

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 28.04.2016. godine imenovana je komisija u sastavu:

1. Prof. dr Zorica Vujić - mentor rada, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. dr sc Katarina Nikolić, docent, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
3. dr sc Lejla Begić, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Tuzli

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Određivanje strukture farmakofore antagonista angiotenzinskih AT1 receptora i hemometrijski pristup optimizaciji HPLC metode za određivanje losartana, valsartana i irbesartana**”, kandidata magistra farmacije Miralema Smajića, uposlenik Ministarstva zdravstva Tuzlanskog kantona (BiH) na poziciju stručnog savjetnika za oblast farmacije. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

1. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija Mag. farm. Miralema Smajića, pod nazivom „**Određivanje strukture farmakofore antagonista angiotenzinskih AT1 receptora i hemometrijski pristup optimizaciji HPLC metode za određivanje losartana, valsartana i irbesartana**”, napisana je na 150 strana, sadrži 90 slika, 48 tabela i 1 prilog. Sastoji se od sledećih poglavlja: Uvod, Cilj rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Reference i Biografija. U doktorskoj disertaciji citirano je 168 literaturnih referenci.

2. Opis postignutih rezultata

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je određivanje strukture farmakofore antagonista angiotenzinskih AT₁ receptora i primena eksperimentalnog dizajna u postupku optimizacije RP-HPLC metode za određivanje losartana, valsartana i irbesartana u komercijalno dostupnim tabletama gde se nalaze u smeši sa hidrohlorotiazidom, odnosno amlodipinom.

Za izvođenje 3D-QSAR studije korišćene su strukture 49 AT₁ blokatora odabranih iz ChEMBL baze podataka, od kojih je 32 služilo kao trening set, a 17 kao test set. Kompjuterskim modeliranjem ispitivanih jedinjenja došlo se do zaključka o tri značajna svojstva strukture: prisustvo karboksilatnog anjona (ili bioizostera) AT₁ blokatora (koji odgovora položaju karboksilata u strukturi angiotenzina II), imidazolni prsten (i njegovi bioizosteri) AT₁ blokatora (koji odgovora položaju imidazolu *His*⁶ rezidue) i *n*-butil grupa AT₁ blokatora (koja odgovora položaju ugljovodoničnog lanca *Ile*⁵ rezidue). Kao mera aktivnosti jedinjenja korišćen je negativni logaritam konstante inhibicije, $pKi = (\log(1/Ki))$. Vrlo širok pKi interval (od 5.328 do 9.538) i homogena distribucija pKi vrednosti u celom opsegu aktivnosti, predstavlja dobre preduslove za formiranje relevantnog 3D-QSAR modela. Najbolji model koji opisuje QSAR AT₁ blokatora je trokomponentni sistem varijabli. Za smanjenje broja varijabli primijenjen je frakcioni faktorski dizajn (FFD) sa ciljem da se kreira model sa optimalnim vrednostima R^2 i Q^2 . Na osnovu dobijenih vrednosti statističkih parametara trening seta ($RMSEE$, R^2 i Q^2 ($RMSEE=0.239$; $R^2=0.978$; $Q^2=0.956$)) odabrana je trokomponentna PLS za buduću studiju farmakofora i dizajn novih AT₁ blokatora. Dobijenim modelom su upoređene eksperimentalno dobijene i predviđene pKi vrednosti. Statistički parametri test seta ($RMSEP=0.288$; $R^2_{\text{Obs. vs. Pred.}}=0.918$; i $Q^2_{\text{test}}=0.843$) su pokazali dobru pouzdanost 3D-QSAR modela. U 3D-QSAR studiji kompjuterskom hemijom su izračunata 3D mesta energetske interakcije (molekulska interakcijska mesta) između ispitivanih molekula i četiri hemijska deskriptora: DRY (koji predstavlja hidrofobnu interakciju), O (sp² karbonilni kiseonik, koji predstavlja donor vodonikove veze), N1 (neutralni NH, kao amid, akceptor vodonikove veze) i TIP (deskriptor molekuskog oblika). Ovi deskriptori objašnjavaju uticaj farmakofore na aktivnost molekule.

