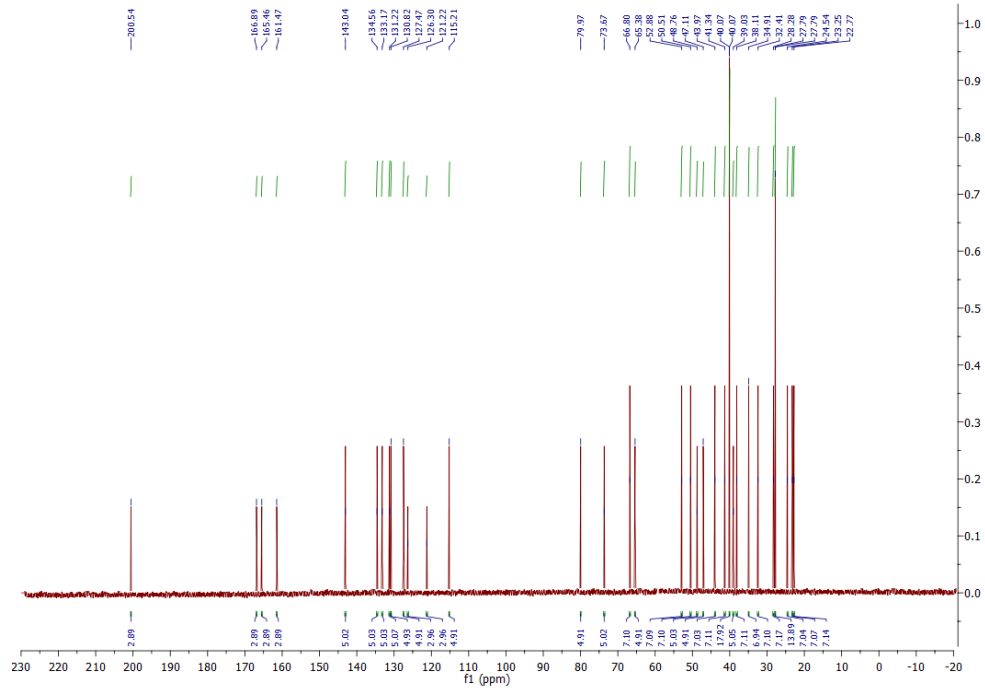
Слика ДМ152. ^{15}N NMR спектар једињења ЗДРQ-7.



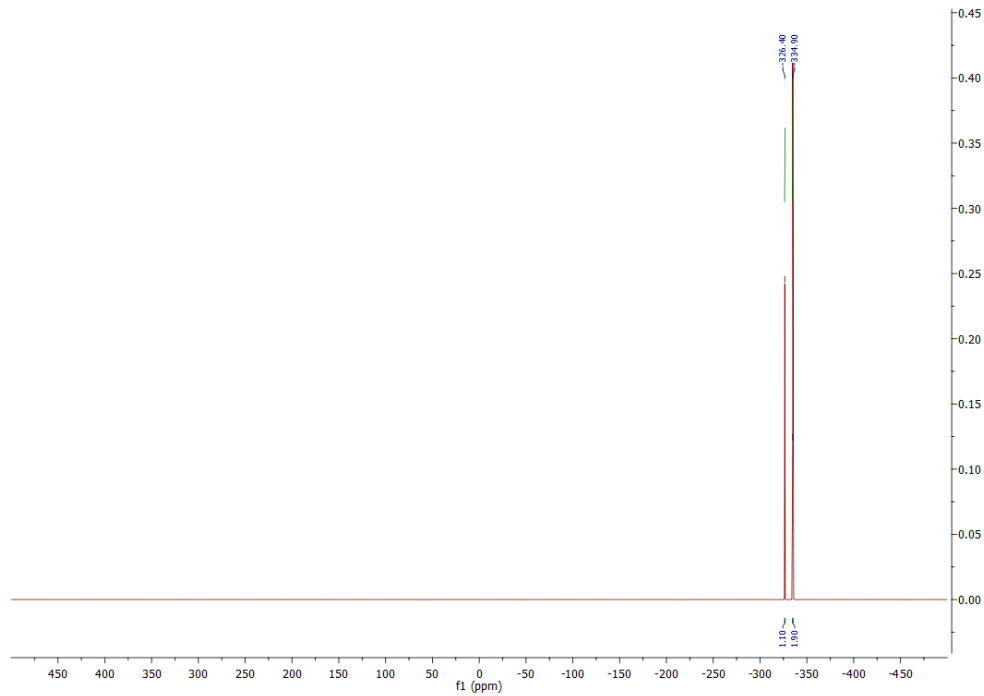
Слика ДМ153. ^{17}O NMR спектар једињења **3DPQ-7**.



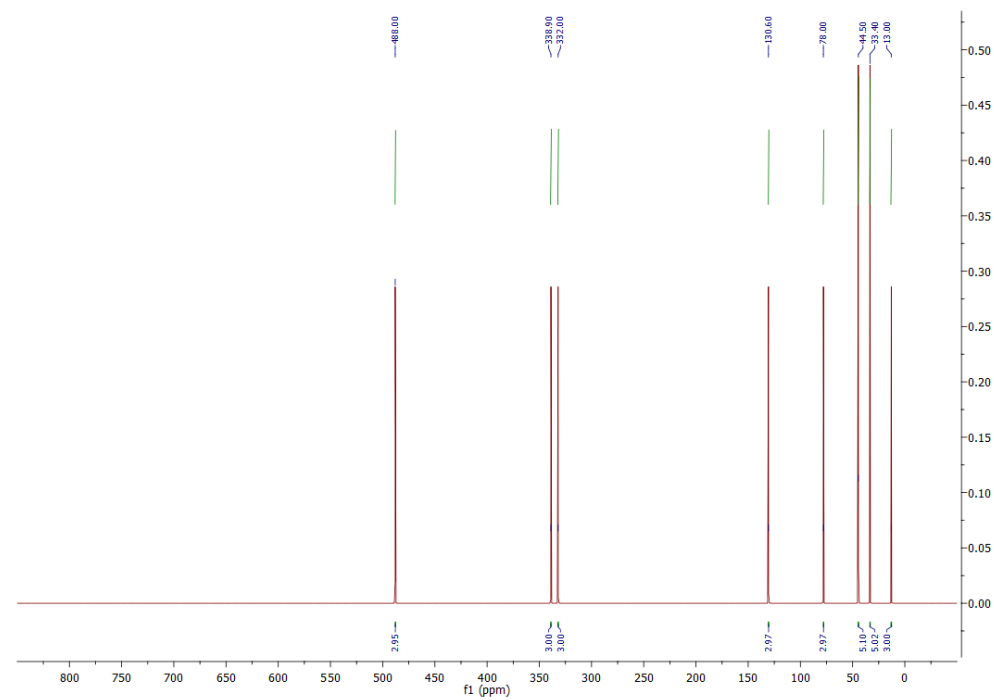
Слика ДМ154. ^1H NMR спектар једињења **3DPQ-8**.



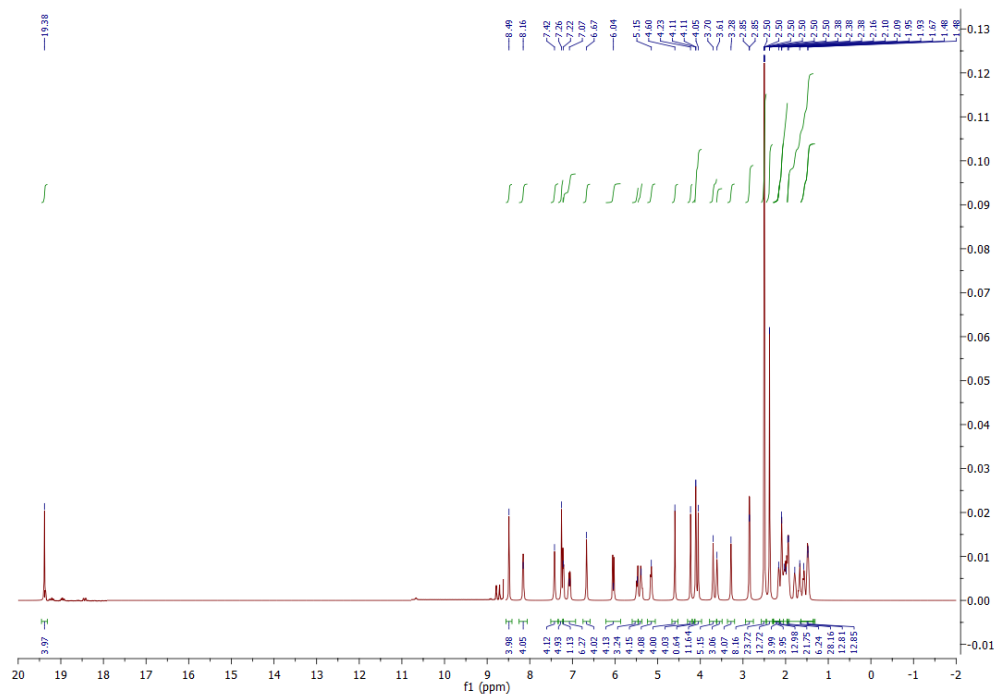
Слика ДМ155. ^{13}C NMR спектар једињења 3DPQ-8.



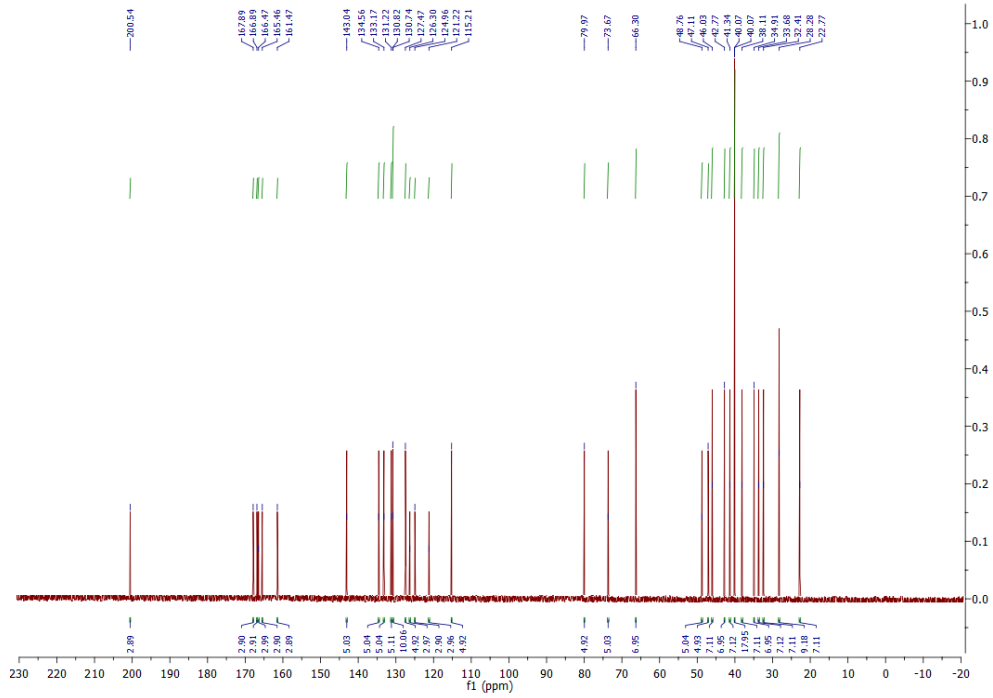
Слика ДМ156. ^{15}N NMR спектар једињења 3DPQ-8.



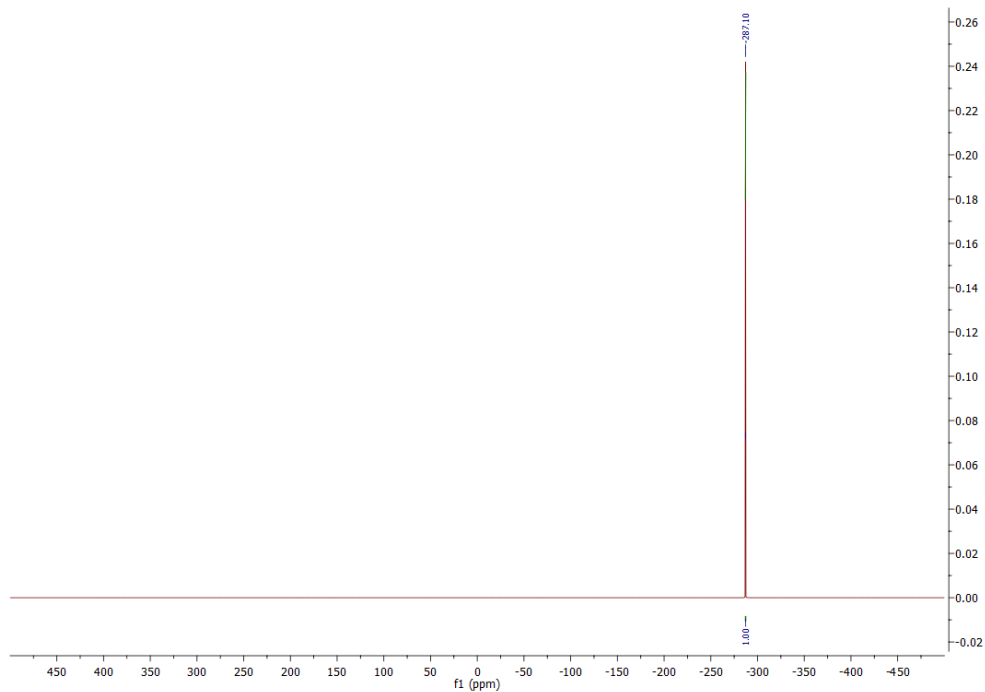
Слика ДМ157. ^{17}O NMR спектар једињења **ZDRQ-8**.



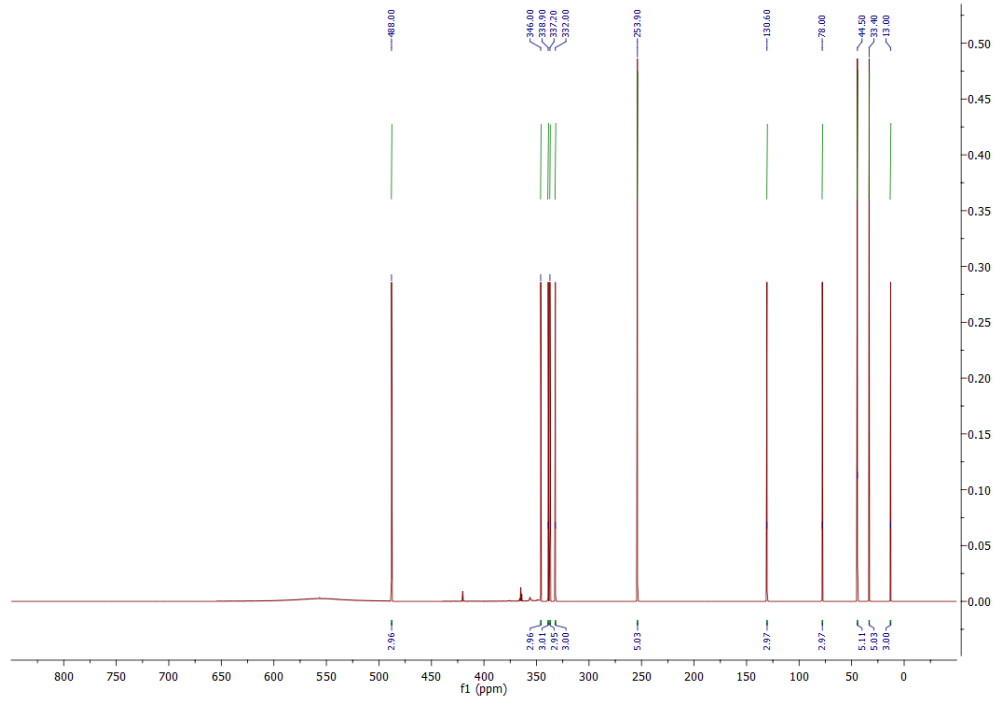
Слика ДМ158. ^1H NMR спектар једињења **ZDRQ-9**.



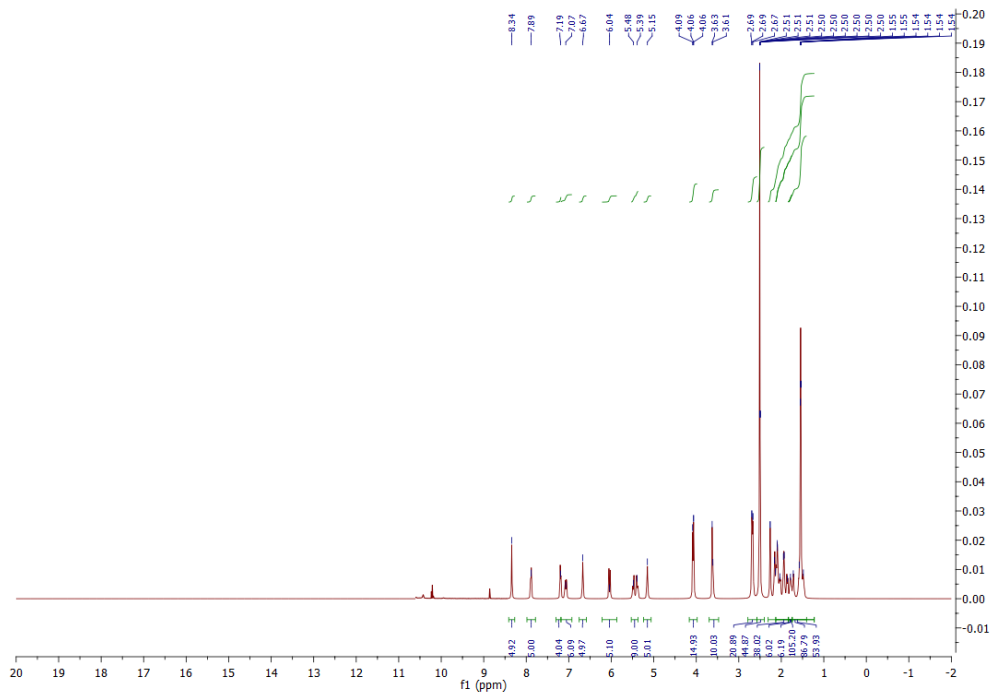
Слика ДМ159. ^{13}C NMR спектар једињења **3DPQ-9**.



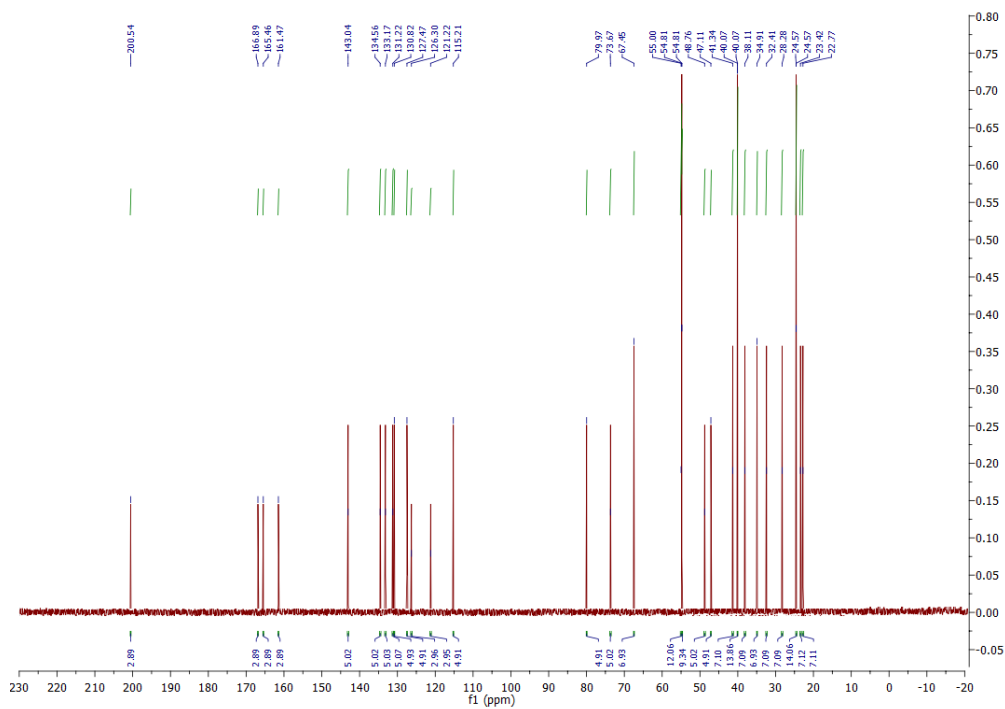
Слика ДМ160. ^{15}N NMR спектар једињења **3DPQ-9**.



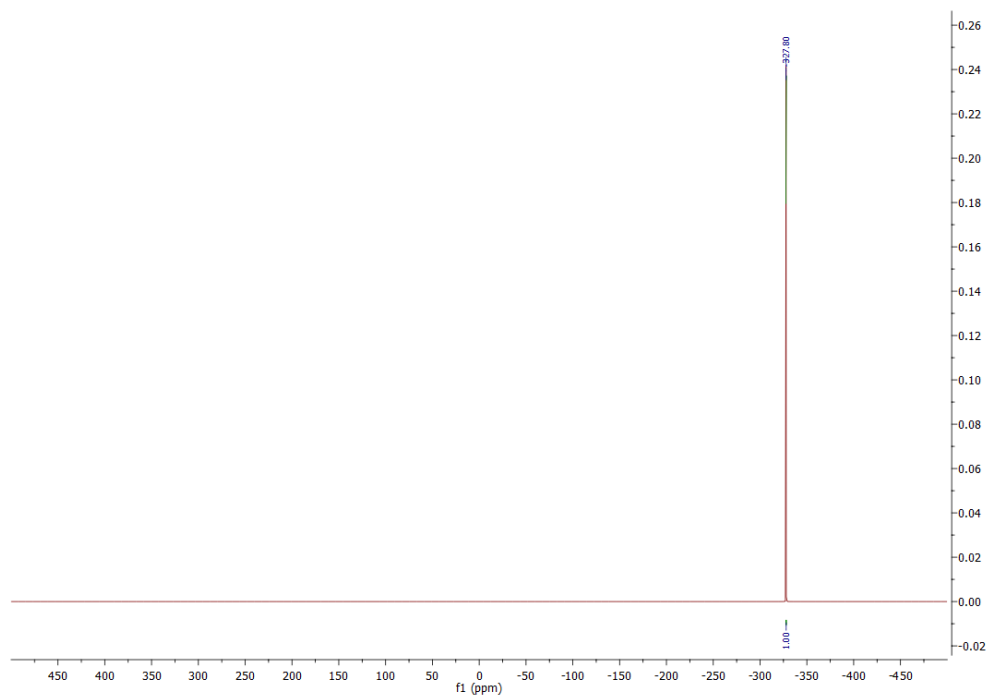
Слика ДМ161. ^{17}O NMR спектар једињења **3DPQ-9**.