Strukturne varijance svih molekula su analizirane metodom analize glavnih komponenti (PCA) na kompletnom setu GRIND deskriptora. Primenom *Pentacle* 1.0.6 programa odabran je tercijerni sistem i 10 najvažnijih varijabli koji utiču na aktivnost AT₁ blokatora. Rezultati

PLS analize dobijenih 3D QSAR modela prikazani su u obliku histograma PLS koeficijenta koji olakšavaju detekciju najuticajnijih varijabli i opisivanje farmakofornih karakteristika. Apscisa je podeljena na delove koji reprezentuju autokorelograme (DRY-DRY; O-O; N1-N1; TIP-TIP) i kroskorelograme (DRY-O; DRY-N1; DRY-TIP; O-N1; O-TIP; N1-TIP) na kojima se mogu uočiti varijable koje pozitivno, odnosno negativno korelišu sa aktivnošću molekula. Varijable za koje je utvrđeno da pozitivno utiču na aktivnost blokatora AT₁ receptora su:

- V732 (O-TIP), V739 (O-TIP), V763 (O-TIP)- povećanje rastojanja između donora H veze, N-grupe tetrazola i bifenila, fenila ili alifatičnog lanca daje pozitivan doprinos *pKi* vrednostima;
- V37 (DRY-DRY)- Optimalno rastojanje dva hidrofobna bifenila, fenil ili alifatične grupe;
- V597 (DRY-TIP)- Isti doprinos kao i kod DRY-DRY korelograma, pozitivan uticaj na vrednost *pKi*;
- V300 (TIP-TIP) i V307 (TIP-TIP)-optimalno rastojanje između dva hiralna centra.

Varijable koje negativno utiču na aktivnost AT₁ blokatora su:

- V868 (N1-TIP)- Akceptor vodonične veze, tetrazolna N-grupa ili O-most, udaljen od hiralnog C atoma;
- V46 (DRY-DRY)- Rastojanje koje razdvaja hidrofobni oblak fenil, bifenil ili alifatični lanac;
- V224 (N1-N1)-Predstavlja rastojanje između dva akceptora vodika, tetrazolnog N ili karboskilne grupe u molekuli.

Sve specifične GRID varijable sa pozitivnim uticajem na aktivnost pokazuju da je optimalna udaljenost između tetrazola i bifenilne/fenilne gustine, kao i između bifenile/fenilne gustine i alifatičnog lanca neophodna za aktivnost AT₁ blokatora. Dalja strukturna modifikacija bazirana je na povećavanju vrednosti varijabli koje imaju pozitivan uticaj na aktivnost. Za dizajniranje novih jedinjenja odabrana su dva jedinjenja trening seta koja su pokazala najbolju aktivnost: ChEMBL 1513 i ChEMBL 92950. Od polaznih jedinjenja za modeliranje i dizajniranje izvedeno je 30 novih molekula. *pKi* vrednost novih 30 molekula je dobijena primenom validiranog 3D-QSAR modela. Na osnovu izvedene studije zaključeno je da aktivnost molekule raste ako je ciklopropil grupa vezana za ugljenik pozicioniran između dva azota u imidazolnom prstenu. Vezivanje alkilnog lanca sa karbonilnom grupom za isto mesto pozitivno doprinosi aktivnosti molekule.

Prisustvo nekoliko funkcionalnih grupa u molekularnoj strukturi ispitivanih blokatora angiotenzinskih receptora kao što su bifenilna i imidazol čini RP-HPLC metodu pogodnom za određivanje njihovog sadržaja u farmaceutskim oblicima. Pre izvođenja analize određen je profil jonozacije u zavisnosti od pH za sva ispitivana jedinjenja. Na osnovu hemijske strukture utvrđen je broj akceptora protona i proton donorskih grupa kako bi se definisali preliminarni uslovi eksperimentalnog rada. Za razvoj i optimizaciju HPLC metode primenjena je metodologija eksperimentalnog dizajna. U radu su korišćeni puni faktorski dizajn (FFD) i metoda površine odgovora (RSM). Faktorskim dizajnom određeni su faktori koji imaju najznačajniji efekat na posmatrane odgovore sistema, dok je metodologija površine odgovora korišćena da bi se pronašao opseg u kome se javljaju optimalni rezultati ispitivanja. Na temelju preliminarnih istraživanja odabrana su tri faktora, nezavisne varijable, čiji je uticaj ispitivan: sadržaj metanola u mobilnoj fazi, pH mobilne faze i temperatura kolone (kod analize irbesartana i hidrohlorotiazida i kod analize smeše valsartana, amlodipina i hidrohlorotiazida) dok su za dizajn eksperimenta analize losartana i hidrohlorotiazida odabrani: % metanola u mobilnoj fazi, pH mobilne faze i protok mobilne faze. Ispitivani faktori su varirani na dva nivoa, sa ponavljanjem eksperimenta u centralnoj tački.

Kao zavisne varijable koje su praćene tokom eksperimenta izabrani su hromatografski parametri koji karakterišu dobru rezoluciju ispitivanih jedinjenja i koji određuju dužinu trajanja analitičkog postupka, što je važno sa praktične tačke gledišta. Izabrane zavisno promenljive veličine su: faktor rezolucije binarnih smeša (irbesartana i hidrohlorotiazida; losartana i hidrohlorotiazida), simetrija pika i retencija irbesartana, losartana i hidrohlorotiazida. Kao zavisne varijable kod analize valsartana, amlodipina i hidrohlorotiazida praćeno je osam odgovora sistema: retenciono vreme hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana, simetrija pika hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana i rezolucija amlodipina i valsartan.

Za optimizaciju HPLC metode razdvajanja irbesartana i hidrohlorotiazida, i losartana i hidrohlorotiazida korišćen je 2^3 puni faktorski dizajn, dok je za optimizaciju HPLC metode za razdvajanje valsartana, hidrohlorotiazida i amlodipina korišćen centralni kompozitni dizajn. Statistička značajnost posmatranih faktora i dobijenih regresionih modela je testirana primenom ANOVA testa i procenjena na osnovu vrednosti p , R^2 i Fisher-ovog F testa.

Za istovremenu optimizaciju više nezavisno promenljivih veličina prema većem broju posmatranih odgovora korišćena je Derringer-ova funkcija poželjnih odgovora koja

transformiše različite karakteristike sistema u jedan jedinstveni cilj. Nakon definisanja ukupnog cilja poželjnosti u skladu sa postojećim eksperimentalnim uslovima, postignuti su optimalni hromatografski uslovi za razdvajanje supstanci. Zamenom kodiranih vrednosti dobijene su vrednosti ispitivanih faktora koje daju najvišu vrednost globalne funkcije poželjnih odgovora. Optimalni uslovi analize smeše irbesartana i hidrohlorotiazida su: 47 % metanola, pH mobilne faze 6.5 i temperatura kolone 25 °C. Najbolji eksperimentalni uslovi hromatografskog određivanja losartana i hidrohlorotiazida su postignuti korišćenjem mobilne faze pH 4,8 koja sadrži 45 % metanola, pri protoku od 0.82 mL/min i temperaturi kolone od 25 °C. Optimalni uslovi za izvođenje hromatografskog određivanja valsartana, amlodipina i hidrohlorotiazida postignuti su sa mobilnom fazom pH 3,5 koja sadrži 40 % metanola i pri temperaturi kolone od 40 °C. Za svaku od izvedenih metoda optimizacije model je pokazao dobru predvidljivost, jer vrednosti predviđene modelom pri zadatim uslovima odgovaraju eksperimentalno dobijenim vrijednostima, bez statistički značajne razlike.

Predložene RP-HPLC metode su validirane čime je dokazano da su specifične, tačne, precizne i ponovljive. Izvođenje metoda ne zahteva složene postupke ekstrakcije, brze su i jednostavne za izvođenje i mogu biti korišćene za rutinsku kvantitativnu analizu ispitivanih supstanci u smeši ili za njihovo pojedinačno određivanje u farmaceutskim doziranim oblicima.

3. Uporedna analiza rezultata doktorske disertacije sa podacima iz literature

Antagonisti angiotenzin II receptora (*sartani*) predstavljaju dobro poznatu klasu lekova koja se upotrebljava u terapiji od ranih 1980-ih. Indikacija za primenu ovih jedinjenja je terapija blage do umerene hipertenzije, hroničnog zatajenja srca, sekundarna prevencija moždanih udara i dijabetičke nefropatije [1,2]. Koriste se samostalno ili u kombinaciji sa drugim antihipertenzivima ili diureticima [3]. Pored efekta snižavanja pritiska, AT₁ blokatori pokazuju efekat zaštite krvnih sudova i miokarda, promovišu regresiju leve ventrikularne hipertrofije i smanjuju kardiovaskularni morbiditet i mortalitet kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom ili hipertenzivnom dijabetičkom nefropatijom sa proteinurijom [4]. Blokatorima AT₁ receptora pripadaju losartan, valsartan, irbesartan, kandesartan, eprosartan, telmisartan i olmesartan. Sva jedinjenja ove grupe imaju sličnu hemijsku strukturu koju karakteriše prisustvo bifenila sa kiselom funkcionalnom grupom (karboksilna ili tetrazol) [0].

Osamdesetih godina prošlog veka javlja se značajan napredak u molekularnoj biologiji [6], teorijskoj i eksperimentalnoj hemiji i kompjuterskoj tehnologiji što je omogućilo sintezu i ispitivanje biološke aktivnosti novih lekova. Ispitivanje korelacije molekulskih parametara koji se odnose na hemijsku strukturu i fizičko-hemijske osobine molekula i njihove biološke i farmakološke aktivnosti daje mogućnost predviđanja strukturnih promena molekula sa boljim farmakodinamskim i farmakokinetičkim osobinama u lečenju određenog oboljenja [7]. Najznačajniji pomak u brzom predviđanju uticaja promena strukture dala je upotreba kompjuterskih metoda u dizajniranju lekova (*Computer-Aided Drug Design, CADD*) i mogućnost optimizacije osobina [8]. Za definisanje veze između hemijske strukture i biološke aktivnosti (QSAR) u medicinskoj hemiji koriste se molekulski deskriptori [9,10]. Primenom kompjuterske hemije moguće je izračunati veliki broj molekulskih deskriptora koji su važni pokazatelji osobina ispitivanih jedinjenja.