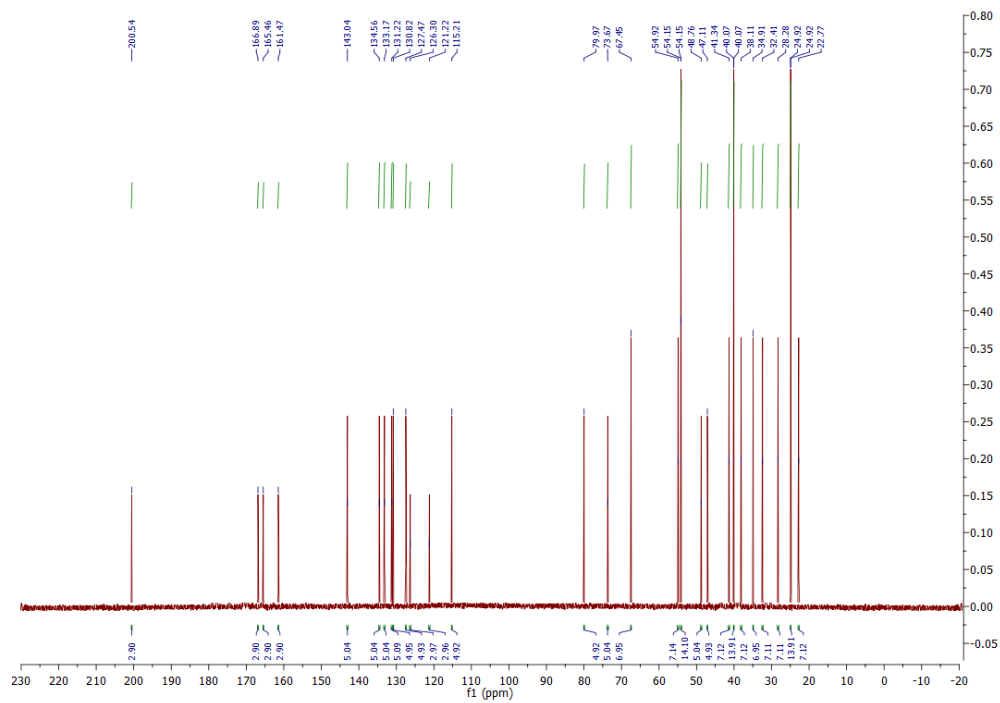
Слика ДМ162. ^1H NMR спектар једињења **3DPQ-10**.



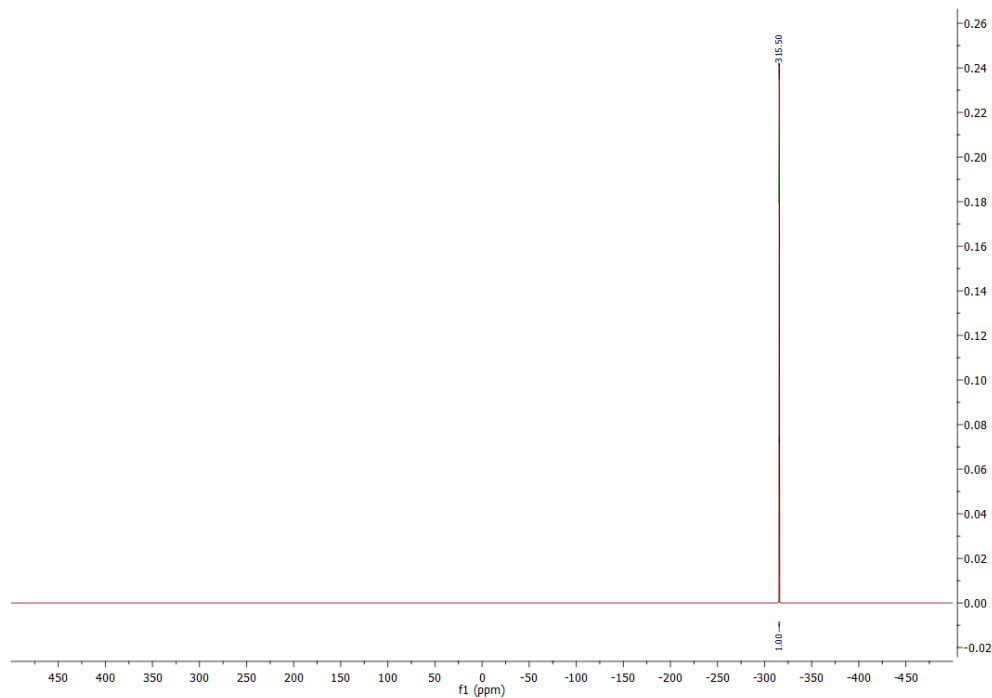
Слика ДМ163. ^{13}C NMR спектар једињења **3DPQ-10**.



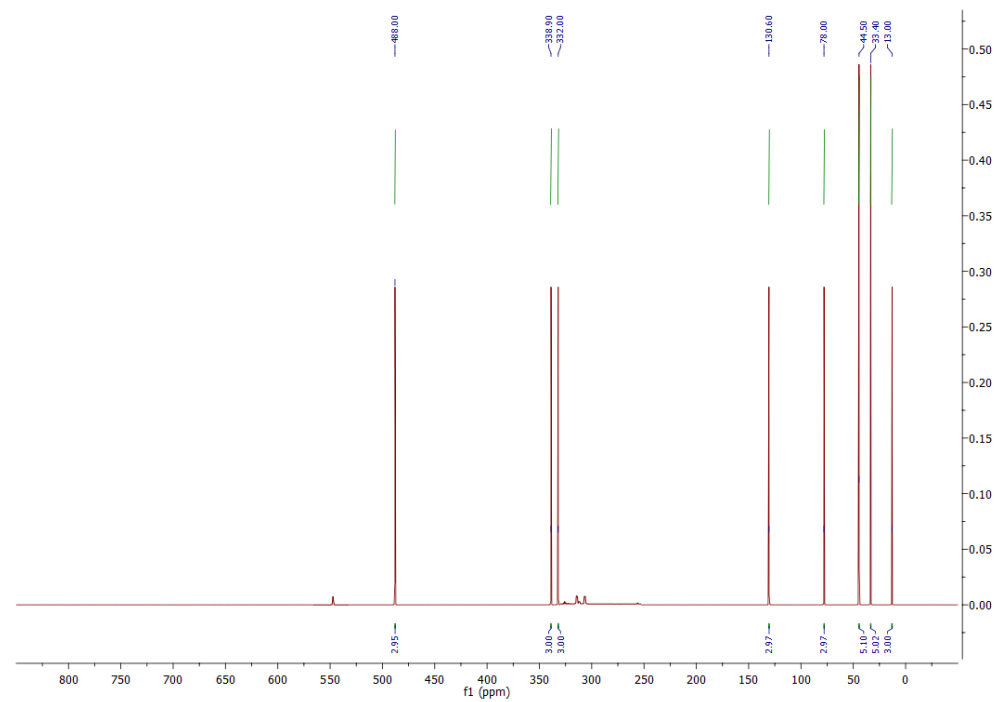
Слика ДМ164. ^{15}N NMR спектар једињења **3DPQ-10**.



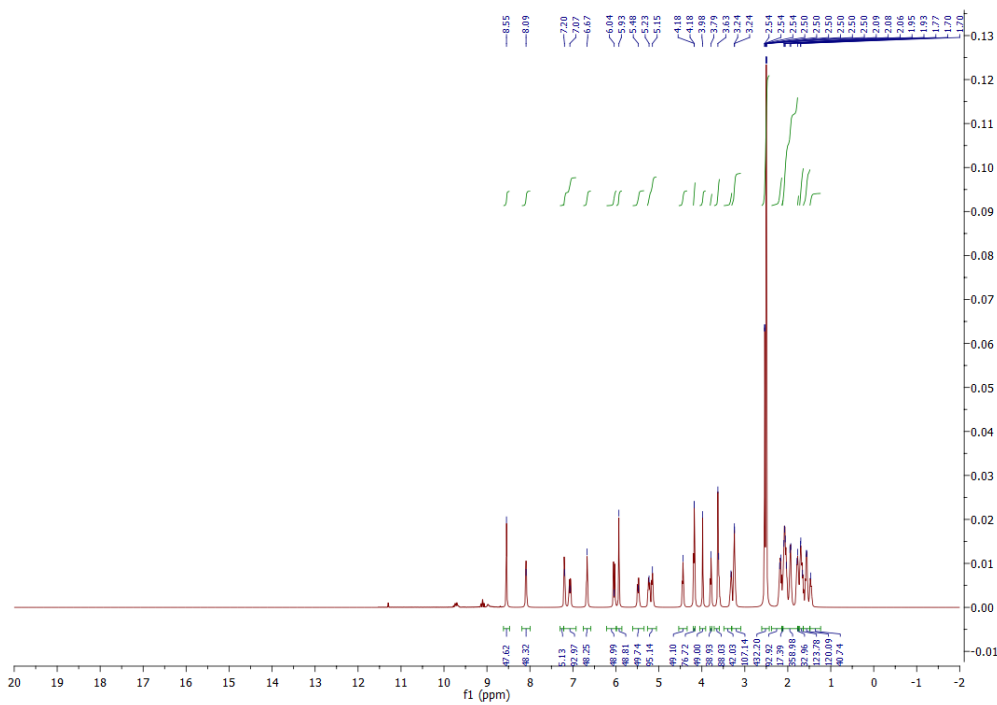
Слика ДМ167. ^{13}C NMR спектар једињења 3DPQ-11.



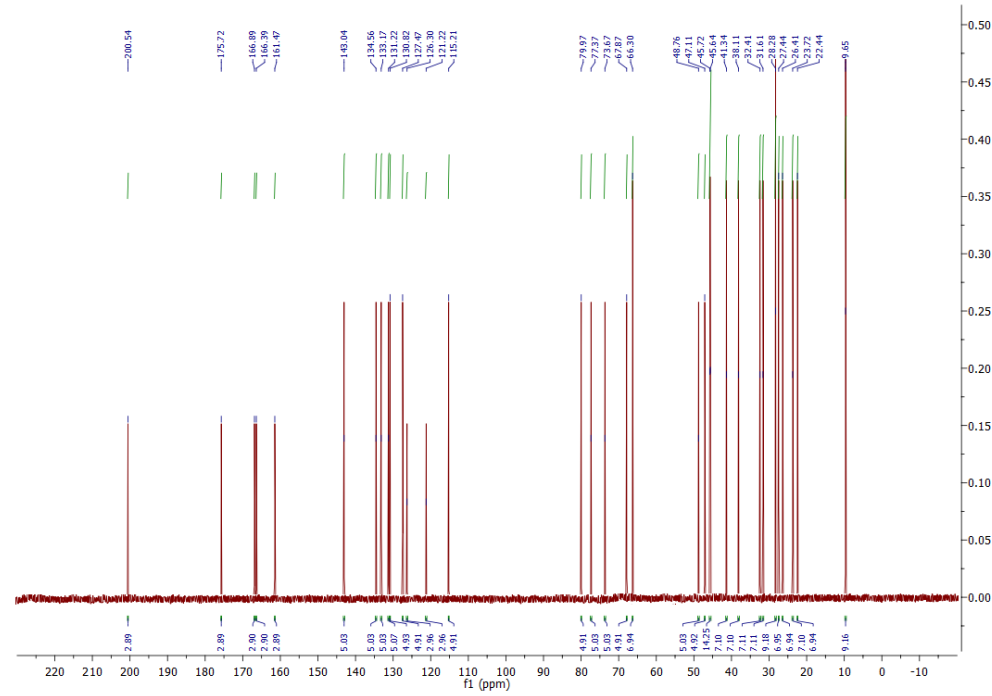
Слика ДМ168. ^{15}N NMR спектар једињења 3DPQ-11.



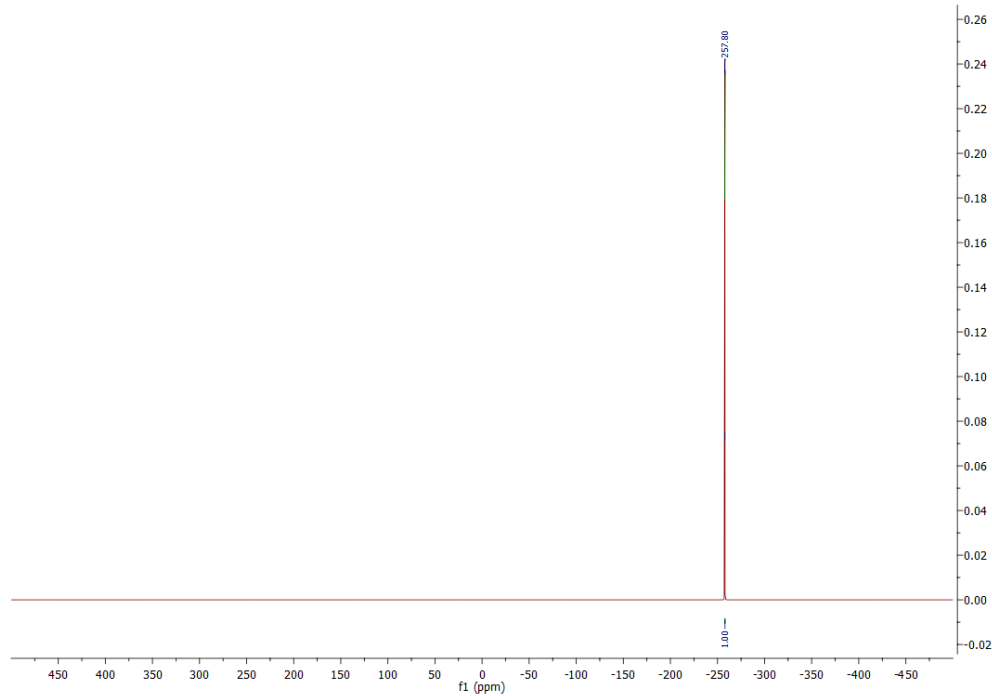
Слика ДМ169. ^{17}O NMR спектар једињења **ZDPQ-11**.



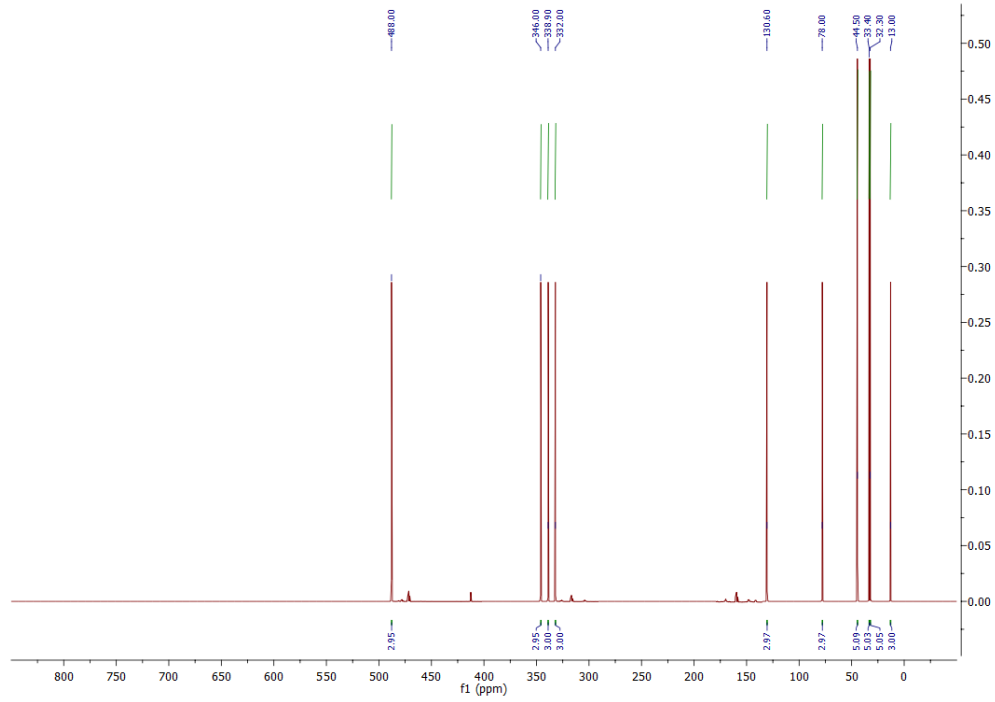
Слика ДМ170. ^1H NMR спектар једињења **ZDPQ-12**.



Слика ДМ171. ^{13}C NMR спектар једињења **3DPQ-12**.



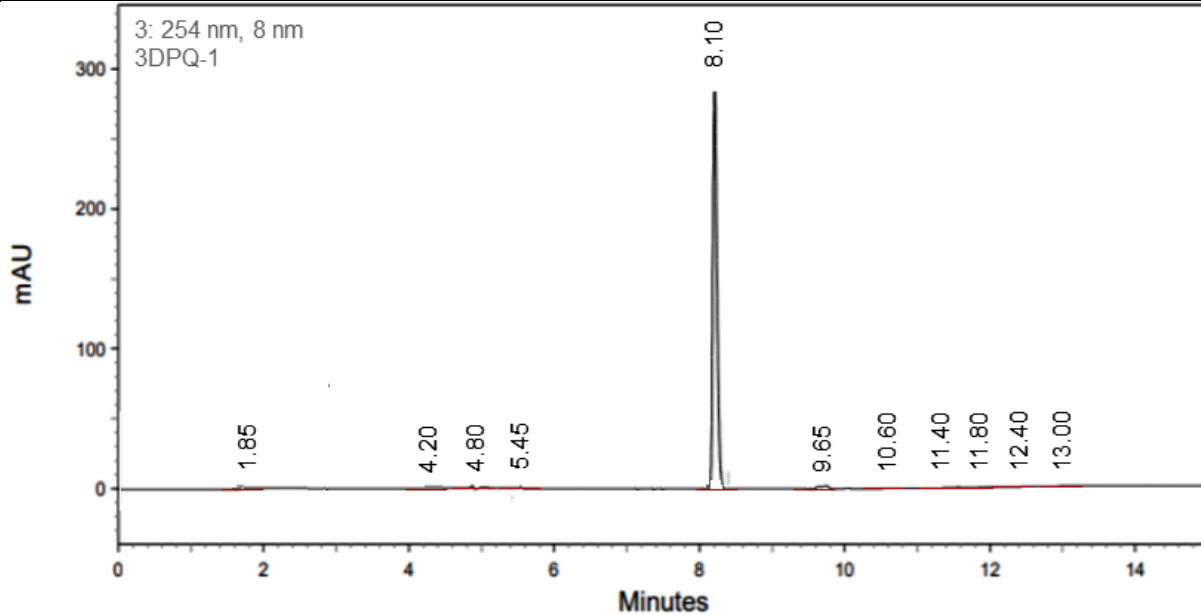
Слика ДМ172. ^{15}N NMR спектар једињења **3DPQ-12**.



Слика ДМ173. ¹⁷O NMR спектар једињења **ZDRQ-12**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DPQ-1
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-1a
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/08:10:37



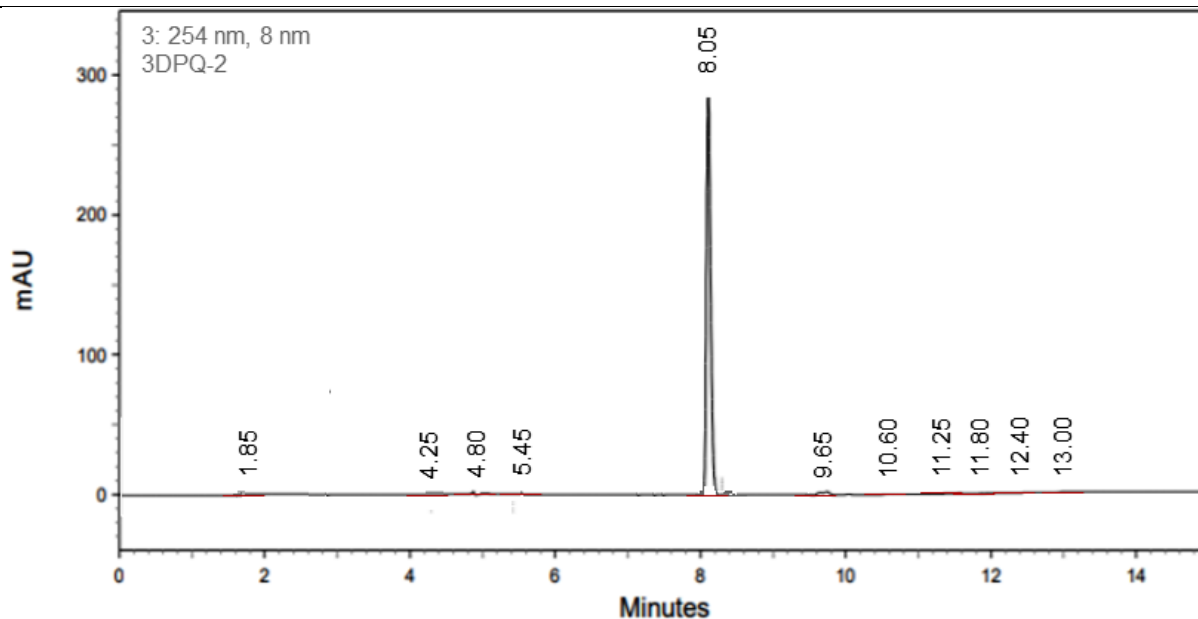
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.85	1928	5714	0.36
4.20	1795	5632	0.25
4.80	1759	5234	0.17
5.45	1495	5236	0.10
8.10	426953	1185632	98.01
9.65	1655	5342	0.18
10.60	1429	5146	0.35
11.40	1412	5339	0.19
11.80	1235	5623	0.14
12.40	1129	5842	0.11
13.00	1265	5128	0.14

Слика ДМ174. HPLC спектар једињења **3DPQ-1**

HPLC REPORT

Compound ID : 3DPQ-2
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-2
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/08:30:47



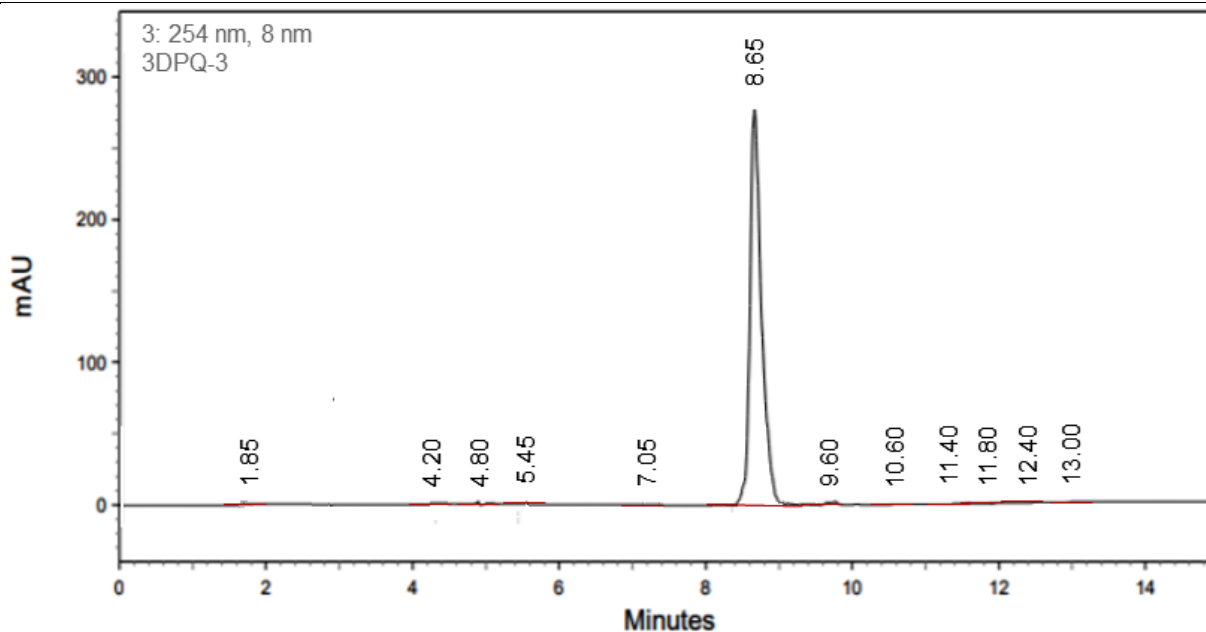
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.85	1913	5756	0.32
4.25	1784	5652	0.21
4.80	1742	5217	0.14
5.45	1456	5211	0.13
8.05	423453	1262941	98.13
9.65	1641	5128	0.13
10.60	1433	5163	0.31
11.25	1427	5128	0.12
11.80	1241	5584	0.17
12.40	1131	5518	0.15
13.00	1270	5228	0.19

Слика ДМ175. HPLC спектар једињења 3DPQ-2

HPLC REPORT

Compound ID : 3DPQ-3
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-3
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/08:55:47