Metoda uklapanja (molekulski *docking*) predstavlja kompjutersku simulaciju interakcije između receptora ili neke proteinske makromolekule (čija je kristalografska struktura poznata) i ispitivanog liganda [11-13]. U literaturi je opisano nekoliko radova u kojima su *docking* studije korišćene za proučavanje vezivanja antagonista angiotenzin II receptora za serumske albumine [14], razumevanje strukture AT₁ receptora [15] i interakcije sartana sa AT₁

receptorom [16,17]. Iako se najveći broj publikovanih radova odnosi na QSAR studije blokatora AT₁ receptora [18,19,20] pažnju naučne zajednice sve više privlači značaj i fiziološka uloga AT₂ receptora [21]. Wan i saradnici su objavili dizajn, sintezu i strukturu prvog selektivnog nepeptidnog agonistu AT₂ receptora [22] dok su Kellici i saradnici ispitivali ligande koji pokazuju selektivno delovanje na angiotenzinske receptore [23].

Novije studije su pokazale da ova dva receptora pored poznate uloge u regulisanju i hemodinamici krvnog pritiska, aktivno učestvuju u brojnim drugim procesima. Na primer, uloga AT₁ receptora u starenju sugerise da bi antagonisti ovog receptora bili korisni u produženju života [24]. Takođe, publikovani su radovi u kojima se navodi da su antagonisti AT₁ receptora efikasni u lečenju inflamacije, autoimunih reumatskih oboljenja [25] i tumora [26]. Takođe, podaci iz literature govore da je u slučajevima oštećenja tkiva (poput infarkta miokarda, ishemije mozga, neuronskih i vaskularni povreda) AT₂ receptor ushodno regulisan čime se naglašava terapijski potencijal ovog receptora u zaštiti i regeneraciji tkiva kroz regulisanje zapaljenja, fibroze i apoptoze [27].

Pretraživanje literature je pokazalo da postoji niz HPTLC [28-31], spektrofotometrijskih [02], spektrofluorimetrijskih [33,34], voltometrijskih [35] metoda kao i metoda kapilarne zonske elektroforeze [36], HPLC [37,38] i LC-MS [39,40] za određivanje antagonista AT₁ receptora, pojedinačno ili u kombinaciji sa diureticima. Opisano je određivanje irbesartana i hidrohlorotiazida u tabletama HPTLC metodom [41,42], spktrofotometrijski [43] kao i primena LC-MS/MS u farmakokinetičkim studijama irbesartana [44]. Losartan je različitim instrumentalnim metodama odredivan u tabletama [45], u kombinaciji sa atenololom [46], hidrohlorotiazidom [47], triamterenom [48] i omeprazolom [49]. Publikovane su i metode za određivanje losartana u biološkom materijalu [50].

Postojeći vodiči za tretman hipertenzije naglašavaju potrebu višestruke medikacije kako bi se kod većine pacijenata postigao željeni krvni pritisak. Kombinovana terapija podrazumeva uzimanje 2 do 3 antihipertenziva različitog mehanizma delovanja što povećava rizik od smanjenja komplijanse u terapiji. Napredak u terapiji je razvoj trostruke kombinacije lekova koja se sastoji od blokatora AT₁ receptora (valsartan), antagoniste kalcijumskih kanala (amlodipina) i diuretika (hidrohlorotiazida). U literaturi je opisano određivanje binarne smeše koju čini amlodipin i valsartan u doziranim oblicima i humanoj plazmi [51] kao i spektrofotometrijsko određivanje amlodipina, valsartana i hidrohlorotiazida [52]. Pregled

literature daje samo jedan rad u kome je primenjena HPLC metoda za istovremeno određivanje sva tri jedinjenja u humanoj plazmi [53]. Nijedan od postojećih publikovanih radova ne opisuje HPLC metodu za istovremeno određivanje sve tri supstance u čvrstoj doziranoj formi uz primenu eksperimentalnog dizajna.

Eksperimentalni dizajn omogućava pripremu eksperimenata po određenom statističkom modelu i istovremenu promenu svih faktora koji su od značaja za određivanje. Na ovaj način moguće je definisati eksperimentalne uslove pri kojima se postiže optimum čime se može poboljšati razdvajanje, selektivnost, osetljivost i specifičnost metode [54]. Na osnovu malog broja dobro isplaniranih eksperimenata, uz hemometrijski pristup koji koristi matematičke i statističke tehnike, moguće je detaljno opisati hromatografsko ponašanje sistema. Dalji proces optimizacije vrši se teorijskim pretraživanjem eksperimentalnog prostora, bez izvođenja novih eksperimenata [55].