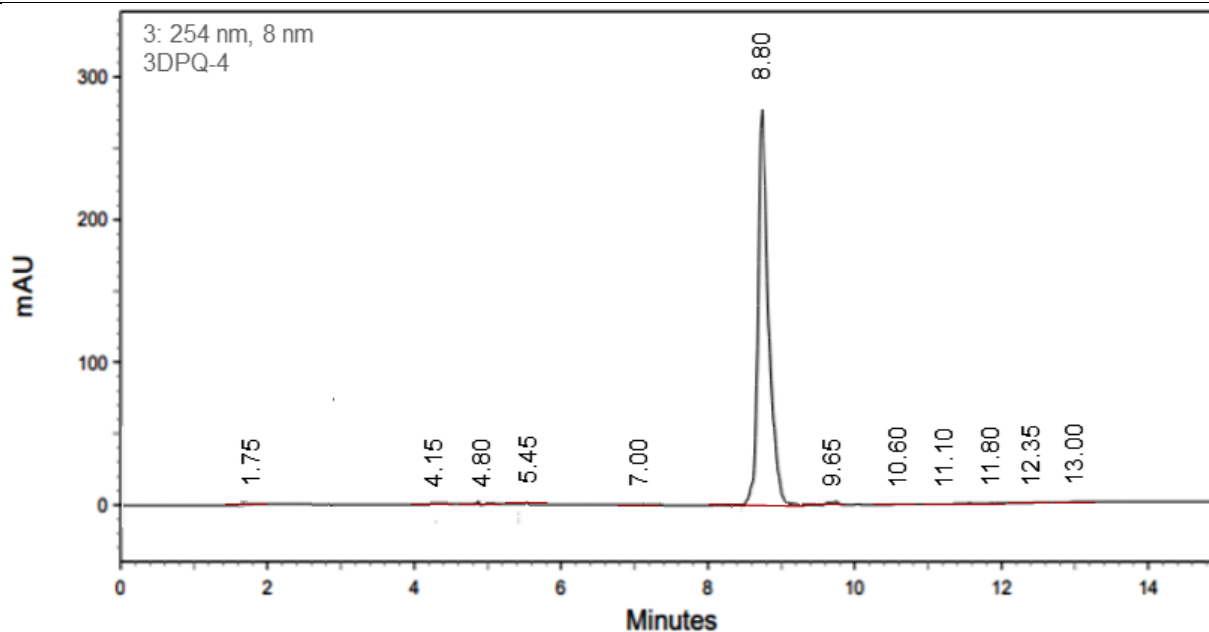
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.85	1919	5763	0.29
4.20	1752	5628	0.19
4.80	1728	5249	0.15
5.45	1417	5244	0.14
7.05	1366	4958	0.12
8.66	435214	1285615	98.13
9.60	1651	5539	0.16
10.60	1427	5142	0.29
11.40	1446	5538	0.14
11.80	1281	5451	0.15
12.40	1176	5259	0.17
13.00	1228	5895	0.21

Слика ДМ176. HPLC спектар једињења 3DPQ-3

HPLC REPORT

Compound ID : 3DPQ-4
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-4
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/09:20:13



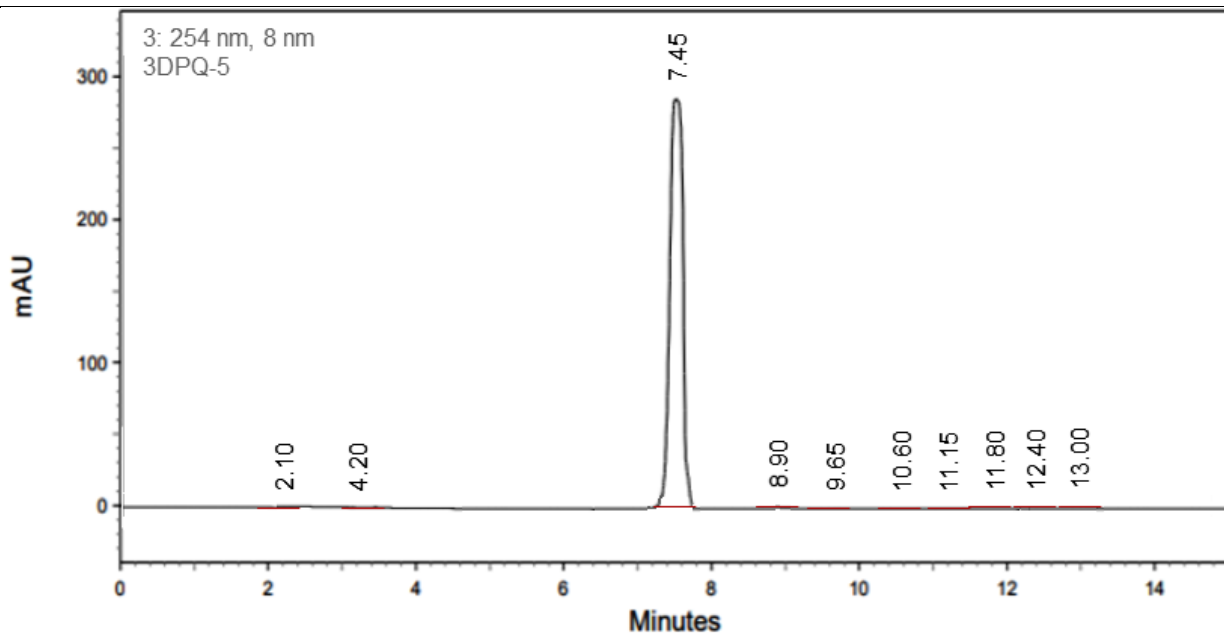
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.75	1924	5796	0.27
4.15	1769	5645	0.16
4.80	1734	5228	0.11
5.45	1445	5218	0.15
7.00	1358	4974	0.14
8.80	442365	1295361	98.16
9.66	1698	5518	0.18
10.60	1492	5184	0.22
11.10	1418	5519	0.15
11.80	1249	5449	0.12
12.35	1187	5362	0.14
13.00	1245	5695	0.20

Слика ДМ177. HPLC спектар једињења 3DPQ-4

HPLC REPORT

Compound ID : 3DPQ-5
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-5
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/09:50:46



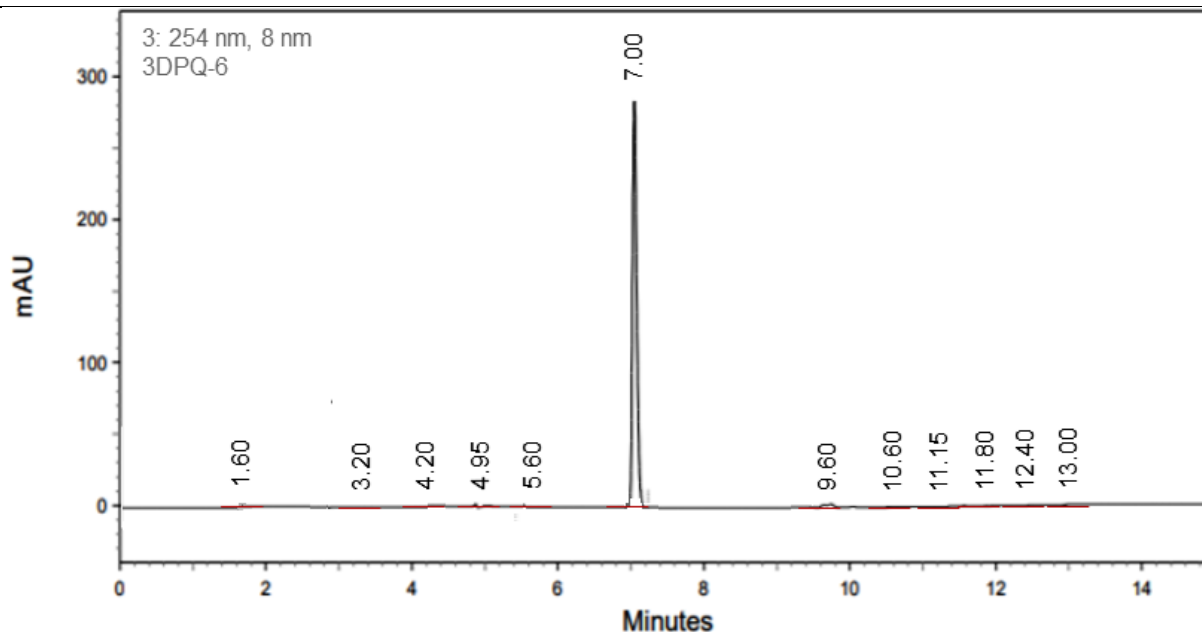
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
2.10	1937	5759	0.14
4.20	1716	5618	0.15
7.45	456912	1362510	98.71
8.90	1878	5562	0.12
9.65	1648	5495	0.14
10.60	1419	5289	0.17
11.15	1456	5594	0.14
11.80	1258	5239	0.17
12.40	1167	5528	0.11
13.00	1285	5489	0.15

Слика ДМ178. HPLC спектар једињења **3DPQ-5**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DPQ-6
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-6
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/10:30:17



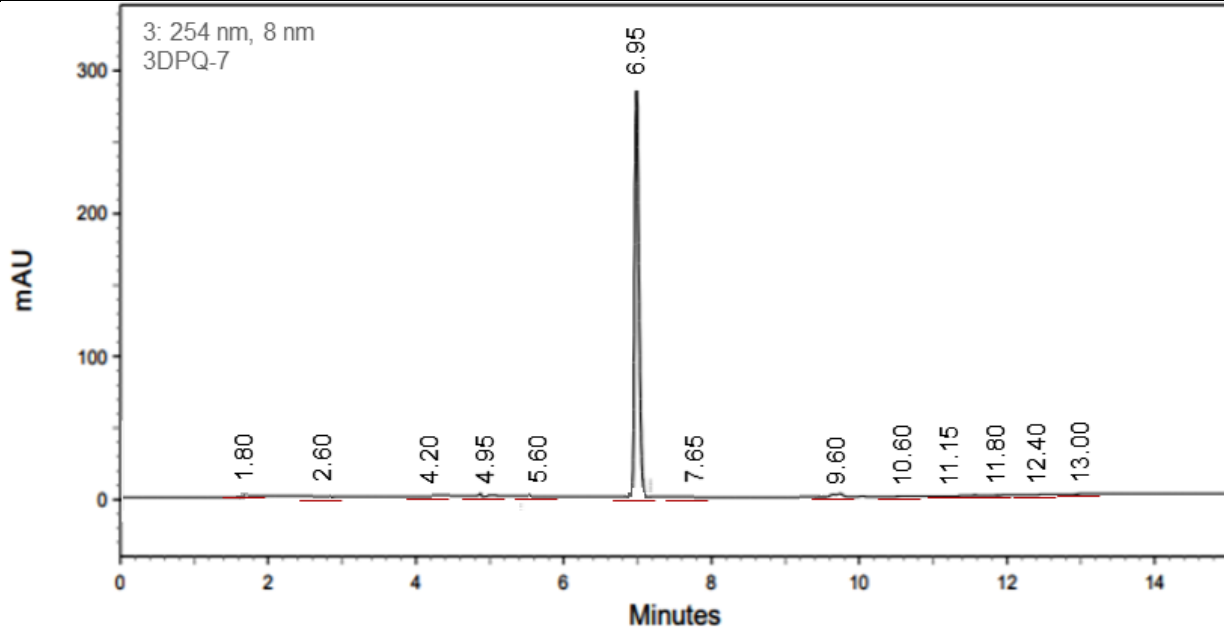
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.60	1918	5765	0.18
3.20	1756	5642	0.19
4.20	1792	5295	0.14
4.95	1365	5261	0.19
5.60	1312	4949	0.18
7.00	443563	1269541	98.10
9.60	1352	5953	0.14
10.60	1448	5595	0.19
11.15	1419	5892	0.16
11.80	1244	5894	0.19
12.40	1186	5539	0.15
13.00	1247	5519	0.19

Слика ДМ179. HPLC спектар једињења **3DPQ-6**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DPQ-7
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-7
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/10:55:24



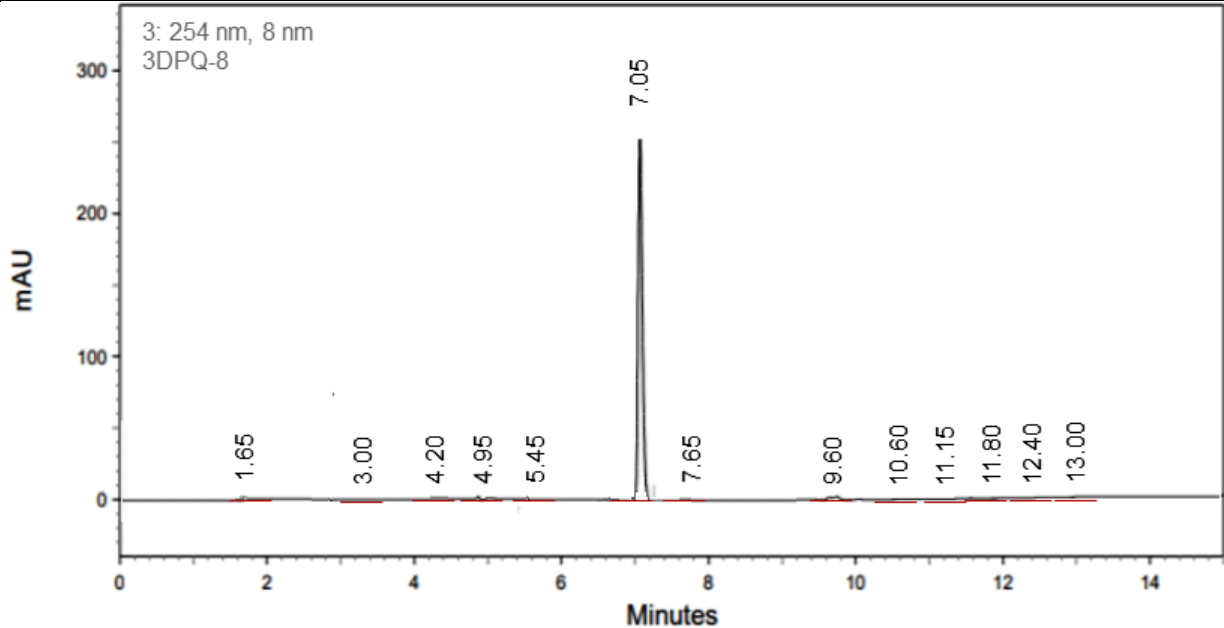
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.80	1900	5652	0.16
2.60	1775	5518	0.14
4.20	1741	5202	0.18
4.95	1385	5539	0.15
5.60	1341	4532	0.19
6.95	451249	1128562	98.14
7.65	1421	4569	0.17
9.60	1846	5459	0.17
10.60	1512	5845	0.19
11.15	1624	5746	0.15
11.80	1589	5825	0.14
12.40	1512	5365	0.16
13.00	1556	5152	0.21

Слика ДМ180. HPLC спектар једињења **3DPQ-7**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DPQ-8
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-8
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/11:30:23



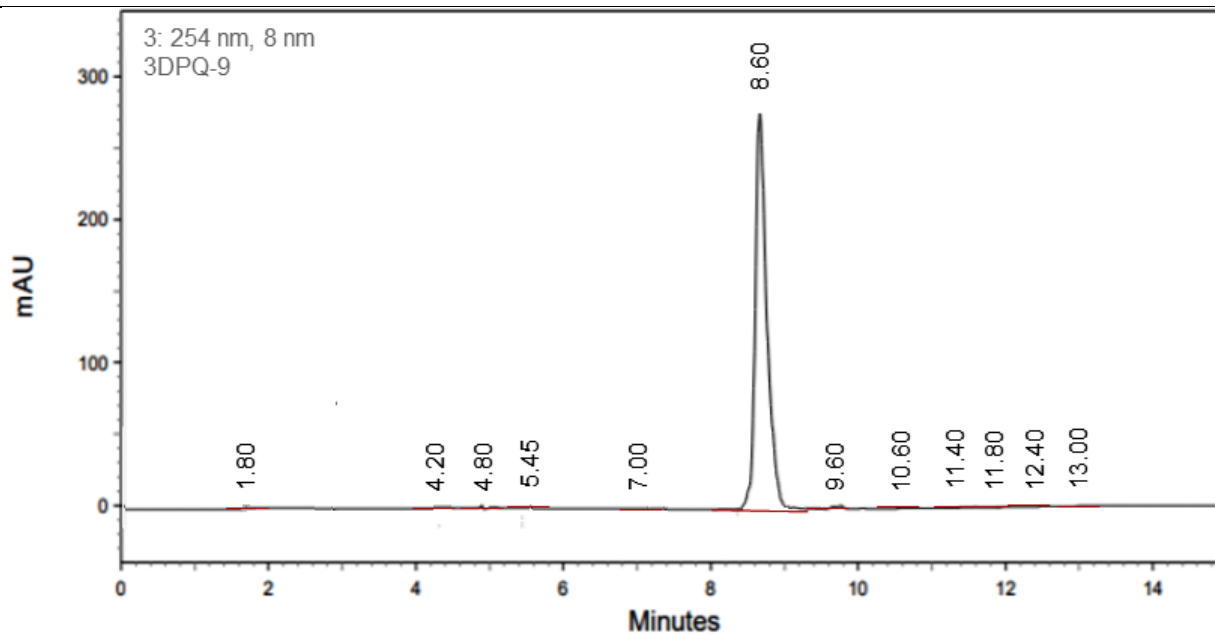
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.65	1895	5591	0.17
3.00	1802	5562	0.11
4.20	1765	5594	0.12
4.95	1491	5121	0.14
5.45	1341	4559	0.14
7.05	449532	1245165	98.31
7.65	1539	4632	0.11
9.60	1845	4532	0.14
10.60	1591	5433	0.13
11.15	1695	5542	0.16
11.80	1592	5984	0.16
12.40	1533	5543	0.12
13.00	1551	5421	0.18

Слика ДМ181. HPLC спектар једињења **3DPQ-8**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DPQ-9
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-9
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/11:50:17



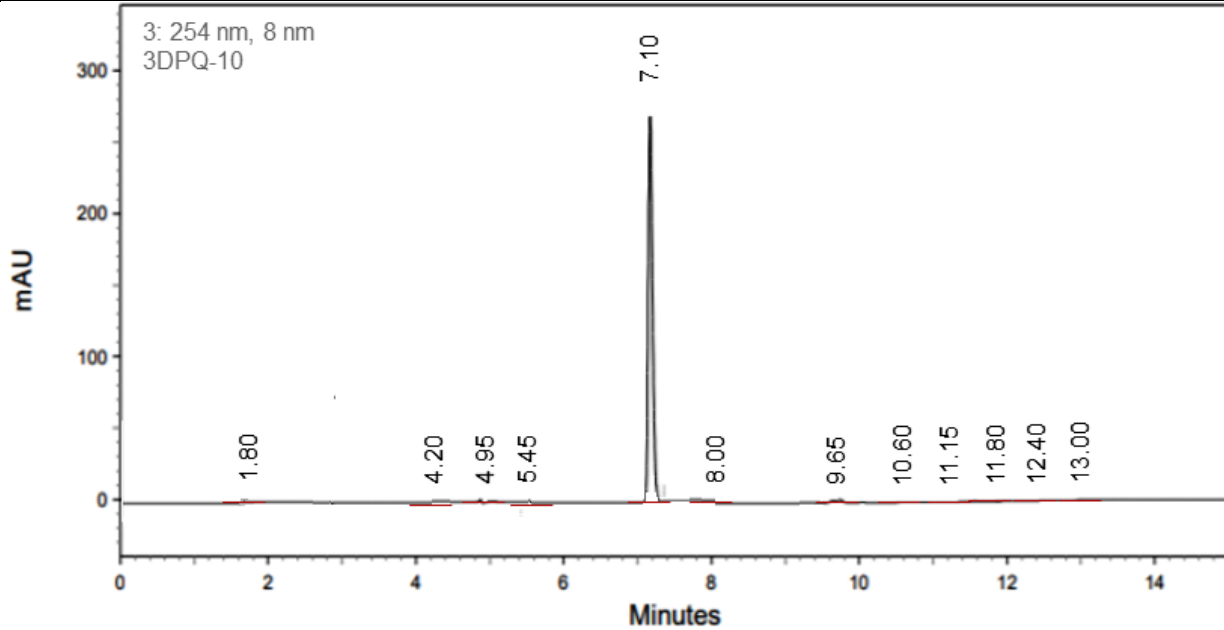
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.80	1795	5596	0.13
4.20	1748	5541	0.17
4.85	1562	5286	0.11
5.45	1418	4295	0.15
7.00	1326	4419	0.16
8.60	496515	1356215	98.58
9.60	1831	4184	0.12
10.60	1558	5639	0.13
11.15	1618	5152	0.11
11.80	1495	5185	0.12
12.40	1495	5632	0.13
13.00	1501	5123	0.09

Слика ДМ182. HPLC спектар једињења **3DPQ-9**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DPQ-10
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-10
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/12:22:17



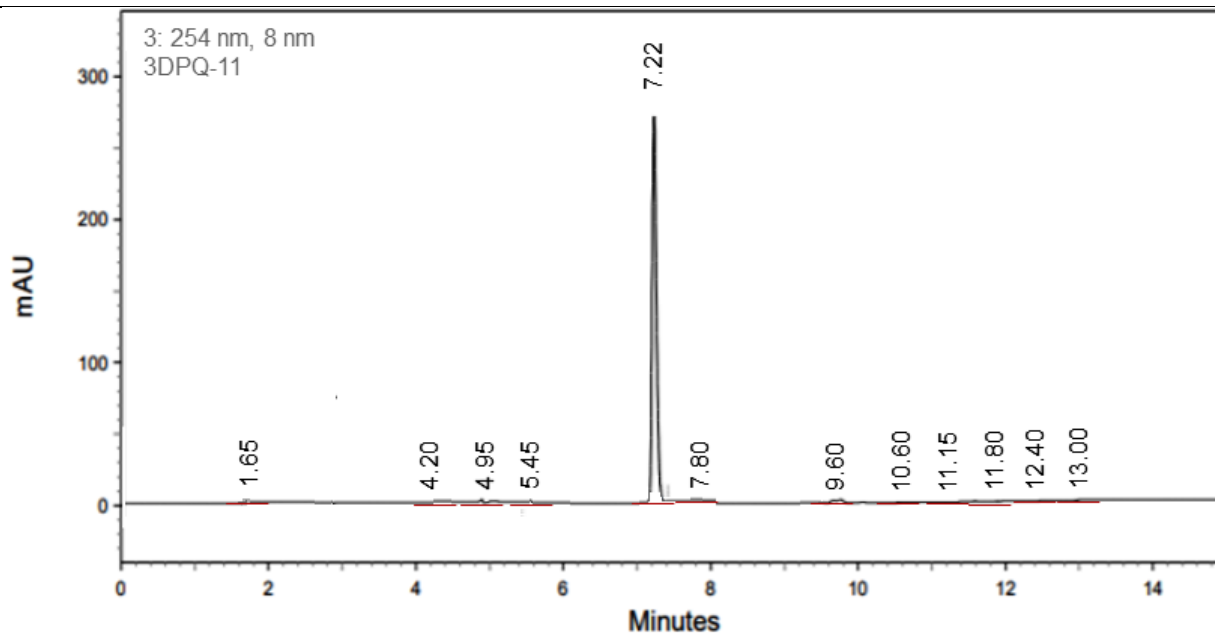
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.80	1784	5562	0.13
4.20	1736	5541	0.12
4.95	1545	5225	0.15
5.45	1458	4277	0.13
7.10	1342	4461	0.18
8.00	496515	1356215	98.51
9.65	1818	4141	0.13
10.60	1515	5651	0.12
11.15	1685	5145	0.15
11.80	1452	5112	0.13
12.40	1441	5668	0.16
13.00	1352	5326	0.09

Слика ДМ183. HPLC спектар једињења **3DPQ-10**.

HPLC REPORT

Compound ID : 3DPQ-11
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-11
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/12:55:34



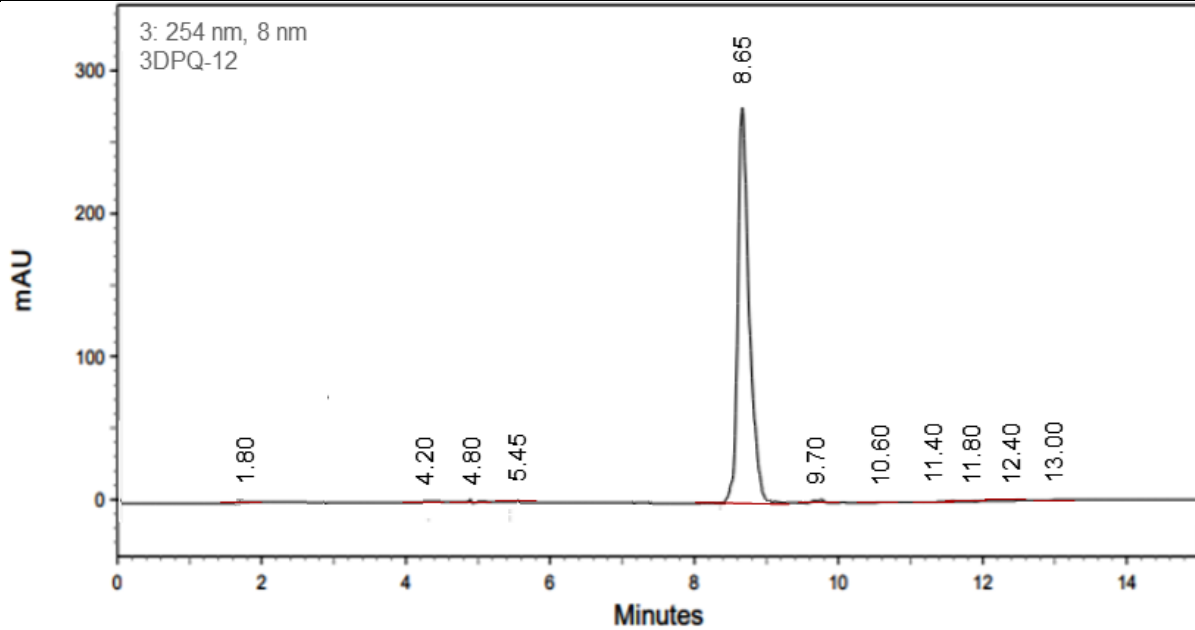
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.65	1715	5574	0.12
4.20	1755	5536	0.11
4.95	1565	5251	0.17
5.45	1445	4251	0.17
7.22	1318	4445	0.15
7.80	486523	1365284	98.42
9.65	1845	4261	0.17
10.60	1451	5421	0.15
11.15	1592	5536	0.19
11.80	1428	5251	0.14
12.40	1482	5562	0.11
13.00	1523	5856	0.10

Слика ДМ184. HPLC спектар једињења **3DPQ-11**.

HPLC REPORT

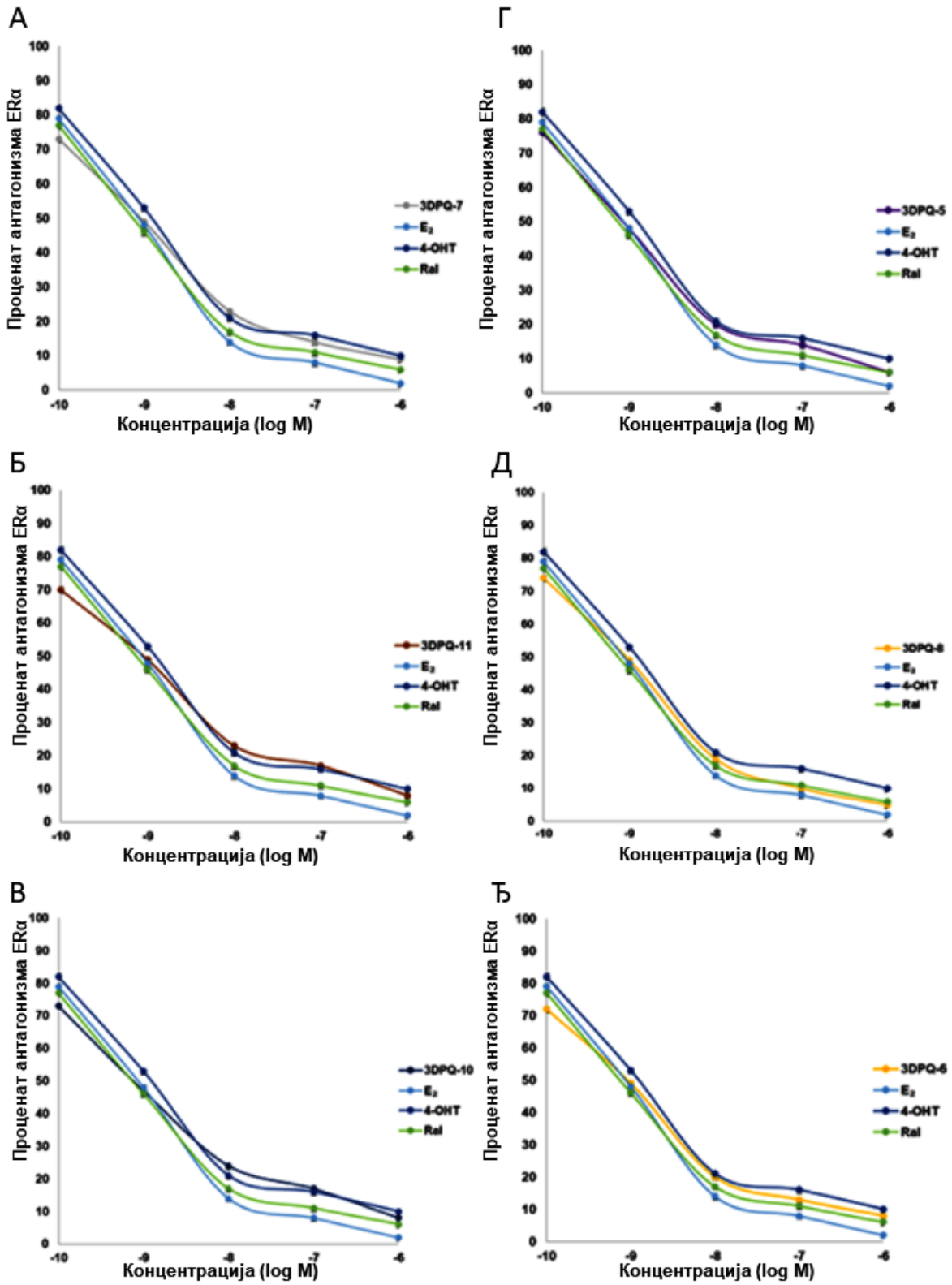
Compound ID : 3DPQ-12
Filename/Sample ID : D:\HPLC\2021\September\3DPQ-12
Method Name : D:\method\2021\MILAN-3dpq.met
Instrument and Column : Agilent 1260 Infinity System, Agilent Zorbax AB-C18
Run Time : 9/20/2021/13:30:19



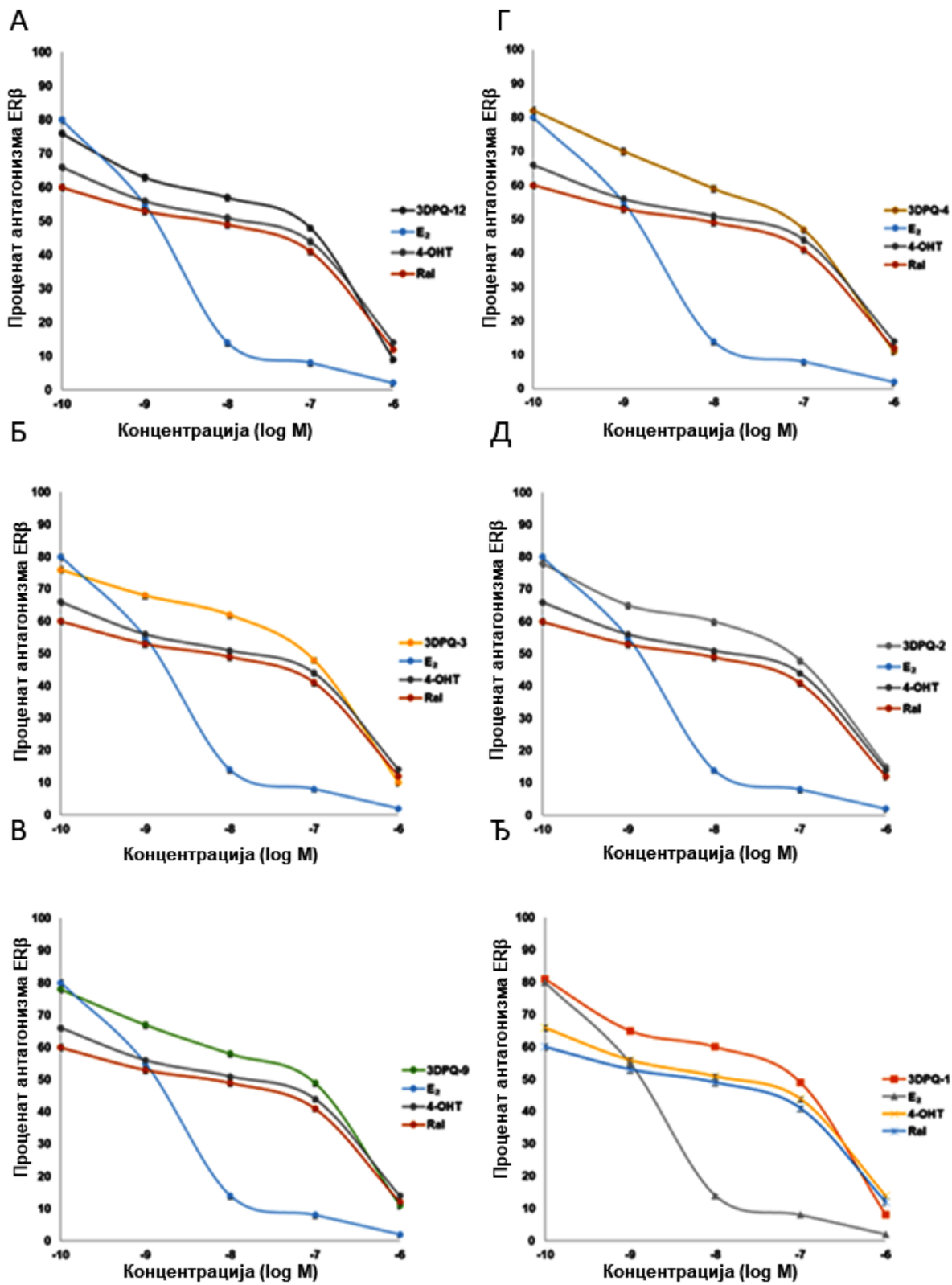
254 nm

<i>Retention time</i>	<i>Height</i>	<i>Area</i>	<i>Area Percent</i>
1.80	1694	5533	0.14
4.20	1732	5515	0.13
4.80	1517	5225	0.12
5.45	1502	4235	0.17
8.65	496521	1435265	98.69
9.70	1569	4543	0.15
10.60	1451	5321	0.19
11.40	1544	556	0.16
11.80	1484	5443	0.16
12.40	1416	5673	0.12
13.00	1556	5421	0.13

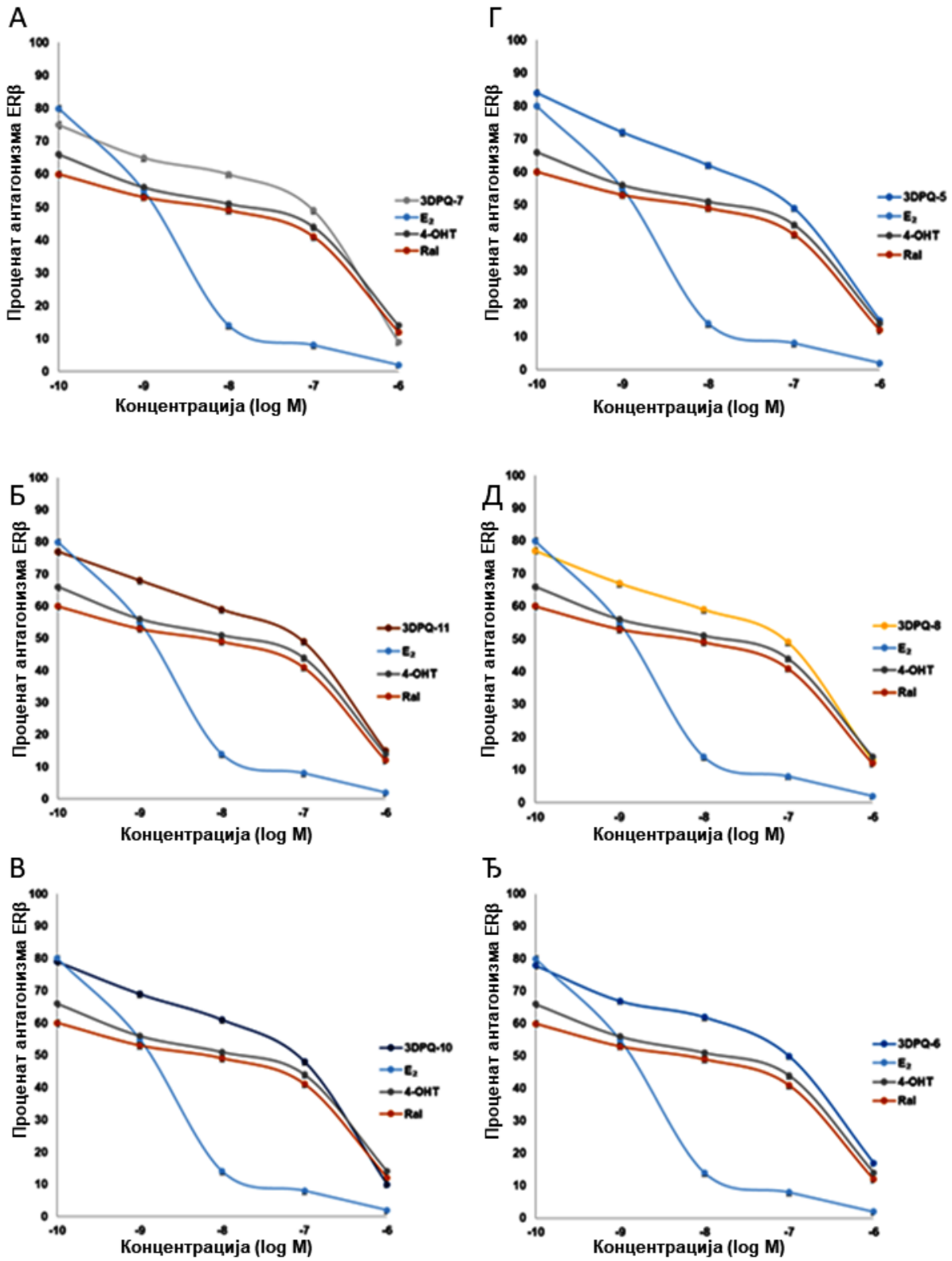
Слика ДМ185. HPLC спектар једињења **3DPQ-12**.



Слика ДМ186. Антагонизам естроген рецептора α у присуству 3DPQ-7 (А); 3DPQ-11 (Б); 3DPQ-10 (В); 3DPQ-5 (Г); 3DPQ-8 (Д); 3DPQ-6 (Ф) .

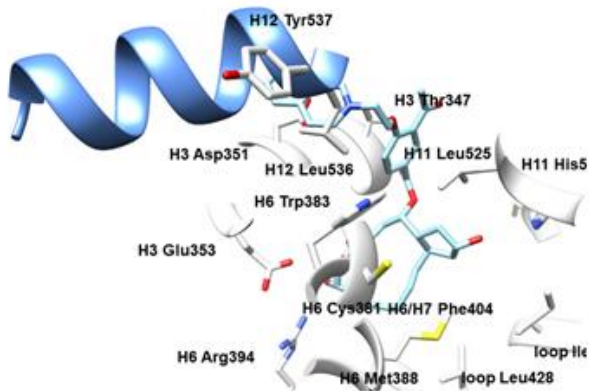


Слика ДМ187. Антагонизам естроген рецептора β у присуству 3DPQ-12 (А); 3DPQ-3 (Б); 3DPQ-9 (В); 3DPQ-4 (Г); 3DPQ-2 (Д); 3DPQ-1 (Е).

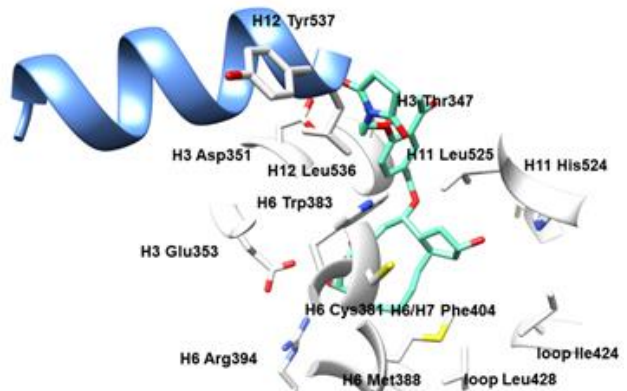


Слика ДМ188. Антагонизам естроген рецептора β у присуству 3DPQ-7 (А); 3DPQ-11 (Б); 3DPQ-10 (В); 3DPQ-5 (Г); 3DPQ-8 (Д); 3DPQ-6 (Е).