U literaturi je opisan veliki broj radova u kojima je korišćen hemometrijski pristup u planiranju i dizajniranju eksperimenata [56]. Eksperimentalni dizajn daje informacije o ključnim parametrima procesa, smanjuje njegovu varijabilnost, poboljšava kvalitet istraživanja i primenljiv je na sve instrumentalne metode [57] i u određivanju različitih jedinjenja [58, 59]. Pretraživanjem dostupne literature nisu nađeni radovi u kojima je korišćen hemometrijski pristup u procesu optimizacije RP-HPLC metode za određivanje blokatora AT₁ receptora u čvrstim doziranim oblicima.

Citirana relevantna literatura

1. Lullmann H., et al. Color atlas of pharmacology, 2nd ed. Thieme, 2000: 125
2. Ritter M.J., et al., A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics. 5th ed., Hodden Ed., 2008: 188-189
3. David H.G. Smith, Comparison of Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonists in the Treatment of Essential Hypertension. *Drugs*, 2008; 68 (9): 1207-1225
4. De Gasparo M, Catt KJ, Ingami T, Wright JW, Unger TH. The Angiotensin II receptors. *International Union of Pharmacology XXIII. Pharmacolog Reviews* 2000; 52: 415-472.
5. The Gale Encyclopedia of Medicine, 3rd ed. Gale Group, 2006; 315-316
6. Cohen CN, The Molecular Modeling Perspective in Drug Design, In: *Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design*, ed. Cohen CN, San Diego, California, Academic Press Inc. 1996;1-17.
7. Leacha R, Gillet VJ, Lewis RA, Taylor R., Three-Dimensional Pharmacophore Methods in Drug Discovery. *J.Med:Chem.* 2010; 53(2):539-558.
8. Cohen CN, The Molecular Modeling Perspective in Drug Design, In: *Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design*, ed. Cohen CN, San Diego, California, Academic Press Inc. 1996;1-17.
9. Todeschini R, Consonni V. *Handbook of Molecular Descriptors. Methods and Principles in Medicinal chemistry.* Wiley-VCH, Weinheim (2000).
10. Consonni V, Todeschini R. *Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications. Molecular descriptors.* Springer. New York, USA (2009).
11. Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins.* 2006; 65(1):15-26.
12. Taylor RD, Jewsbury PJ, Essex JW, A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput.Aided Mol.Des.* 2002;16:151-166.
13. Guvench O, MacKerell Jr AD. Computational evaluation of protein-small molecule binding. *Curr. Opin Struct Biol.* 2009; 9(1): 56-61.
14. Li J, Zhu X, Yang C, Shi R. Characterization of the binding of angiotensin II receptor blockers to human serum albumin using docking and molecular dynamics simulation. *J. Mol. Model.* 2010; 16(4): 789-98

15. A Parate A A. Study of Binding Site for Losartan and Irbesartan As Angiotensin II Receptor Antagonists as Antihypertensive Agents - Part I. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2014; 5(1): 1117-1134.
16. Matsoukas M-T, Cordero A, Ríos S, Pardo L, Tselios T. Ligand Binding Determinants for Angiotensin II Type 1 Receptor from Computer Simulations. J. Chem. Inf. Model. 2013; 53: 2874–2883
17. Tuccinardi T, Martinelli A. Computational approaches on angiotensin receptors and their ligands: recent developments and results. Curr Med Chem 2007;14 (29):3105-3121.
18. Zhou YP, Cai CB, Huan S, Jiang JH, Wu HL, Shen GL, Yu RQ. QSAR study of angiotensin II antagonists using robust boosting partial least squares regression. Anal Chim Acta. 2007; 593(1):68-74.
19. Sharma M.C, Kohli D.V.3D QSAR Studies of Some Substituted Imidazolinones Derivatives Angiotensin II Receptor Antagonist. World Applied Sciences Journal. 2011; 12(11): 2129-2134
20. Vyas VK, Ghate M, Chintha C, Patel P. 3D QSAR studies on substituted benzimidazole derivatives as angiotensin II-AT1 receptor antagonist. Curr Comput Aided Drug Des. 2013; 9(3): 433-45.
21. Whitebread SE, Taylor V, Bottari SP, Kamber B, de Gasparo M. Radioiodinated CGP 42112A: a novel high affinity and highly selective ligand for the characterization of angiotensin AT2 receptors. Biochem Biophys Res Commun. 1991;181(3):1365-71.
22. Wan Y, Wallinder C , Plouffe B , Beaudry H , Mahalingam A.K. , Wu X , Johansson B , Holm M, Botoros M , Karlén A , Pettersson A, Nyberg F , Fändriks L , Gallo-Payet N , Hallberg A , Alterman M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of the First Selective Nonpeptide AT₂ Receptor Agonist. J. Med. Chem., 2004; 47 (24): 5995–6008
23. Kellici T, Tzakos G.A, Mavromoustakos. Rational Drug Design and Synthesis of Molecules Targeting the Angiotensin II Type 1 and Type 2 Receptors. Molecules. 2015; 20 (3): 3868-3897
24. Stegbauer J, Coffman TM. New insights into angiotensin receptor actions: from blood pressure to aging. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2011; 20(1):84-8.