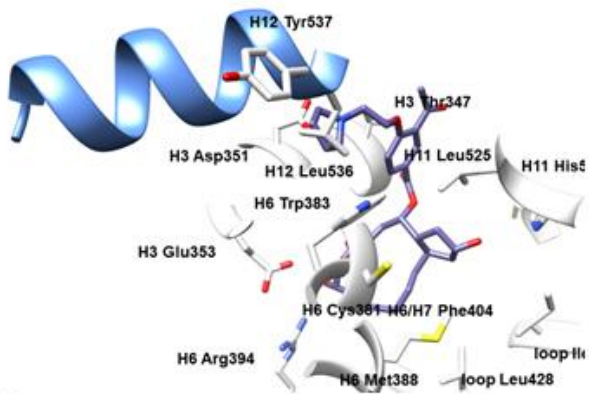
A



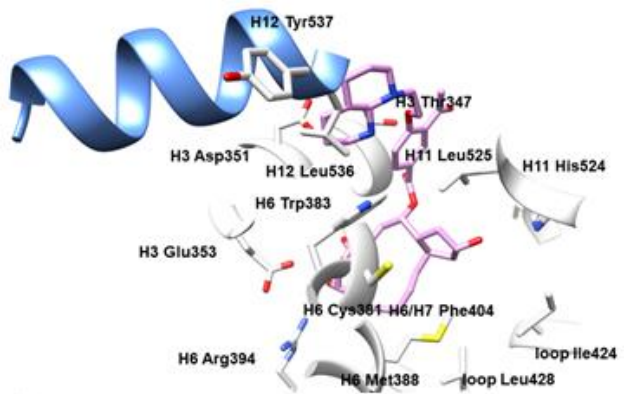
D



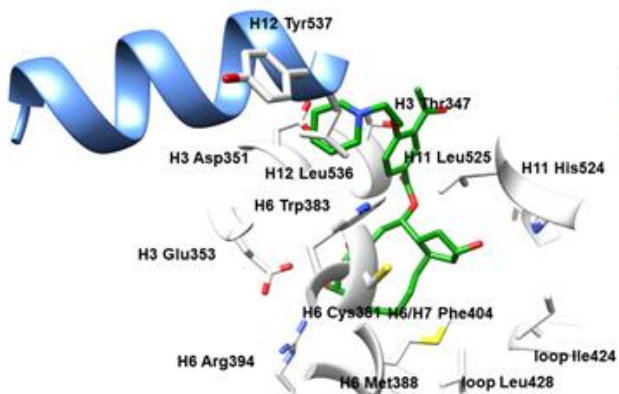
B



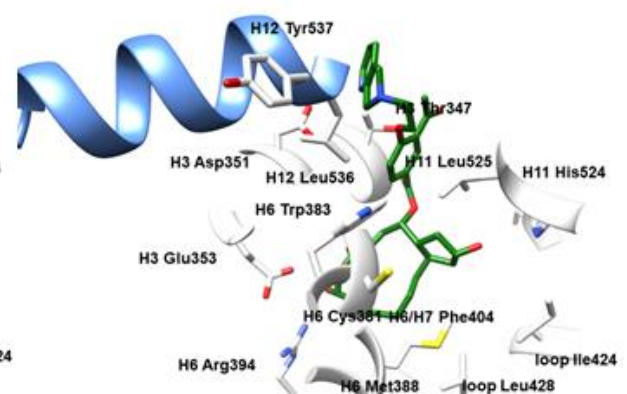
E



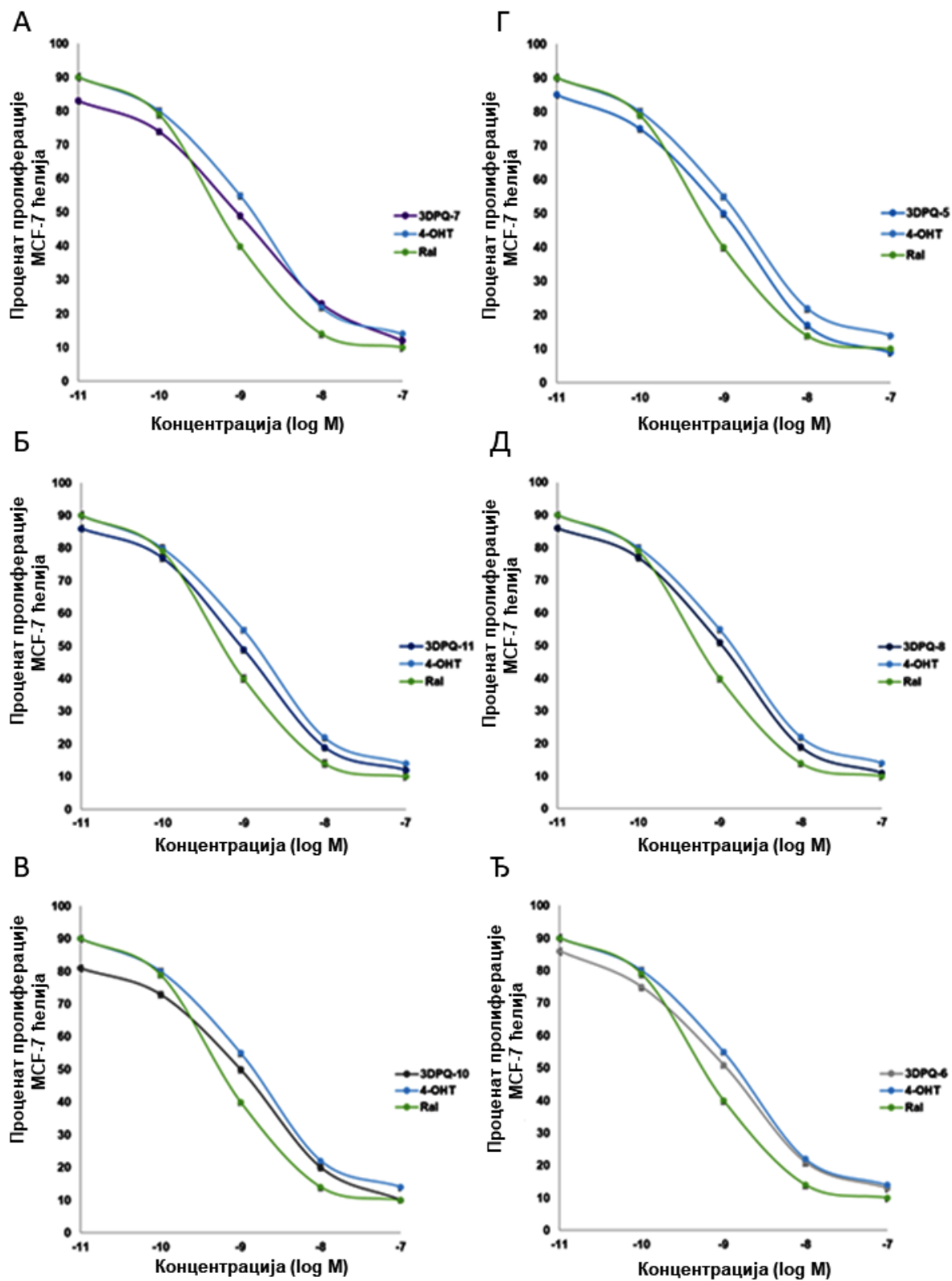
C



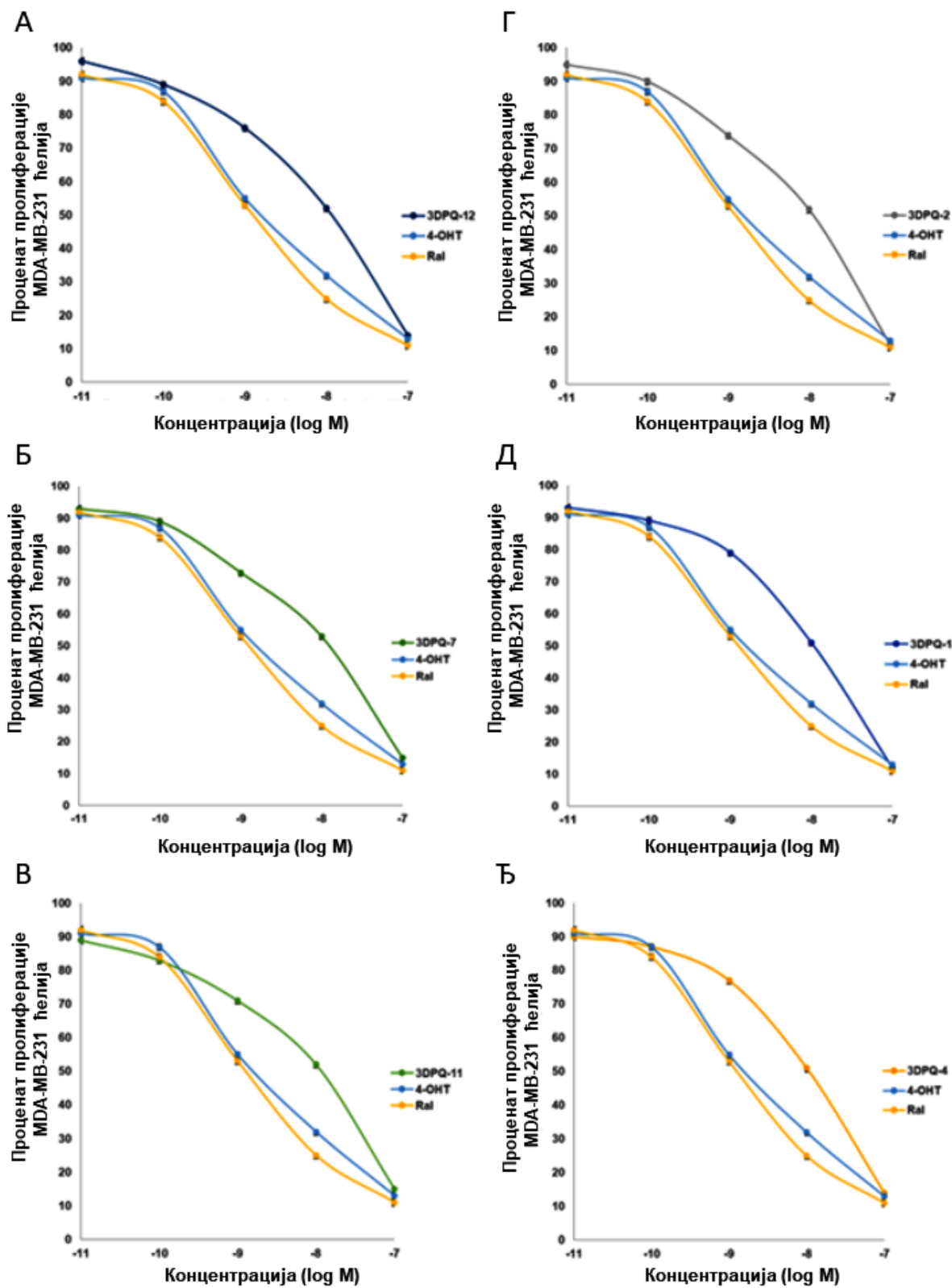
F



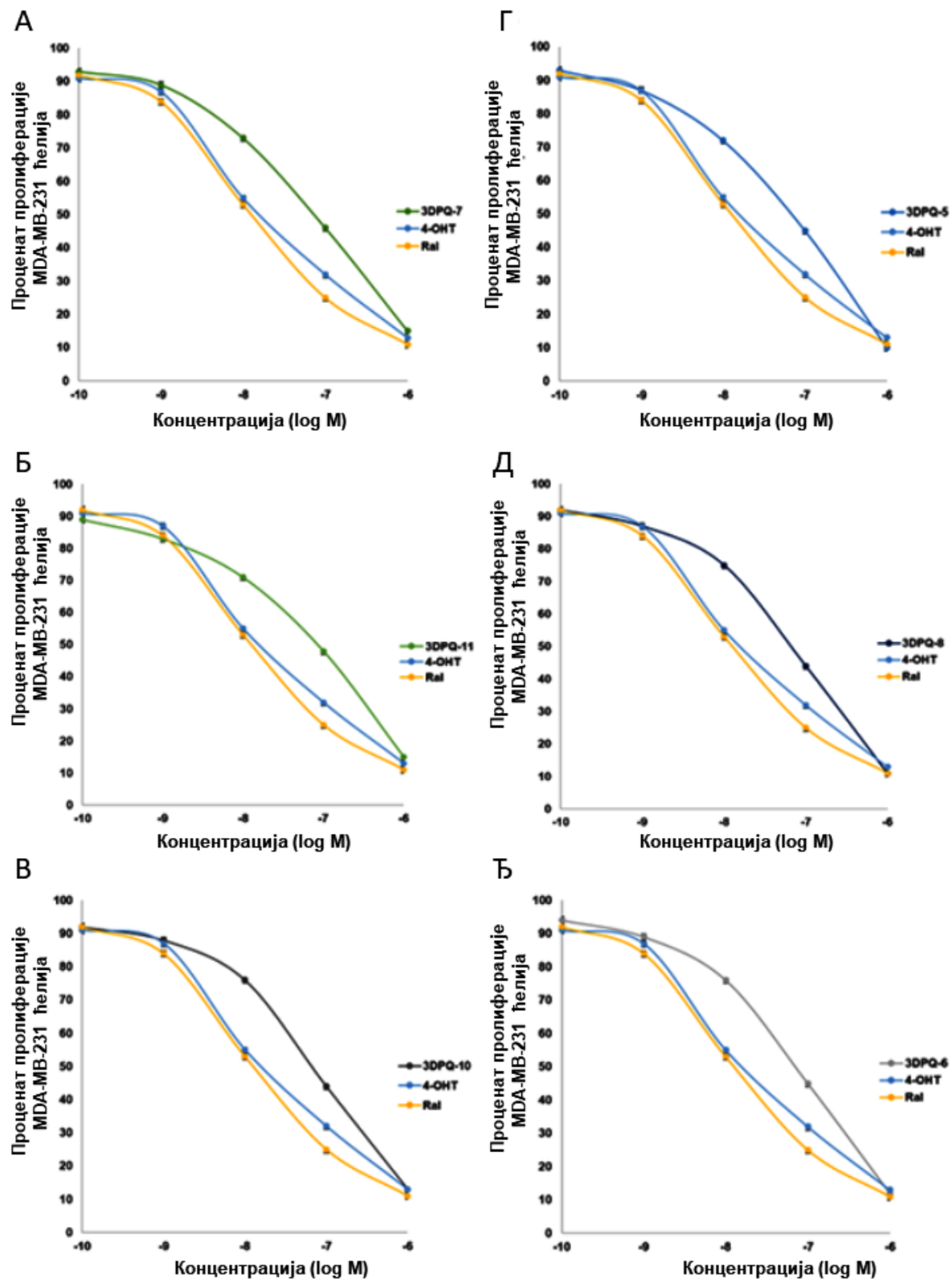
Слика ДМ189. Биоактивне конформације **3DPQ-7** (А); **3DPQ-11** (Б); **3DPQ-10** (В); **3DPQ-5** (Г); **3DPQ-8** (Д); **3DPQ-6** (Ѕ) унутар активног центра ER α . Аминокиселине су приказане белом бојом, хеликс H12 приказан је плавом бојом.



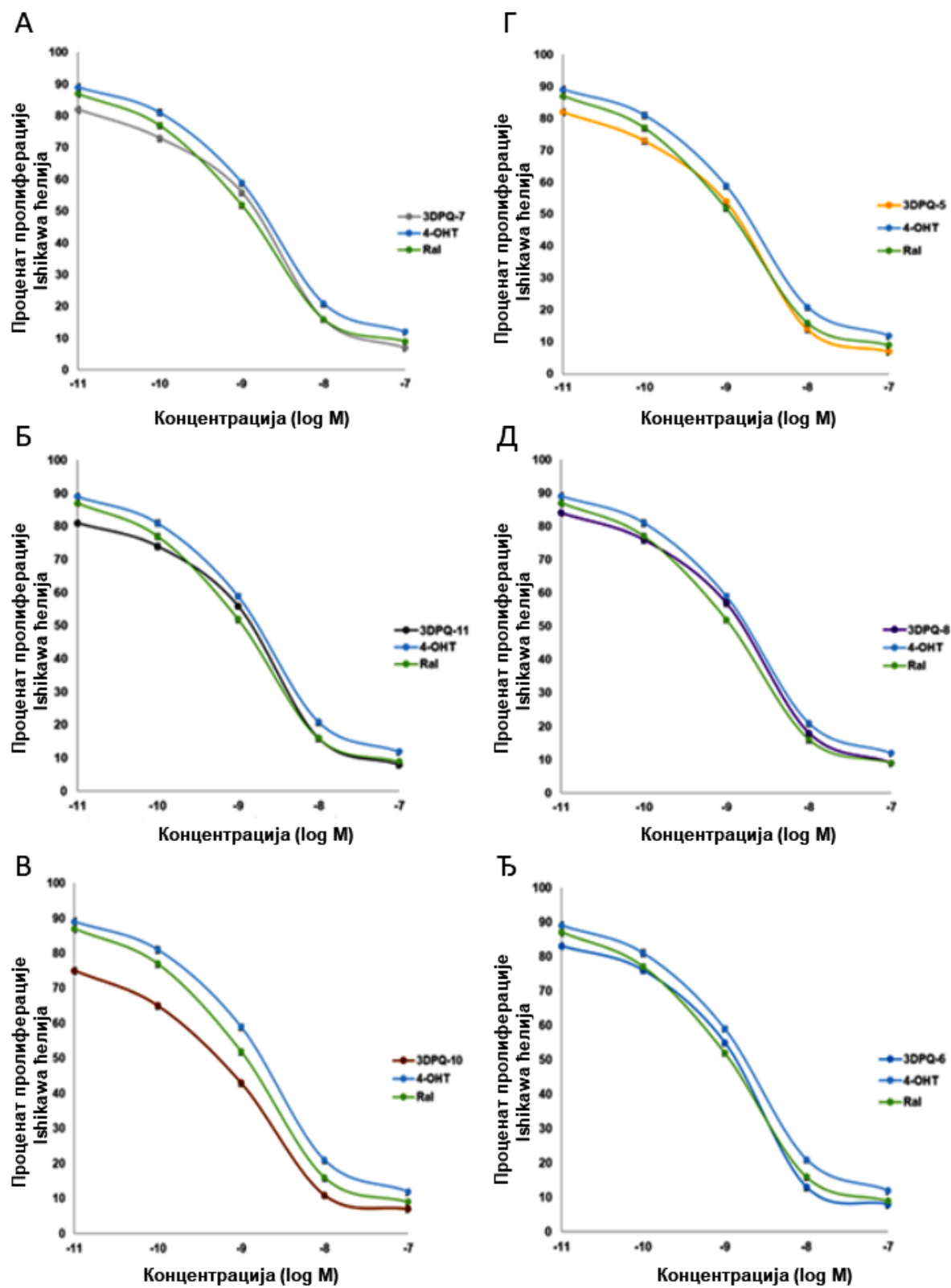
Слика ДМ190. Антипролиферативна активност за **3DPQ-7** (А); **3DPQ-11** (Б); **3DPQ-10** (В); **3DPQ-5** (Г); **3DPQ-8** (Д); **3DPQ-6** (Ђ) против МСF-7 cell ћелијских линија.



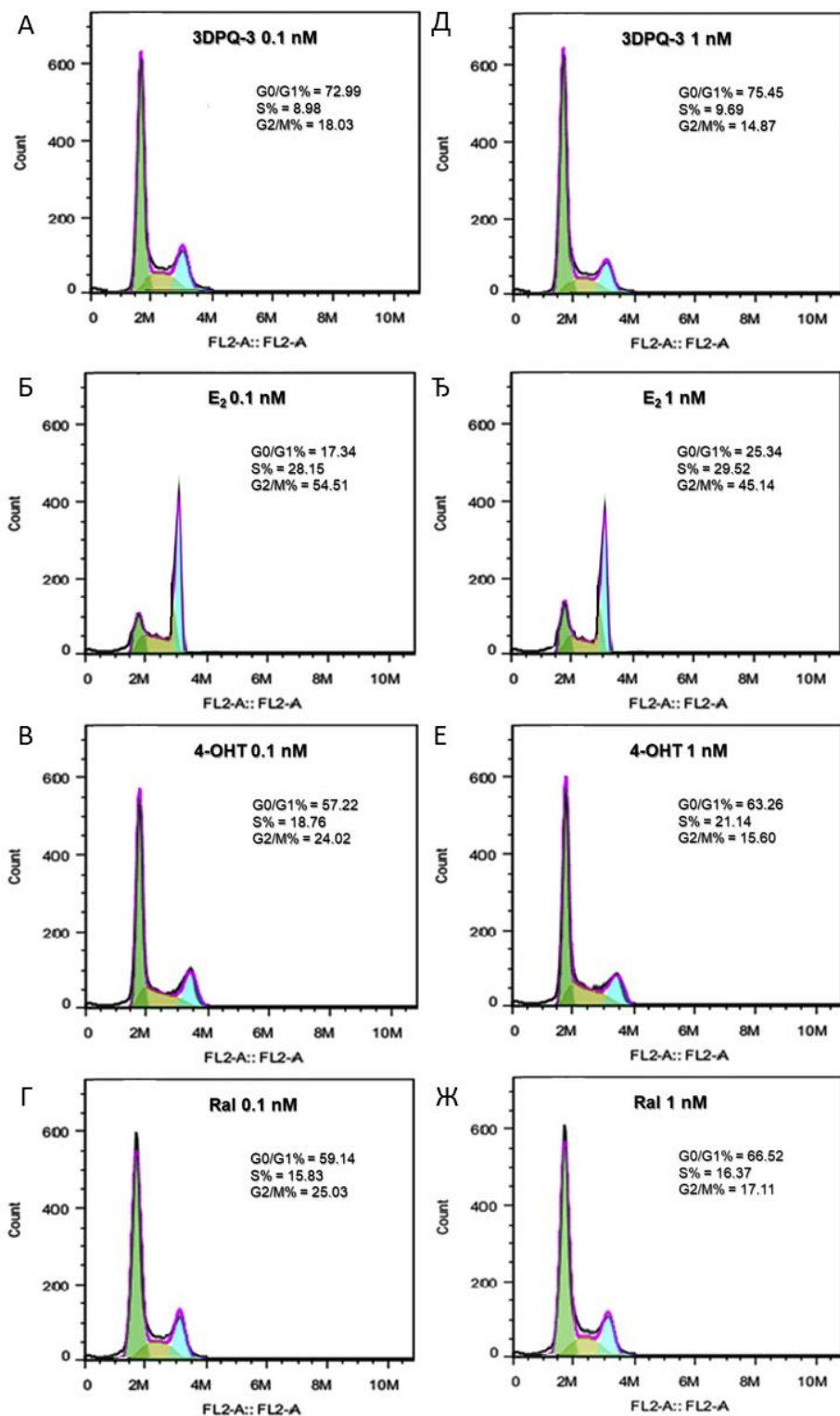
Слика ДМ191. Антипролиферативна активност **3DPQ-12** (А); **3DPQ-7** (Б); **3DPQ-11** (В); **3DPQ-2** (Г); **3DPQ-1** (Д); **3DPQ-4** (Ё) против MDA-MB-231 ћелијских линија.



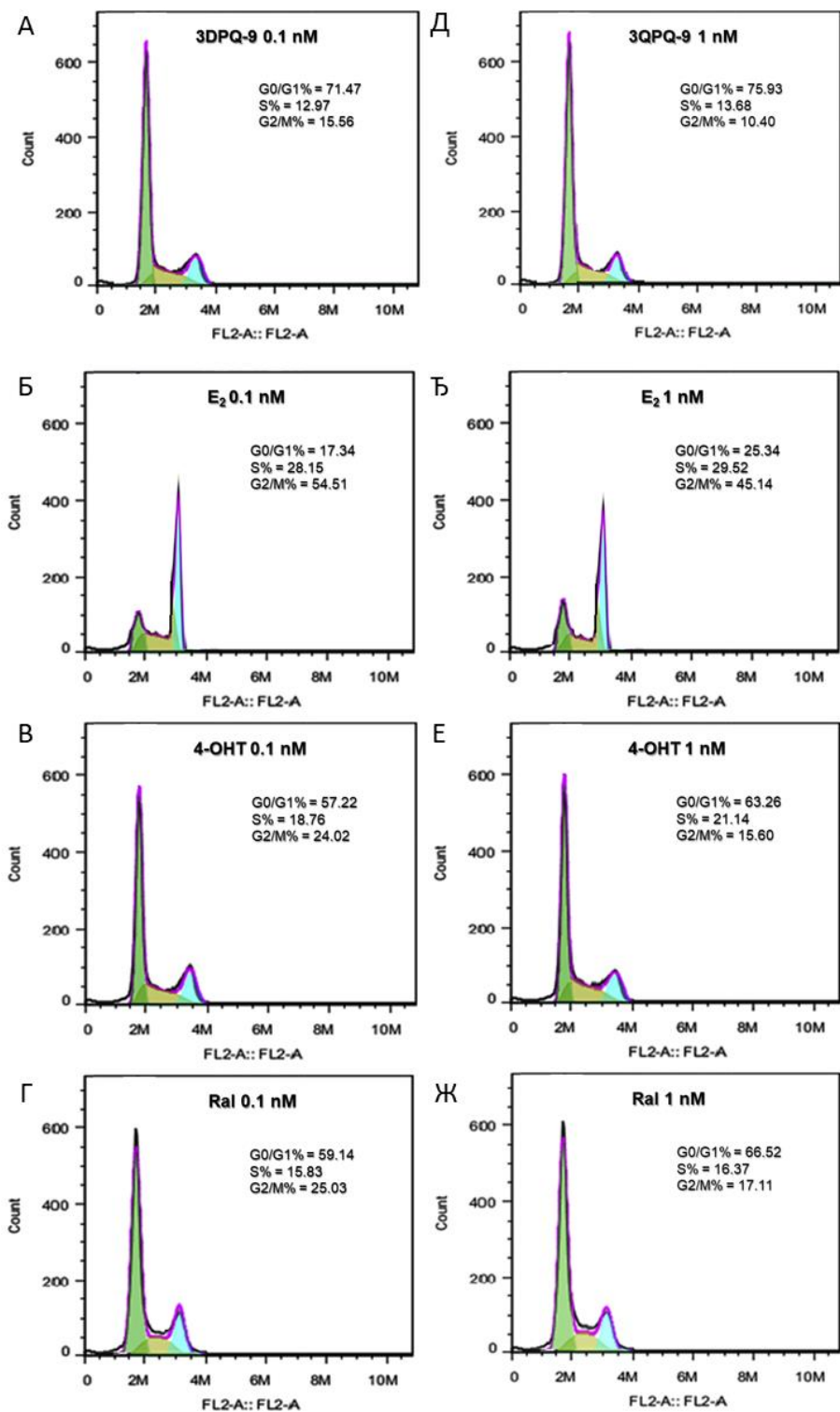
Слика ДМ192. Антипролиферативна активност **3DPQ-7** (А); **3DPQ-11** (Б); **3DPQ-10** (В); **3DPQ-5** (Г); **3DPQ-8** (Д); **3DPQ-6** (Ѕ) против MDA-MB-231 ћелијских линија.



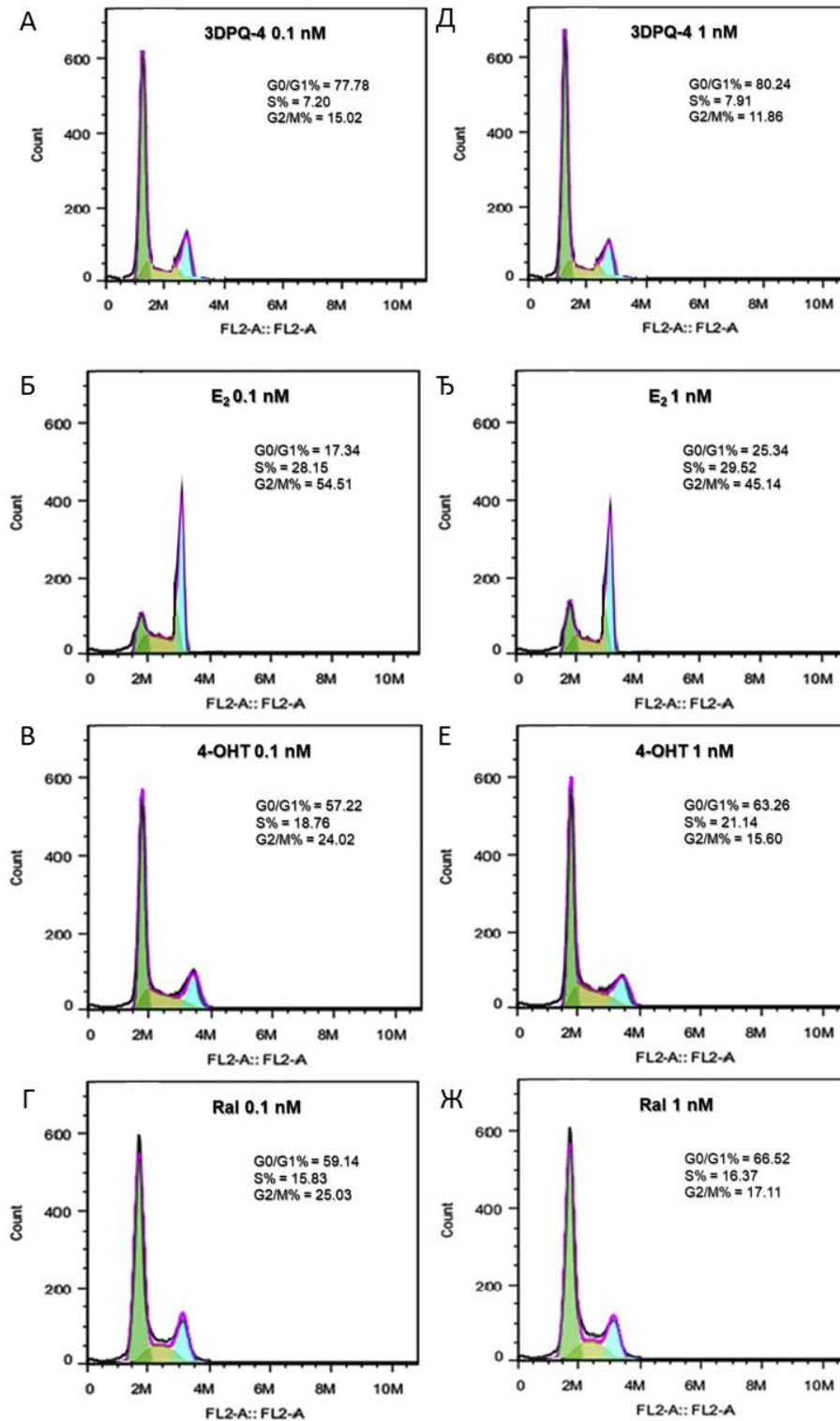
Слика ДМ193. Антипролиферативна активност **3DPQ-7** (А); **3DPQ-11** (Б); **3DPQ-10** (В); **3DPQ-5** (Г); **3DPQ-8** (Д); **3DPQ-6** (Ѕ) против Ishikawa ћелијских линија.