25. Chang Y, Wei W. Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis. *Clinical & Experimental Immunology*. 2015; 179(2): 137-145.
26. Kim S, Toyokawa H, Yamao J, Satoi S, Yanagimoto H, Yamamoto T, Hirooka S, Yamaki S, Inoue K, Matsui Y, Kwon AH. Antitumor effect of angiotensin II type 1 receptor blocker losartan for orthotopic rat pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2014; 43(6):886-90.
27. Namsolleck P, Recarti C, Foulquier S, Steckelings U.M, Unger T. AT₂ Receptor and Tissue Injury: Therapeutic Implications. *Current Hypertension Reports*. 2014; 16: 416
28. Shanmugasundaram, P.; Malarkodi, V.; Validated HPTLC method for simultaneous estimation of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in a tablet dosage form. *Der Pharma Chemica*. 2011; 3 (5): 310-317.
29. Shah, N.J., Suhagia, B.N.; Shah, R.R.; Patel, N.M.; Development and validation of a HPTLC method for the simultaneous estimation of irbesartan and hydrochlorothiazide in tablet dosage form. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007; 69 (2): 240-243.
30. Amol, S. K.; Laxman, V. P.; Mrinalini. C. D.; Kailash, G. B.; A validated stability indicating HPTLC method for simultaneous estimation of irbesartan and hydrochlorothiazide. *Pharmaceutical Methods*. 2010; 1(1): 39-43.
31. Mehta, B.H.; Morge, S.B.; Simultaneous Determination of Irbesartan and Hydrochlorothiazide by HPTLC method. *Indian Drugs*; 2010: 47, 71-74.
32. Patel, K.R.; Patel, S.A.; Darji, V.C.; Sonpal, R.N.; Simultaneous Spectrophotometric Determination of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in tablets. *International Research Journal of Pharmacy*. 2011; 2(3): 202-207.
33. Farouk, M.; Abd Elaziz, O.; Hemdan, A.; Shehata, M.; Spectrofluorimetric Methods for Determination of Some Anti-hypertensive Drugs. *Journal of American Science*. 2011; 7(1): 300-312.
34. Ramzia, I.; El-Bagary, Hanaa, M. H.; Waleed, A. E.; Spectrofluorometric, Spectrophotometric and LC Determination of Irbesartan, *J. Chem. Pharm. Re*. 2011; 3(4): 722-733.
35. Burçin, B.; Burcu, D. T.; Bengi, U.; Sibel, A. Ö.; Hassan, Y. A-E.; Quantitative Analysis of Irbesartan in Pharmaceuticals and Human Biological Fluids by Voltammetry. *Analytical Letters*. 2009; 42: 2322-2338.
36. Hillaert, S.; Van den Bossche, W.; Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2003; 31(2): 329-339.

37. Farouk, M.; Abd ELAziz, O.; Hemdan, A.; Shehata, M.; Novel Validated Chromatographic Method for Determination of Some Anti-hypertensive Drugs. *Journal of American Science*. 2010; 6(11): 476-486.
38. Gonzalez, L.; Lopez, J.A.; Alonso, R.M.; Jimenez, R.M.; Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr A*. 2002; 949 (1-2): 49-60
39. Ganesan, M.; Nanjundan, S.; Gomathi, M.; Muralidharan, S.; Method development and validation of Irbesartan using LCMS/MS: Application to pharmacokinetic studies. *J. Chem. Pharm. Res*. 2010; 2(4): 740-746.
40. Tutunji, L.F.; Tutunji, M.F.; Alzoubi, M.I.; Khabbas, M.H.; Arida, A.I.; Simultaneous determination of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC coupled with tandem mass spectroscopy, application to bioequivalence study. *J Pharm Biomed Anal*. 2010; 51: 985-990.
41. Rosangluaia, Shanmugasundaram P., Malarkodi V. Validated HPTLC method for simultaneous estimation of irbesartan and hydrochlorothiazide in a tablet dosage form. *Der Pharm. Chem*. 2011; 3: 310–317.
42. Shah N.J., Suhagia B.N., Shah R.R., Patel N.M. Development and validation of a HPTLC method for the simultaneous estimation of irbesartan and hydrochlorothiazide in tablet dosageform. *Indian J. Pharm. Sci*. 2007; 69: 240–243.
43. Patel K.R., Patel S.A., Darji V.C., Sonpal R.N. Simultaneous spectrophotometric determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in tablets. *Int. Res. J. Pharm*. 2011; 2: 202–207.
44. Ganesan M., Nanjundan S., Gomathi M., Muralidharan S. Method development and validation of Irbesartan using LCMS/MS: Application to pharmacokinetic studies. *J. Chem. Pharm. Res*. 2010; 2: 740–746.
45. Ulu ST, Saglik S. Comparison of UV and Second derivative spectrophotometric and HPLC methods for the determination of Losartan in tablets. *Turk J Pharm Sci*. 2004; 1: 165-75.
46. Sivakumar T, Venkatesan P, Manavalan R, Valliappan K. Development of a HPLC method for the simultaneous determination of Losartan potassium and Atenolol in tablets, *Indian J Pharm Sci* 2007; 69:154-57.

47. Quaglia MG, Donati E, Carlucci G, Mazzeo P, Fanali S. Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 29 (6): 981-7.
48. Ensafi AA, Hajian R. Determination of Losartan and Triamterene in Pharmaceutical Compounds and Urine Using Cathodic Adsorptive Stripping Voltammetry, *Anal Sci* 2008; 24(11): 1449-54.
49. Ahmed SS, Karajgi SR, Simpi CC, Sonawane S, Kalyane NV. Visible spectrophotometric methods for the estimation of losartan potassium and omeprazole in single component pharmaceutical formulations, *International Journal of Pharmtech Research* 2009; 11247-1250.
50. Polinko M, Riffel K, Song H, Lo M. Simultaneous determination of losartan and EXP3174 in human plasma and urine utilizing liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharma and Biomed Anal* 2003; 33: 73- 84.
51. A.O. Alnajar. Validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of amlodipine besylate and valsartan in pharmaceuticals and human plasma. *J AOAC Int.* 2011; 94: 498.
52. V.R. Galande, K.G Baheti, S. Indraksha, M.H. Dehghan. Estimation of Amlodipine Besylate, Valsartan and Hydrochlorothiazide in Bulk Mixture and Tablet by UV Spectrophotometry. *Indian J Pharm Sci.* 2012; 74: 18.
53. R.N. Sharma, S.S. Pancholi. Simple RP-HPLC method for determination of triple drug combination of valsartan, amlodipine and hydrochlorothiazide in human plasma. *Acta Pharm.* 2012; 62: 45.
54. Mason R, Gunst R, Hess J, *Statistical design and analysis of experiments*, John Wiley & Sons Inc., NJ, USA, 2003.
55. Armstrong NA, *Pharmaceutical experimental design and interpretation*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2006.
56. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta.* 2008; 76: 965–977.
57. Preu M, Guyot D, Petz M, Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions, *J Chromatogr A.* 1998; 818: 95–108.

58. Barmapalexis P, Kanaze FI, Georgarakis E, Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology, *J Pharm Biomed Anal.* 2009; 49: 1192–1202.
59. Ficarra R, Calabro ML, Cutroneo P, Tommasini S, Melardi S, Semreen M, Furlanetto S, Ficarra P, Altavilla G, Validation of a LC method for the analysis of oxaliplatin in a pharmaceutical formulation using an experimental design, *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 29: 1097–1103.
60. Howard, A. D. et al. Orphan G protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001; 22: 132–140.
61. Rana, B. K., Shiina, T. & Insel, P. A. Genetic variations and polymorphisms of G protein-coupled receptors: functional and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011; 41: 593–624.
62. Bailey, W. J. et al. Patent status of therapeutically important G protein-coupled receptors. *Expert Opin. Ther. Patents.* 2011; 11: 1861–1887.
63. Doménech M., Coca A. Role of triple fixed combination valsartan, amlodipine and hydrochlorothiazide in controlling blood pressure. *Patient Prefer Adherence.* 2010; 4: 105–113.

4. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije

1. **Miralem Smajić**, Katarina Nikolić, Zorica Vujić, Lejla Ahmetović and Vesna Kuntić, 3D-*QSAR* studies and pharmacophore identification of AT1 receptor antagonists, Medicinal Chemistry Research (2016) 25 (1), 51-61 **M23**

2. **Miralem Smajić**, Zorica Vujić, Nedžad Mulavdić, Jasmina Brborić; An Improved HPLC Method for Simultaneous Analysis of Losartan Potassium and Hydrochlorothiazide with the Aid of a Chemometric Protocol, Chromatographia, April 2013, Volume 76, Issue 7, pp 419-425 **M23**

2. Zorica Vujić, Nedžad Mulavdić, **Miralem Smajić**, Jasmina Brborić, Predrag Stanković; Simultaneous Analysis of Irbesartan and Hydrochlorothiazide: An Improved HPLC Method with the Aid of a Chemometric Protocol; Molecules 2012, 17(3) **M22**

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja:

1. **Miralem Smajić**, Nedžad Mulavdić, Zorica Vujić; Primjena faktorskog dizajna u optimizaciji izokratske HPLC metode za određivanje irbesartana i hidrohlorotiazida; Drugi kongres farmaceuta BiH sa međunarodnim učešćem, Novembar 17-20, 2011, Banja Luka, BIH.