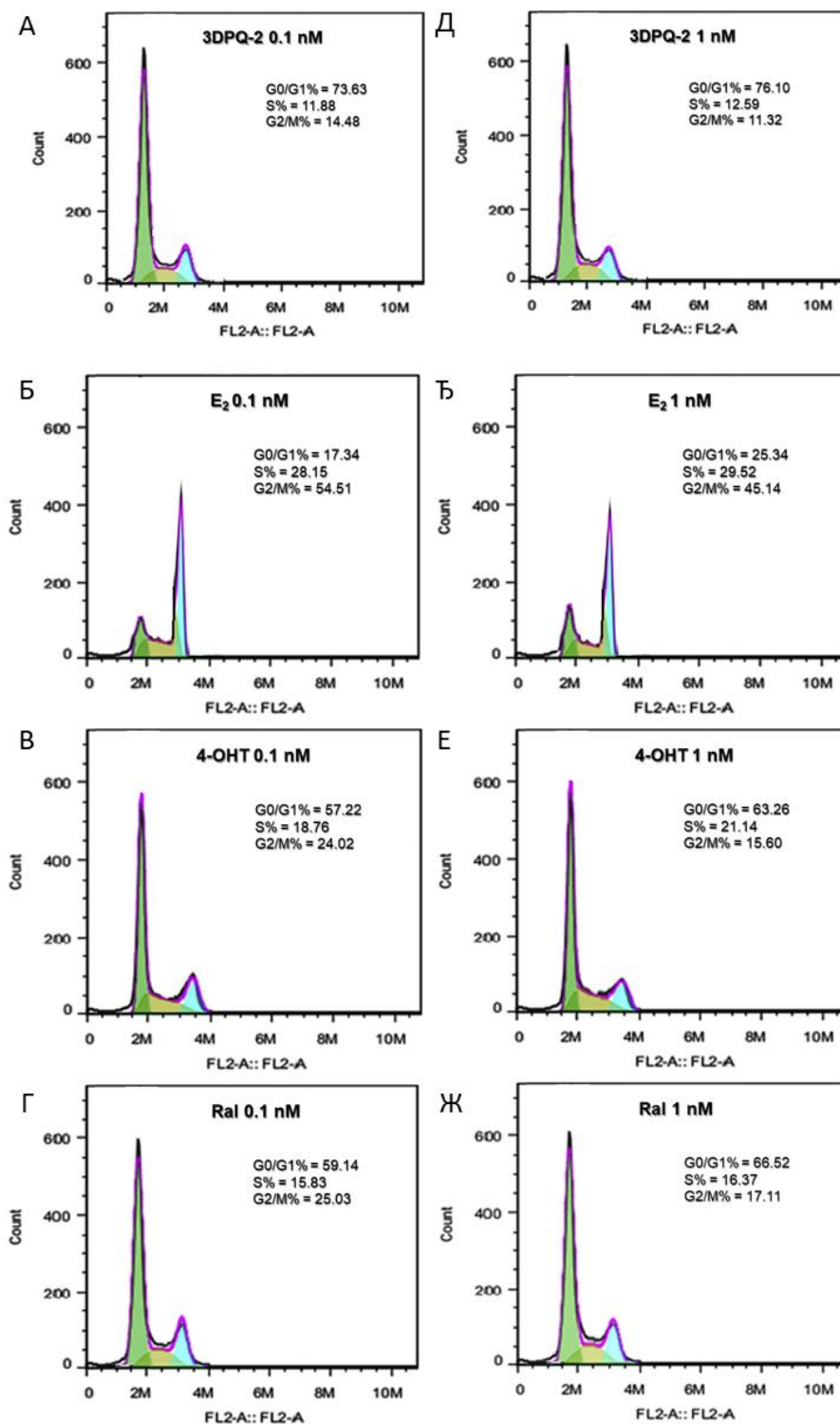
Слика ДМ194. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-3** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-3** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (З); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



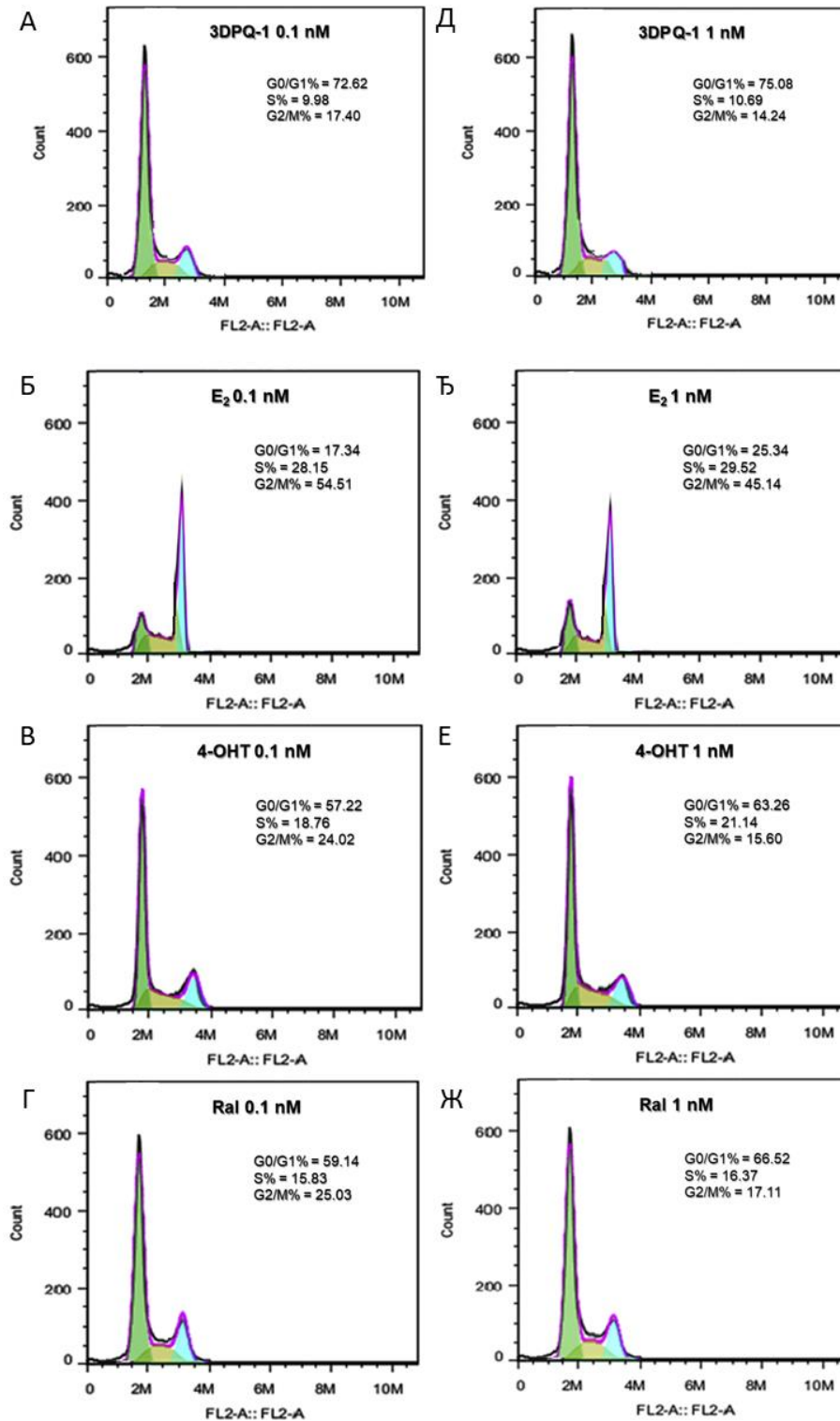
Слика ДМ195. Анализа ћелијског циклуса МСF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-9** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-9** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



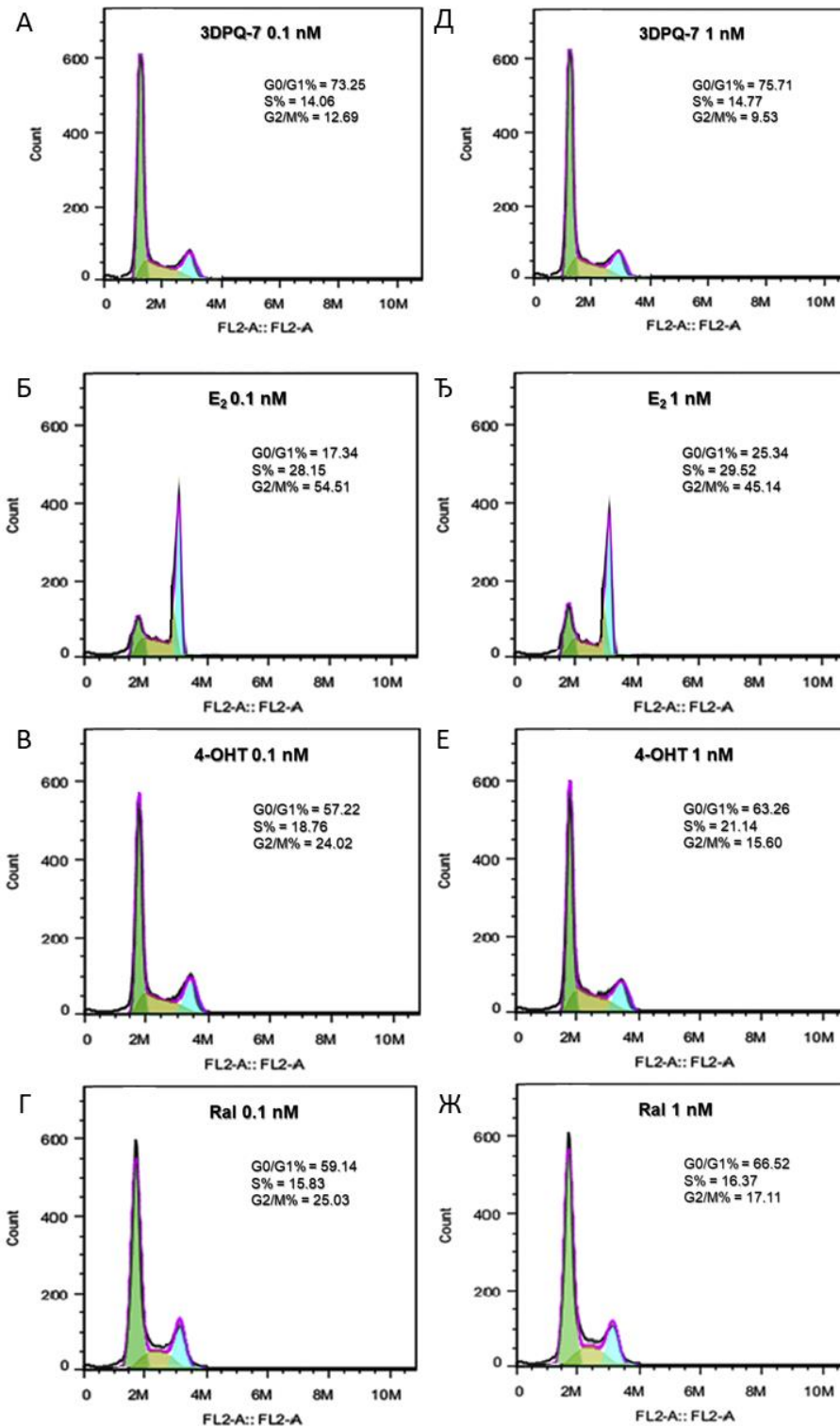
Слика ДМ196. Анализа ћелијског циклуса МСF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-4** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-4** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



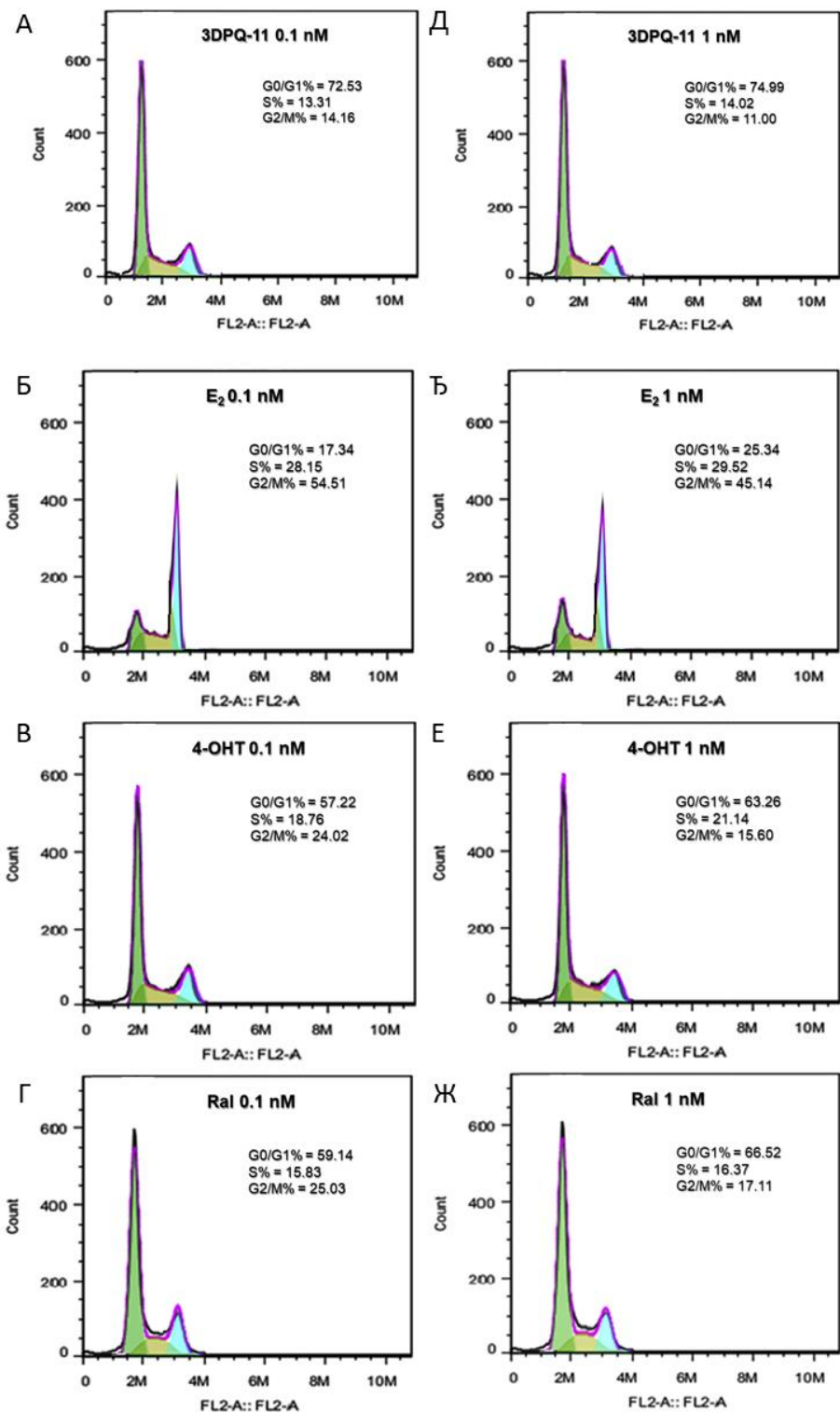
Слика ДМ197. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-2** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (B); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-2** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (E); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



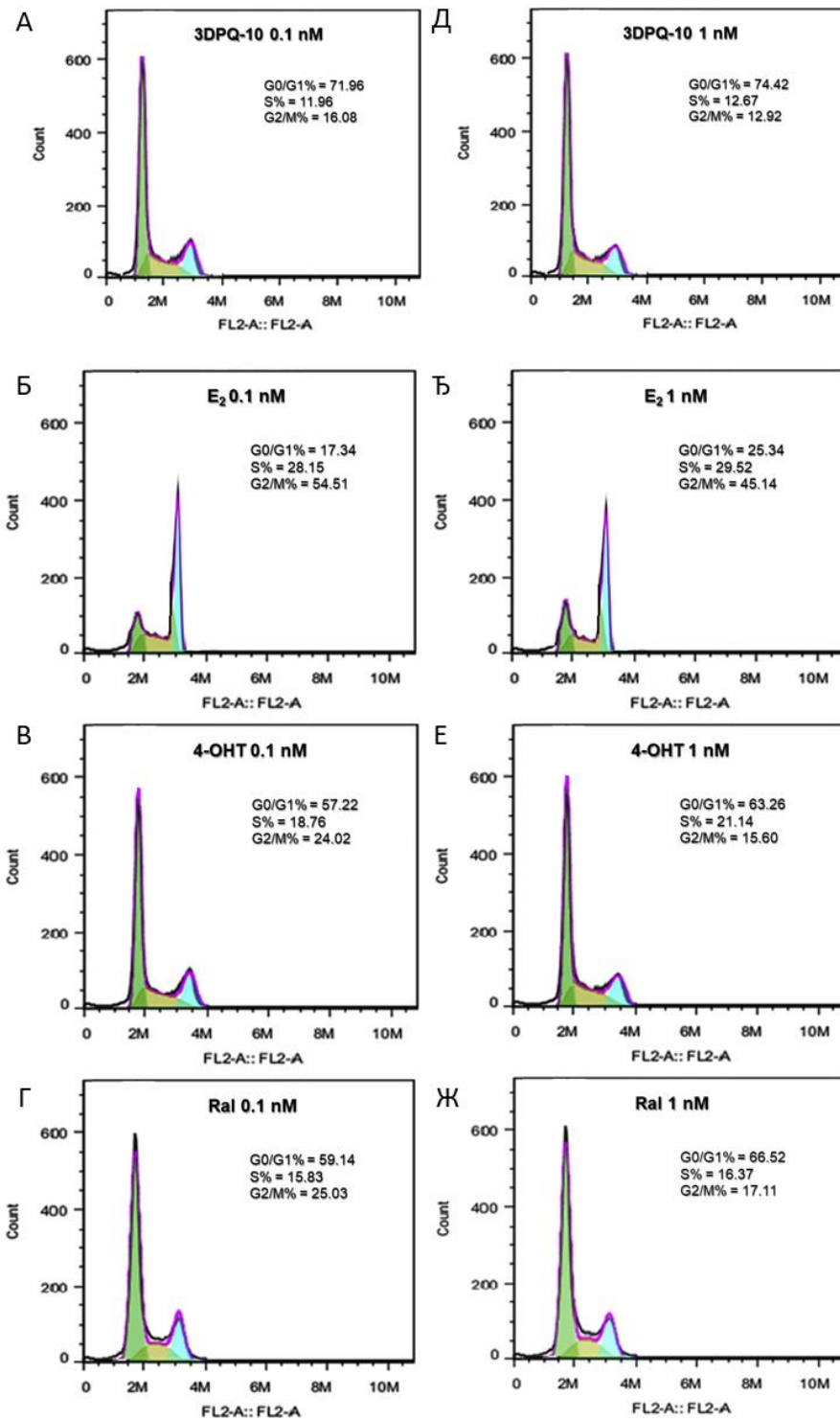
Слика ДМ198. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-1** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-1** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (З); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



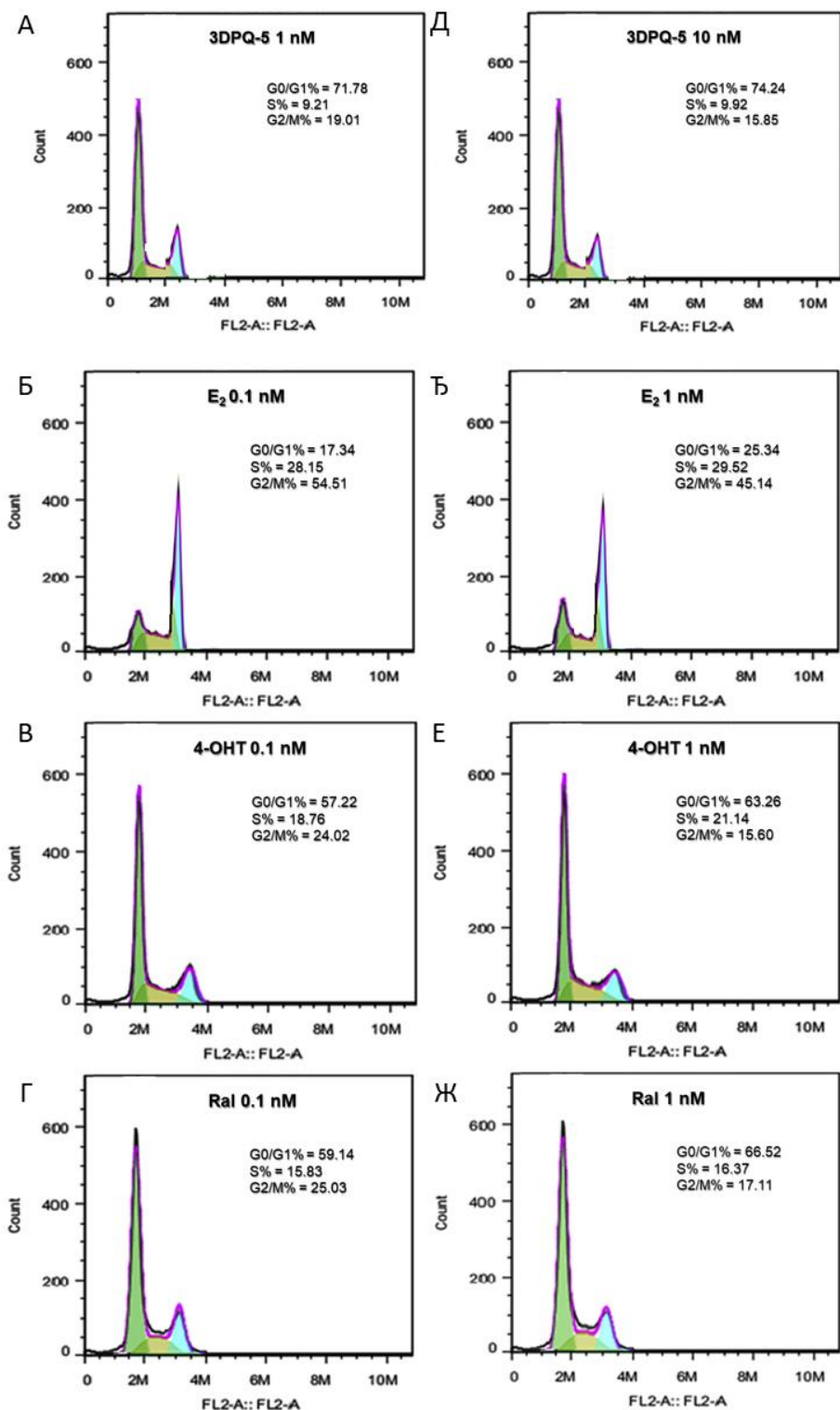
Слика ДМ199. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-7** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-7** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (З); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



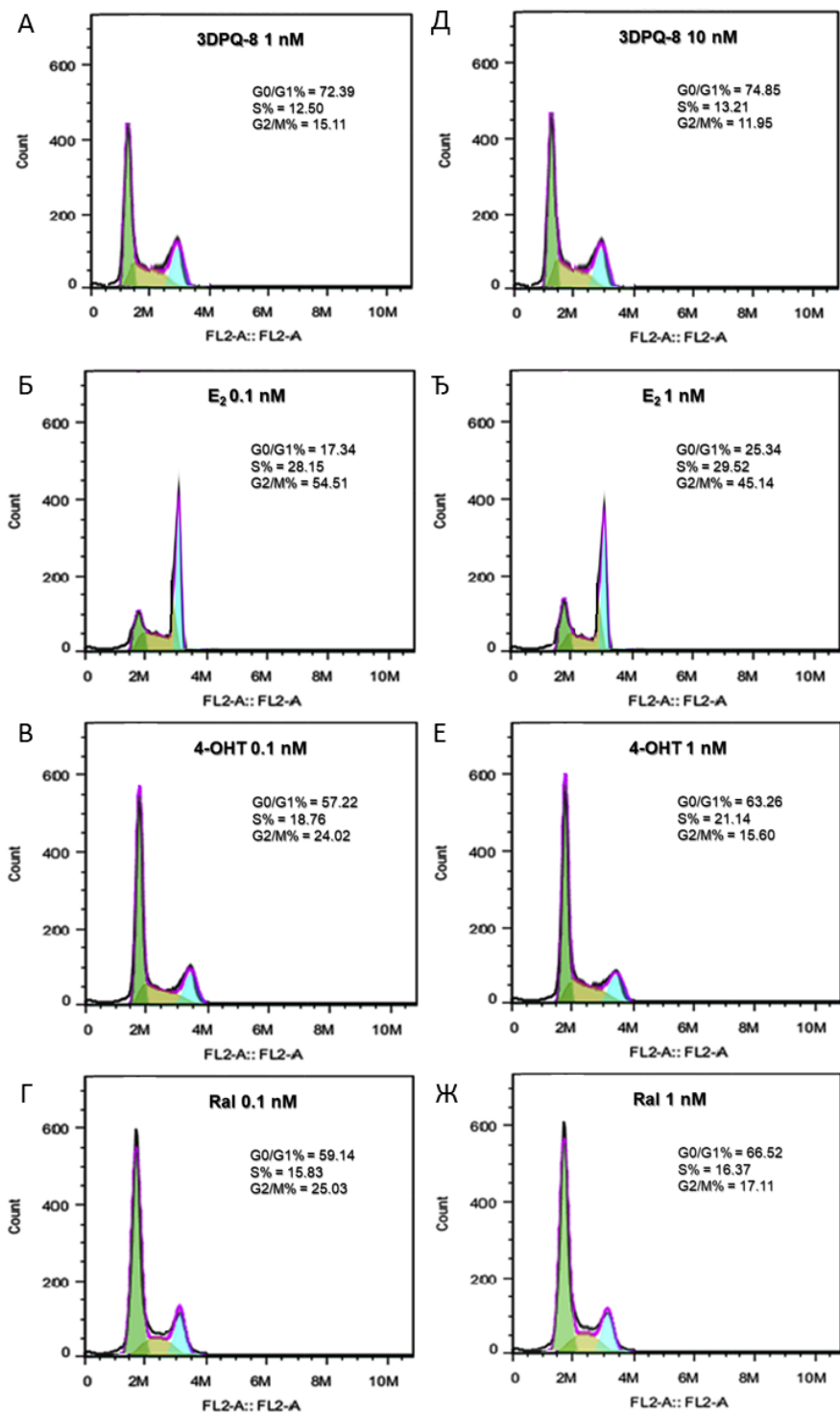
Слика ДМ200. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-11** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-11** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



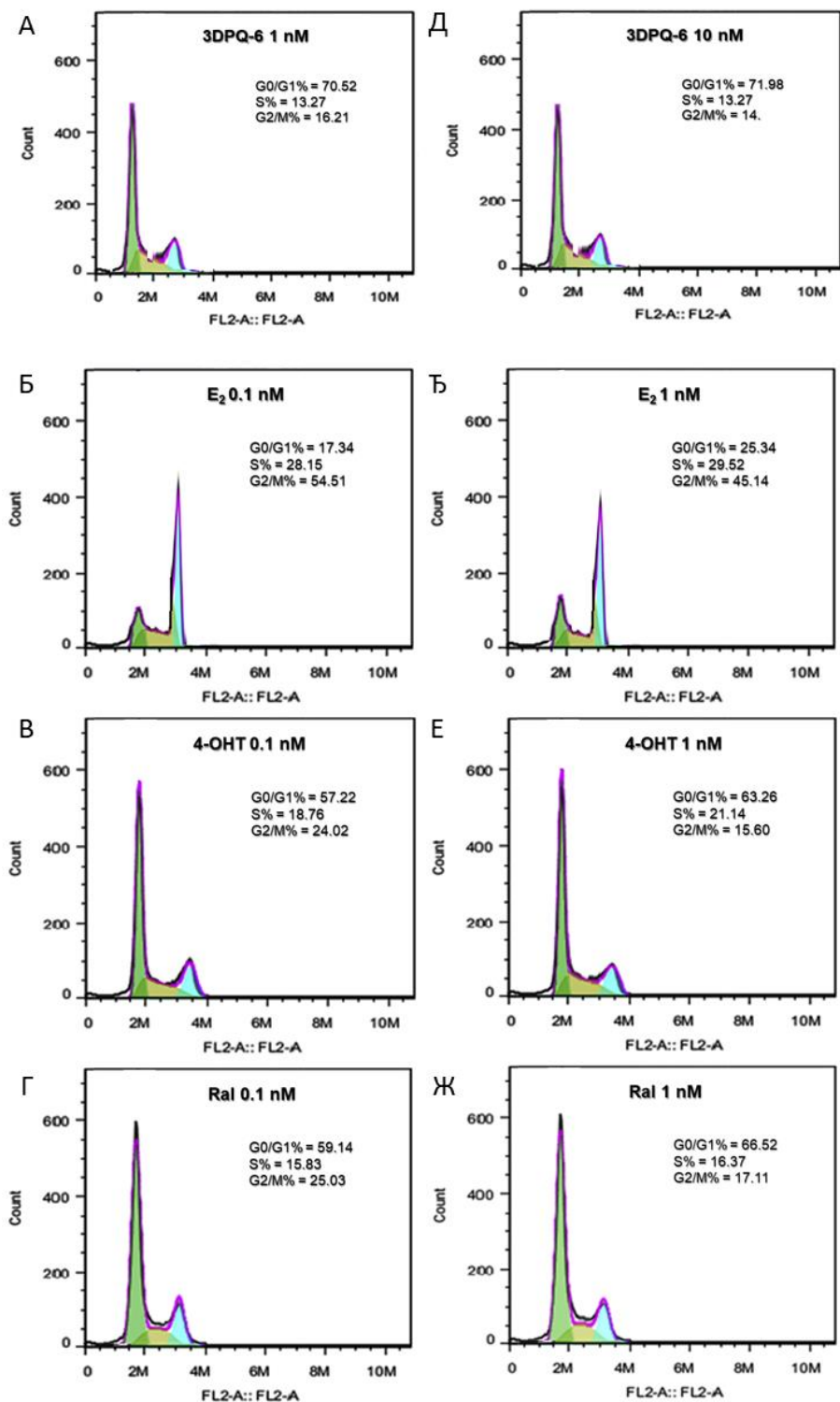
Слика ДМ201. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-10** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-10** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



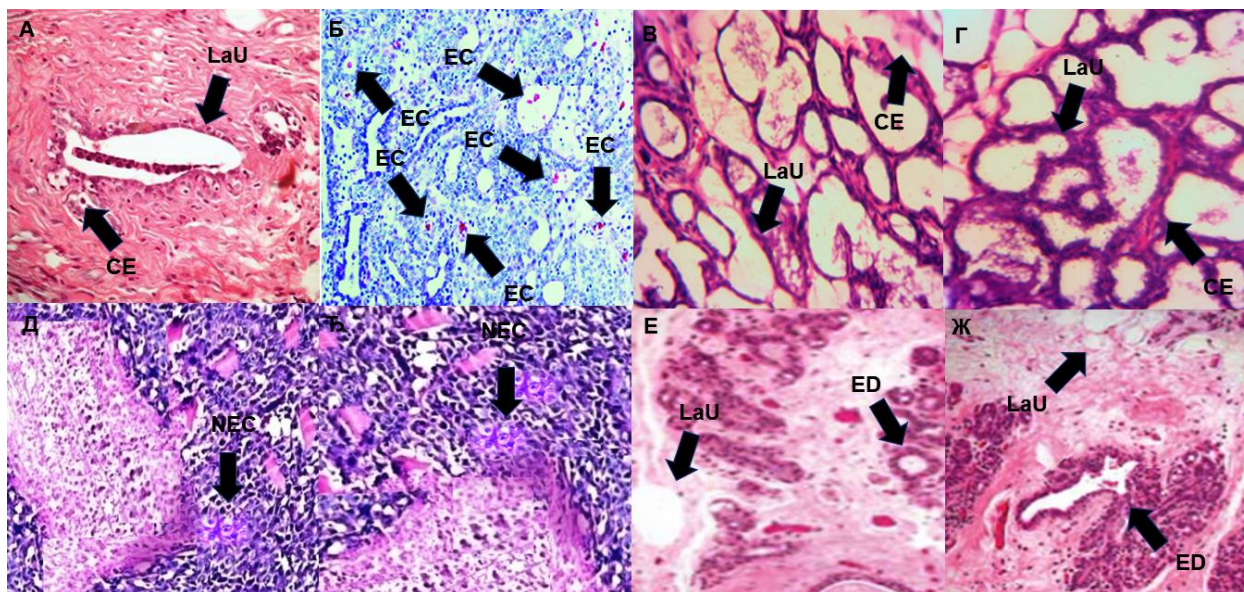
Слика ДМ202. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-5** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-5** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



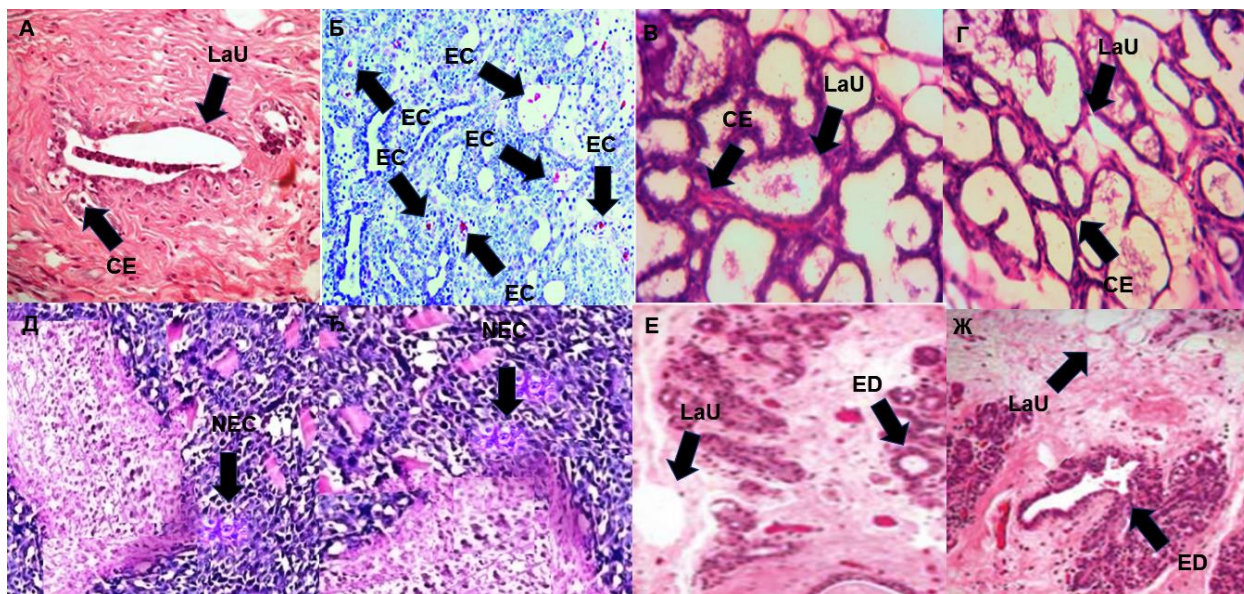
Слика ДМ203. Анализа ћелијског циклуса МСF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-8** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-8** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



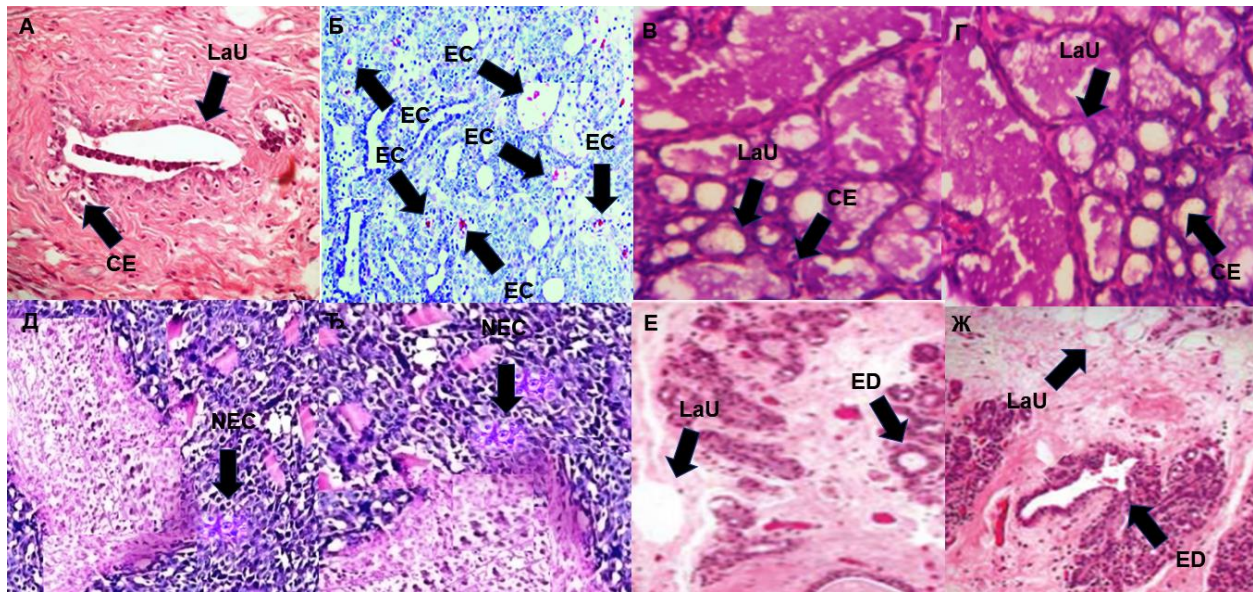
Слика ДМ204. Анализа ћелијског циклуса MCF-7 ћелијских линија третираних са **3DPQ-6** у концентрацији од 0,1 nM (А); **E₂** у концентрацији од 0,1 nM (Б); **4-OHT** у концентрацији од 0,1 nM (В); **Ral** у концентрацији од 0,1 nM (Г); **3DPQ-6** у концентрацији од 1 nM (Д); **E₂** у концентрацији од 1 nM (Ђ); **4-OHT** у концентрацији од 1 nM (Е); **Ral** у концентрацији од 1 nM (Ж).



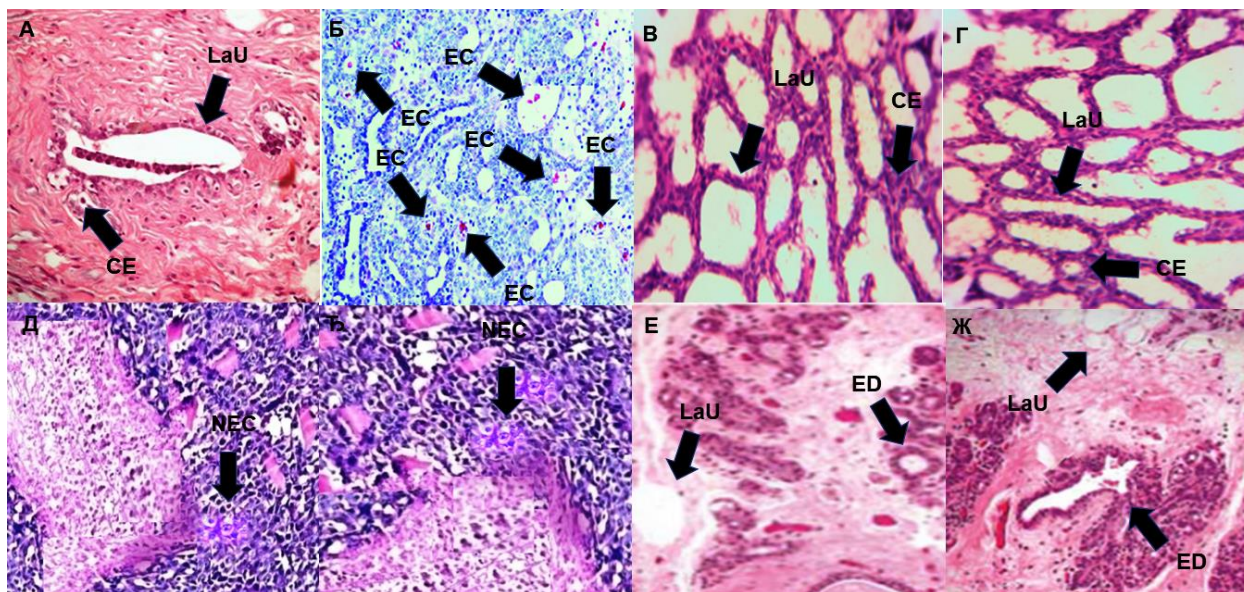
Слика ДМ205. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-3** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-3** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



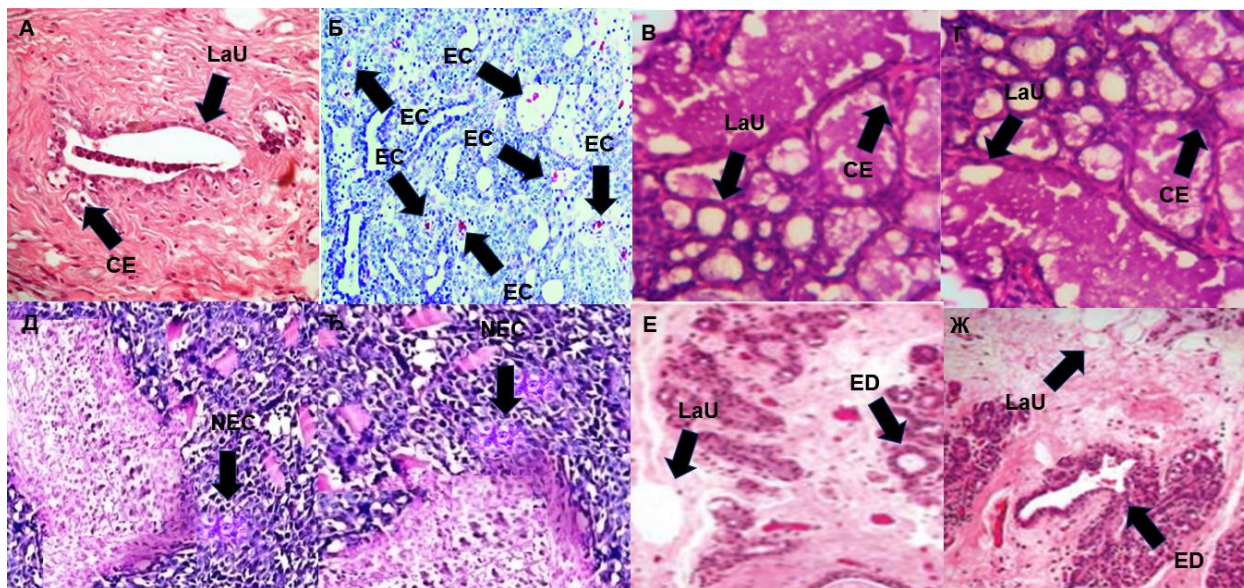
Слика ДМ206. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-9** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-9** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.




Слика ДМ207. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-4** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-4** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



Слика ДМ208. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-2** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-2** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



Слика ДМ209. Фотомикрограф исечка дојке пацова из контролне групе на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (А); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **MNU** на коме је приказан карцином млечне жлезде заједно са масивном пролиферацијом неопластичних епителијарних ћелија (EC) (Б); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-1** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (В); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **3DPQ-1** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказане лобуалвеоларне јединице (LaU) и кубоидалне епителијарне ћелије (CE) (Г); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Д); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **4-ОНТ** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме је приказана некроза (NEC) (Ђ); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 5 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Е); Фотомикрограф исечка дојке пацова третираног са **Ral** у концентрацији од 50 mg/kg телесне тежине на коме су приказани диференцирани екстралобуларни канали (ED) (Ж), увећан 200 пута и обојен хематоксилином и еозином.



**Публиковани
резултати
докторске дисертације**

Human Estrogen Receptor α Antagonists. Part 1: 3-D QSAR-Driven Rational Design of Innovative Coumarin-Related Antiestrogens as Breast Cancer Suppressants through Structure-Based and Ligand-Based Studies

Nezrina Mihović, Nevena Tomašević, Sanja Matić, Marina M. Mitrović, Danijela A. Kostić, Manuela Sabatino, Lorenzo Antonini, Rino Ragno,* and Milan Mladenović*



Cite This: *J. Chem. Inf. Model.* 2021, 61, 5028–5053



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

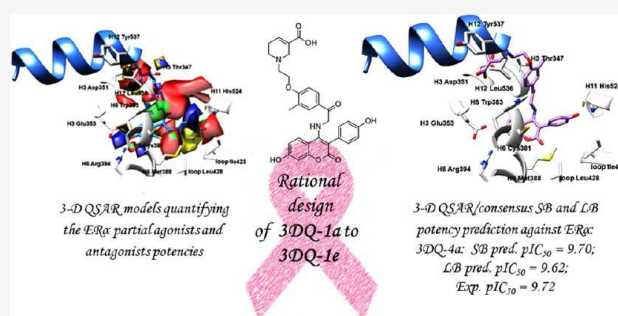


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: The estrogen receptor α (ER α) represents a 17 β -estradiol-inducible transcriptional regulator that initiates the RNA polymerase II-dependent transcriptional machinery, pointed for breast cancer (BC) development *via* either genomic direct or genomic indirect (*i.e.*, tethered) pathway. To develop innovative ligands, structure-based (SB) three-dimensional (3-D) quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies have been undertaken from structural data taken from partial agonists, mixed agonists/antagonists (selective estrogen receptor modulators (SERMs)), and full antagonists (selective ER α downregulators (SERDs)) correlated with either wild-type or mutated ER α receptors. SB and ligand-based (LB) alignments allow us to rule out guidelines for the SB/LB alignment of untested compounds. 3-D QSAR models for ER α ligands, coupled with SB/LB alignment, were revealed to be useful tools to dissect the chemical determinants for ER α -based anticancer activity as well as to predict their potency. The herein developed protocol procedure was verified through the design and potency prediction of 12 new coumarin-based SERMs, namely, 3DQ-1a to 3DQ-1e, that upon synthesis turned to be potent ER α antagonists by means of either *in vitro* or *in vivo* assays (described in the second part of this study).



INTRODUCTION

Estrogen receptors (ERs) are class I members of the nuclear receptor (NR) superfamily and represent 17 β -estradiol (E₂)-inducible transcriptional regulators.¹ E₂ is normally produced within the female ovaries' follicles and also in other endocrine and nonendocrine tissues.² E₂'s bioactivity is mediated by two estrogen NRs, α (ER α) and β (ER β).³ ER α , the predominant isoform, regulates estrogens' activity in mammary gland development, mating behavior, the hormonal regulation of glucose metabolism, cardiovascular system, and hypothalamic–pituitary axis while maintaining the bone mineral density.⁴ As a key factor in breast cancer (BC) development, E₂ initiates a series of ER α -associated molecular events, mostly regulated by transcriptional factors. In this scenario, BC suffering patients are mainly treated with antiestrogens to block ER α activity.⁵ However, the side effects due to off-target activity and the development of drug resistance in chronic treatment imply continuous demand for novel and more potent ER α antagonists.¹

A survey through the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) revealed that no full three-dimensional (3-D) ER α structure has yet been deposited. On the other hand, crystal

structures of the DNA-binding domain (DBD), complexed with a specific human estrogen response element (*hERE*) sequence,^{6–8} and ligand-binding domain (LBD), cocrystallized with a series of partial agonists, mixed agonists/antagonists, and full antagonists (Figure 1), are available (Tables 1–3 and S1). LBD is of particular importance since it conveys partial agonists' and antagonists' potency on the transcription *via* either genomic direct or indirect (*i.e.*, the tethered) pathway: both pathways are initiated with the agonist-induced dimerization of ER α .^{6–8} As any rational drug design approach focused on antagonism implies a deep knowledge of the understudy biochemistry scenarios, for the sake of manuscript length and clarity, further information and references that could be useful to the reader are reported in the Supporting Information.

Received: May 10, 2021

Published: October 14, 2021





Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Human estrogen receptor α antagonists, part 2: Synthesis driven by rational design, *in vitro* antiproliferative, and *in vivo* anticancer evaluation of innovative coumarin-related antiestrogens as breast cancer suppressants

Nezrina Kurtanović^a, Nevena Tomašević^a, Sanja Matić^b, Marina M. Mitrović^c,
Danijela A. Kostić^d, Manuela Sabatino^e, Lorenzo Antonini^e, Rino Ragno^{e, **},
Milan Mladenović^{a, *}

^a Kragujevac Center for Computational Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000, Kragujevac, P.O. Box 60, Serbia

^b University of Kragujevac, Institute for Informational Technologies, Jovana Cvijića bb, 34000, Kragujevac, Serbia

^c University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Biochemistry, Svetozara Markovića 69, 34000, Kragujevac, Serbia

^d University of Niš, Department of Chemistry, Faculty of Sciences and Mathematics, Višegradska 33, 18000, Niš, Serbia

^e Rome Center for Molecular Design, Department of Drug Chemistry and Technology, Faculty of Pharmacy and Medicine, Sapienza University of Rome, P.le A. Moro 5, 00185, Rome, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2021

Received in revised form

4 September 2021

Accepted 21 September 2021

Available online 29 September 2021

Keywords:

Breast cancer

Coumarin-based ER α antagonists

Synthesis

In vitro antiproliferative evaluation*In vivo* anticancer evaluation

ABSTRACT

New twelve *in silico* designed coumarin-based ER α antagonists, namely **3DQ-1a** to **3DQ-1e**, were synthesized and confirmed as selective ER α antagonists, showing potencies ranging from single-digit nanomolar to picomolar. The hits were confirmed as selective estrogen receptor modulators and validated as antiproliferative agents using MCF-7 breast cancer cell lines exerting from picomolar to low nanomolar potency, at the same time showing no agonistic activity within endometrial cell lines. Their mechanism of action was inspected and revealed to be through the inhibition of the Raf-1/MAPK/ERK signal transduction pathway, preventing hormone-mediated gene expression on either genomic direct or genomic indirect level, and stopping the MCF-7 cells proliferation at G₀/G₁ phase. *In vivo* experiments, by means of the *per os* administration to female Wistar rats with pre-induced breast cancer, distinguished six derivatives, **3DQ-4a**, **3DQ-2a**, **3DQ-1a**, **3DQ-1b**, **3DQ-2b**, and **3DQ-3b**, showing remarkable potency as tumor suppressors endowed with optimal pharmacokinetic profiles and no significant histopathological profiles. The presented data indicate the new compounds as potential candidates to be submitted in clinical trials for breast cancer therapy.

© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Besides early diagnosis, progression, prediction of the disease's prognosis, and optimization of the appropriate treatment, the breast cancer (BC) handling is dependent on the estrogen receptor α (ER α) expression levels, as the ER α abnormal expression is a striking pathological phenotype [1–3]. Therefore, efforts to treat

the BC worldwide still focus on the ER α as a far-reaching target for pharmaceutical discovery, despite SERMs and SERDs were developed as two BC drug leading series [4].

Among the thousands of developed new chemical entities, coumarins and coumarin-like compounds were given significant attention as new BC drugs (Fig. 1). Thus, naturally occurring coumarins [5–8], 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins (*i.e.* neoflavanones), as well as (\pm)-8-alkyl-5,7-dihydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-3,4-dihydrocoumarins as neoflavanones derivatives [9], *N*-substituted 4-amino-3-(2-methylbenzyl)coumarins [10], and substituted benzopyranobenzothiazinones [11] act in estrogenic fashion. Notably, umbelliferone [12] and neo-tanshinlactone [13] were found to be

** Corresponding author.

* Corresponding author.

E-mail addresses: rino.ragno@uniroma1.it (R. Ragno), milan.mladenovic@pmf.kg.ac.rs (M. Mladenović).

Article

Human Estrogen Receptor Alpha Antagonists, Part 3: 3-D Pharmacophore and 3-D QSAR Guided Brefeldin A Hit-To-Lead Optimization toward New Breast Cancer Suppressants

Nezrina Kurtanović ¹, Nevena Tomašević ¹ , Sanja Matić ², Elenora Proia ³ , Manuela Sabatino ³ , Lorenzo Antonini ³ , Milan Mladenović ^{1,*} and Rino Ragno ^{3,*} 

- ¹ Kragujevac Center for Computational Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, P.O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia; nezrina.mihovic@pmf.kg.ac.rs (N.K.); nevena.stankovic@pmf.kg.ac.rs (N.T.)
- ² Institute for Informational Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia; sanjamatic@kg.ac.rs
- ³ Rome Center for Molecular Design, Department of Drug Chemistry and Technology, Faculty of Pharmacy and Medicine, Sapienza University of Rome, P.le A. Moro 5, 00185 Rome, Italy; eleonora.proia@uniroma1.it (E.P.); manuela.sabatino@uniroma1.it (M.S.); lorenzo.antonini@uniroma1.it (L.A.)
- * Correspondence: milan.mladenovic@pmf.kg.ac.rs (M.M.); rino.ragno@uniroma1.it (R.R.); Tel.: +381-34336223 (M.M.); +39-49913937 (R.R.)



Citation: Kurtanović, N.; Tomašević, N.; Matić, S.; Proia, E.; Sabatino, M.; Antonini, L.; Mladenović, M.; Ragno, R. Human Estrogen Receptor Alpha Antagonists, Part 3: 3-D Pharmacophore and 3-D QSAR Guided Brefeldin A Hit-To-Lead Optimization toward New Breast Cancer Suppressants. *Molecules* **2022**, *27*, 2823. <https://doi.org/10.3390/molecules27092823>

Academic Editors: Halil İbrahim Ciftci, Belgin Sever and Mehlika Dilek Altıntop

Received: 15 March 2022

Accepted: 23 April 2022

Published: 28 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The estrogen receptor α (ER α) is an important biological target mediating 17 β -estradiol driven breast cancer (BC) development. Aiming to develop innovative drugs against BC, either wild-type or mutated ligand-ER α complexes were used as source data to build structure-based 3-D pharmacophore and 3-D QSAR models, afterward used as tools for the virtual screening of National Cancer Institute datasets and hit-to-lead optimization. The procedure identified Brefeldin A (BFA) as hit, then structurally optimized toward twelve new derivatives whose anticancer activity was confirmed both in vitro and in vivo. Compounds as SERMs showed picomolar to low nanomolar potencies against ER α and were then investigated as antiproliferative agents against BC cell lines, as stimulators of p53 expression, as well as BC cell cycle arrest agents. Most active leads were finally profiled upon administration to female Wistar rats with pre-induced BC, after which 3DPQ-12, 3DPQ-3, 3DPQ-9, 3DPQ-4, 3DPQ-2, and 3DPQ-1 represent potential candidates for BC therapy.

Keywords: breast cancer; estrogen receptor α ; structure-based 3-D pharmacophores; structure-based 3-D QSAR; brefeldin A derivatives synthesis; anticancer activity in vitro and in vivo

1. Introduction

Estrogen receptor α (ER α) mediates as nuclear receptor (NR) the hormonal breast cancer (BC) development [1–3], being stimulated by 17 β -estradiol (E₂); the initialization of tumor progression is regulated by either genomic direct or indirect pathway [4–11], as well as by the recruitment of transcriptional basal machinery (TBM) complex (see Supplementary Material: Introduction for further information and references). As there are no known cellular mechanisms to fully suppress BC development in vivo [1], clinical cases are treated with selective estrogen receptor modulators (SERMs, mixed agonists/antagonists of ER α), and selective ER α down-regulators (SERDs, full antagonists of ER α). Both SERMs and SERDs bind the ER α ligand-binding domain (LBD, Figure 1), inducing LBD's helix 12 (H12) induced fitting, leading to different pharmacological profiles: while SERMs, as non-steroid compounds, prevent the ER α signaling at genomic direct or genomic indirect level, SERDs, as steroid-based drugs, force the rapid downregulation and proteasomal degradation of ER α [12–17]. Herein, a simplified representation of LBD, either free or saturated with



**Биографија са
библиографијом**



Мастер хемичар Незрина Куртановић (девојачко Миховић) рођена је 30.07.1990. године у Новом Пазару. Основну школу „Стефан Немања” завршила је 2005. године, а средњу Медицинску школу у Новом Пазару 2009. године. Хемијско-технолошки факултет, универзитет у Новом Пазару, смер Хемија, уписала је школске 2010/2011, где је дипломирала 2014. године. Мастер академске студије хемије, смер Професор хемије уписала је школске 2014/2015 године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, а одбранила 2015. године. Докторске академске студије хемије – модул Биохемија уписала је школске 2015/2016 године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. У истраживачко звање за научну област Хемија на Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу 29.06.2016. године изабрана је као истраживач-приправник. Од 21.12.2017. године засновала је радни однос са Природно-математичким факултетом у Крагујевцу, као истраживач на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, број III43004. Одлуком Наставно-научног већа 29.05.2019-до данас изабрана је као истраживач сарадник на Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Члан је Српског хемијског, Српског биолошког, Српског биохемијског друштва, друштва генетичара Србије и Design^{IT}-TO-LEAD2019 организационог одбора.

Незрина Куртановић радила је као наставник хемије у основним школама у Новом Пазару у периоду од 2015-2017. године. Као истраживач била је ангажована у настави школске 2016/2017 године на предмету Примењена биохемија микроорганизама на Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу у оквиру уже научне области Биохемија. У периоду 2016. године била је рецензент уџбеничких комплеката за основну школу из хемије за Bigz и Klett.

У току докторских студија Незрина Куртановић публиковала је три научна рада са SCI листе који чине научни садржај докторске дисертације. Такође, Незрина Куртановић је аутор и коаутор 15 саопштења на скуповима од међународног и домаћег значаја. Поред објављених научних радова у међународним часописима и саопштења, ауторка је и дидактичких средстава одобрених од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије и то: уџбеничког комплеката из хемије за седми разред основне школе, дигиталних уџбеника из хемије за седми и осми разред и Приручника за наставнике хемије за седми и осми разред основне школе под покровитељством Издавачке куће „Klett“, Србија. Ауторка је Монографије под називом „Динуклеарни комплекси платине(II) са азот-донорским лигандима, чији је покровитељ Задужбина Андрејевић. Коаутор је књиге „РАЦИОНАЛНИ ДИЗАЈН БИОАКТИВНИХ ЈЕДИЊЕЊА: Од теоријског до практичног приступа“ која је по одлуци Наставно-научног већа Природно-математичког факултета у Крагујевцу, прихваћена као званични уџбеник Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

Учествовала је 2020. године на промоцијама уџбеничког комплеката Хемија 7 и 8, чија је Издавачка кућа „Klett као и у одржавању Вебинара 2021.године као предавач педагошких и дидактичких тема. Надаље, 2021. године учествовала је на промоцији људских и мањинских права, пројекта под називом „Билингвалне СТЕМ научнице“ чији је покровитељ промоције Министарство за људска и мањинска права за друштвени дијалог и развој на челу са министрицом Горданом Чомић у Палати „Србија“.

Радови објављени у часописима међународног значаја:

1. D. Simijonović, E.-E. Vlachou, Z. D. Petrović, D. J. Hadjipavlou-Litina, K. E. Litinas, N. Stanković, **N. Mihović**, M. P. Mladenović, Dicoumarol derivatives: Green synthesis and molecular modelling studies of their anti-LOX activity, *Bioorganic Chemistry* 80 (2018) 741–752.

ISSN 0045-2068

doi: 10.1016/j.bioorg.2018.07.021

Категорија: **M21**

(IF₂₀₁₇ = 3.929; област: Biochemistry & Molecular Biology; 78/292)

2. **N. Mihović**, N. Tomašević, S. Matić, M. M. Mitrović, D. A. Kostić, M. Sabatino, L. Antonini, R. Ragno, and M. Mladenović, Human Estrogen Receptor α Antagonists. Part 1: 3-D QSAR-Driven Rational Design of Innovative Coumarin-Related Antiestrogens as Breast Cancer Suppressants through Structure-Based and Ligand-Based Studies, *Journal of Chemical Information and Modeling* 61 (2021).

ISSN 1549-9596

doi: 10.1021/acs.jcim.1c00530

Категорија: **M21**

(IF₂₀₂₀ = 4.956; област: Chemistry, Medicinal; 15/63)

3. **N. Kurtanović**, N. Tomašević, S. Matić, M. M. Mitrović, D. A. Kostić, M. Sabatino, L. Antonini, R. Ragno, and M. Mladenović, Human estrogen receptor α antagonists, part 2: Synthesis driven by rational design, in vitro antiproliferative, and in vivo anticancer evaluation of innovative coumarin-related antiestrogens as breast cancer suppressants, *European Journal of Medicinal Chemistry* 227 (2021).

ISSN 0223-5234

doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113869

Категорија: **M21a**

(IF₂₀₂₀ = 6.514; област: Chemistry, Medicinal; 5/63)

4. M. Mladenović, B. B. Arsić, N. Stanković, **N. Mihović**, R. Ragno, A. Regan, J. S. Milićević, T. M. Trtić-Petrović, R. Micić, The targeted pesticides as Acetylcholinesterase inhibitors: comprehensive cross-organism molecular modelling studies performed to anticipate the pharmacology of harmfulness to humans *in vitro*, *Molecules*, 23 (2018) 2192.

ISSN 1420-3049

doi: 10.3390/molecules23092192

Категорија: **M22**

(IF₂₀₁₇ = 3.098; област: Biochemistry & Molecular Biology; 131/293)

5. **N. Kurtanović**, N. Tomasević, S. Matić, E. Proia, M. Sabatino, L. Antonini, M. Mladenović, R. Ragno, Human Estrogen Receptor Alpha Antagonists, Part 3: 3-D Pharmacophore and 3-D QSAR Guided Brefeldin A Hit-to-Lead Optimization toward New Breast Cancer Suppressants, *Molecules*, 27 (2022) 2823.

ISSN 1420-3049

doi: 10.3390/molecules27092823

Категорија: **M22**

(IF₂₀₂₁ = 4.412; област: Biochemistry & Molecular Biology; 115/296)

Саопштења:

1. J. Katanić, T. Boroja, V. Mihailović, S. Matić, N. Stanković, **N. Mihović**, M. Mladenović, V. Stanković, Protective effects of *Filipendula ulmaria* extracts on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Conference-IBSC 2016, 19-21 September 2016, Novi Sad, Serbia, p. 256-257.

Нема ISBN броја

2. T. Boroja, V. Mihailović, J. Katanić, G. Rosić, D. Selaković, J. Joksimović, V. Stanković, M. Mladenović, N. Stanković, **N. Mihović**, Nephroprotective effects of *Satureja hortensis* L. against cisplatin-induced toxicity, The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Conference-IBSC 2016, 19-21 September 2016, Novi Sad, Serbia, p. 268-269.

Нема ISBN броја

3. J. Katanić, T. Boroja, San-Po Pan, S. Nikles, R. Bauer, V. Mihailović, M. Mladenović, N. Stanković, **N. Mihović**, *Lunaria annua* L. (annual honesty) as a new antioxidant and anti-inflammatory agent, XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 11-14 September 2016, Ohrid, Republic of Macedonia, p. 82.

ISBN 978-9989-760-13-6

4. T. Boroja, V. Mihailović, J. Katanić, G. Rosić, D. Selaković, J. Joksimović, M. Mladenović, N. Stanković, **N. Mihović**, Hepatoprotective efficacy of summer savory against cisplatin-induced oxidative damage in rats, XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 11-14 September 2016, Ohrid, Republic of Macedonia, p. 84.

ISBN 978-9989-760-13-6

5. **N. Mihović**, S. Matić, S. Stanić, N. Stanković, M. Mladenović, DNA conservation by hesteretin: the mechanism of inhibition of EMS-induced alkylation, 1st Congress of Molecular Biologist of Serbia (CoMBoS), Belgrade 2017, p. 59.

ISBN 978-86-7078-136-8

6. **N. Mihović**, S. Matić, M. Mladenović, N. Stanković, S. Stanić, Rino Ragno, *Salvia sclarea* L. essential oil as possible natural antimicrobial and antigenotoxic agent, 3rd International Conference on Plant Biology (22nd SPPS Meeting), 9-12 June 2018, Belgrade, Serbia, PP4-21.

ISBN 978-86-912591-4-3

7. **N. Mihović**, S. Matić, M. Mladenović, N. Stanković, S. Stanić, Rino Ragno, Antimicrobial and antigenotoxic activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil, 3rd International Conference on Plant Biology (22nd SPPS Meeting), 9-12 June 2018, Belgrade, Serbia, PP4-22.
ISBN 978-86-912591-4-3
8. B. B. Arsić, M. Mladenović, N. Stanković, **N. Mihović**, R. Ragno, A. Regan, J. Milićević, T. M. Trtić Petrović, R. Micić, Selected pesticides as acetylcholine esterase inhibitors: theoretical and experimental studies, 6th Edition of International Conference and Exhibition on Organic Chemistry, 16-17 August 2018, Dublin, Ireland, p 23. Biljana B Arsić et al., J Org Inorg Chem 2018, Volume 4 DOI: 10.21767/2472-1123-C4-011
ISSN 2472-1123
9. **N. Mihović**, S. Matić, J. Muškinja, A. Burmudzija, Z. Ratković, M. Mladenović, N. Stanković, S. Stanić, *In vitro* DNA protective activity of selected pyrazolines. 6th Congress of the Serbian Genetic Society, 13-17 October 2019, Vrnjačka banja, Serbia, 03-07.
ISBN 978-86-87109-15-5
10. **N. Mihović**, S. Matić, J. Muškinja, A. Burmudzija, Z. Ratković, M. Mladenović, N. Stanković, S. Stanić, DNA damage induced by selected pyrazolines in rat liver using comet assay. 6th Congress of the Serbian Genetic Society, 13-17 October 2019, Vrnjačka banja, Serbia, 03-08.
ISBN 978-86-87109-15-5
11. **N. Mihović**, S. Matić, M. Mladenović, N. Stanković, S. Stanić, Rino Ragno, Antimikrobna i antigenotoksična aktivnost etarskog ulja vrste *Anthemis mixta* L., Drugi kongres biologa Srbije (IIKBS), 25-30 Septembar 2018, Kladovo, Srbija, Knjiga sažetaka, str. 74.
ISBN 978-86-81413-08-1
12. **N. Mihović**, S. Matić, M. Mladenović, N. Stanković, S. Stanić, Rino Ragno, *In vitro* antimikrobna i antigenotoksična aktivnost etarskog ulja biljke *Thymus vulgaris* L., Drugi kongres biologa Srbije (IIKBS), 25-30 Septembar 2018, Kladovo, Srbija, Knjiga sažetaka, str. 75.
ISBN 978-86-81413-08-1
13. **N. Mihović**, N. Stanković, M. Mladenović, R. Ragno, 3-D QSAR-driven design of novel coumarin ER α antagonists, Sixth Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade, 27th October 2018, Book of Abstracts, p. 76.
ISBN 978-86-7132-072-6
14. N. Stanković, **N. Mihović**, M. Mladenović, R. Ragno, hDHFR inhibitors: Molecular determinants seen through the structure-based 3-D QSAR, Sixth Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade, 27th October 2018, Book of Abstracts, p. 89.
ISBN 978-86-7132-072-6
15. **N. Kurtanović**, J. J. Ajduković, Andjela A. Franich, Snežana Rajković, DNK interakcije 17-supstituisanih A-modifikovanih androstanskih derivata, 57. Savetovanje Srpskog hemijskog društva (SHD) 18-19 Jun 2021, Kragujevac, Srbija, Knjiga sažetaka, str. 92.
ISBN 978-86-7132-077-1

Дидактичка средства:

Универзитетски уџбеник

др Милан Младеновић, Проф. Rino Ragno, др Невена Станковић, **Незрина Миховић**, маг. хем., РАЦИОНАЛНИ ДИЗАЈН БИОАКТИВНИХ ЈЕДИЊЕЊА: Од теоријског до практичног приступа, 2018. година, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац.

ISBN 978-86-6009-054-8
COBISS.SR-ID 267565580

Уџбеник за основно образовање

1. **Незрина Миховић**, Милош Козић, Невена Томашевић, Драгица Крвавац, Милан Младеновић, Хемија 7, Уџбеник за седми разред основне школе, 2020. година, Издавачка кућа „Klett”, Београд.
ISBN 978-86-533-0396-9
2. Милош Козић, Невена Томашевић, Драгица Крвавац, **Незрина Миховић**, Милан Младеновић, Хемија 7, Лабораторијске вежбе са задацима за седми разред основне школе, 2020. година, Издавачка кућа „Klett”, Београд.
ISBN 978-86-533-0395-2
3. **Незрина Миховић**, Хемија 7, дигитални уџбеник за седми разред основне школе, 2020. година, Издавачка кућа „Klett”, Београд.
4. **Незрина Миховић**, Хемија 7, тестови за седми разред основне школе, 2020. година, Издавачка кућа „Klett”, Београд.
5. **Незрина Миховић**, Приручник за наставнике за седми разред основне школе, 2020. година, Издавачка кућа „Klett”, Београд.
6. **Незрина Кургановић**, Хемија 8, дигитални уџбеник за седми разред основне школе, 2021. година, Издавачка кућа „Klett”, Београд.
7. **Незрина Кургановић**, Хемија 8, тестови за осми разред основне школе, 2021. година, Издавачка кућа „Klett”, Београд.
8. **Незрина Кургановић**, Приручник за наставнике за осми разред основне школе, 2021. година, Издавачка кућа „Klett”, Београд.

Монографије

Незрина Миховић, Динуклеарни комплекси платине(II) са азот-донорским лигандима, 2020. година, „Задужбина Андрејевић ”, Београд.

ISSN 1821-2484
ISBN 978-86-525-0395-7

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Антагонисти естроген рецептора α : Рационални дизајн нових супресаната рака дојке базиран на 3-D QSAR, COMBINE_r и 3-D фармакофорним студијама

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође *потврђујем*:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу _____, 22.06.2022. године,

Незрине Курчић
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

Антагонисти естроген рецептора α : Рационални дизајн нових супресаната рака дојке
базиран на 3-D QSAR, COMBINE_r и 3-D фармакофорним студијама

истоветне.

У Крагујевцу _____, 22.06.2022. године,

Норина Куршановић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Незрина Куртановић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Антагонисти естроген рецептора α : Рационални дизајн нових супресаната рака дојке базиран на 3-D QSAR, COMBINEr и 3-D фармакофорним студијама

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам


не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делим под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делим под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у Крагујевцу _____, 22.06.2022. године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>