2. **M. Smajić**, K. Nikolić, Z. Vujić, Determination of Pharmacophore and 3D *QSAR* Studies of AT1 Receptor Antagonists; VI Sebian Congress of Pharmacy; 2014, Beograd, Srbija.

5. Obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije su novi lekovi koji se u terapiji hipertenzije nalaze poslednjih 20 godina i čije otkriće je vezano za kompjutersko modelovanje. Otkriću blokatora angiotenzinskih receptora prethodilo je bolje razumevanje uloge i značaja renin-angiotenzin sistema (RAS).

Sve do sredine 1950-ih godina nije bila poznata uloga renina i angiotenzina i vladalo je mišljenje da ovaj sistem ima značaj samo u razvoju maligne hipertenzije. 1968. godine otkriveno je da otrov jedne vrste Brazilske zmijske izaziva hipotenziju tako što inhibira angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) koji učestvuje u sintezi angiotenzina II iz angiotenzina I. Otkriće kaptoprila 1981. godine, prvog inhibitora angiotenzin-konvertujućeg enzima je bio veliki napredak u lečenju kardiovaskularnih bolesti.

Napori za razvijanje antagonista AT₁ receptora su počeli 70-ih godina prošlog veka ispitivanjem peptidnih analoga prirodnih agonista. Ovo istraživanje je rezultiralo otkrićem saralazina, oktapeptida u kome su Asp¹, Ile⁵ i Phe⁸ (ostaci angiotenzina II) zamenjeni Ser¹, Val⁵ i Ala⁸. Saralazin je pokazivao hipotenzivni efekat, ali je imao malu bioraspoloživost nakon *per os* primene, kratko vreme delovanja, parcijalnu agonističku aktivnost i nije bio pogodan kao lek. Prva jedinjenja bez sporedne agonističke aktivnosti koja su pokazivala selektivnu i kompetitivnu blokadu AT₁ receptora bili su derivati imidazol-5-sirćetne kiseline: S-8307 i S-8308. Ova dva nepeptidna jedinjenja su poslužila kao *lead* molekule za dalju optimizaciju strukture. Kompjuterskim preklapanjem struktura S-8307 i S-8308 i angiotenzina II (Ang II) zaključeno je da se na N-terminalnom kraju Ang II nalaze dve kisele funkcionalne grupe. Sintetisano 4-karboksi jedinjenje je pokazivalo 10 puta veću aktivnost u odnosu na S-8308. Zamenom 4-karboksi grupe sa 2-karboksi dobijen je antagonist koji je pokazivao delovanje samo nakon *iv* primene. Uvođenjem 2-karboksi-benzamido grupe povećana je lipofilnost jedinjenja i bioraspoloživost nakon *per os* primene, ali je smanjen afinitet za AT₁ receptor. Zamenom polarne karboksilne grupe lipofilnijom tetrazolom dobijen je losartan, prvi efikasan antagonist Ang II receptora koji se u terapiji nalazi od 1995. godine. Daljom optimizacijom strukture *lead* jedinjenja dobijeni su drugi antagonisti Ang II receptora. Put razvoja prvih lekova ove grupe nedvosmisleno ukazuje na značaj kompjuterskog modelovanja i racionalnog dizajniranja i otvara mogućnost daljeg istraživanja veze strukture i dejstva. U ovoj doktorskoj disertaciji izvedena je 3D QSAR studija, određena farmakofora antagonista AT₁ receptora i predložena struktura novih, potencijalno aktivnih jedinjenja.

Naučni doprinos doktorske disertacije se ogleda u istraživanju interakcija koje ostvaruju ispitivana jedinjenja sa receptorom. Angiotenzin II receptori su članovi superfamilije G-protein vezanih membranskih receptora. G-protein vezani receptori (GPCR) su najbrojnija klasa membranskih ćelijskih receptora, koji su kodirani sa preko 1.000 gena u ljudskom genomu [60]. GPCR receptori se aktiviraju raznim ligandima uključujući hormone, peptide, aminokiseline, jone, fotone svetlosti. Mutacije i polimorfizmi u GPCR receptorima vezani su za brojne bolesti i poremećaje [61] pa su GPCR ciljno mesto delovanja velikog broja terapijskih agenasa. Skoro jedna četvrtina od 200 najprodavanijih lijekova u 2000. godini i oko 50 % novosintetisanih lekova deluje tako što modulira aktivnost GPCR [62].

Do danas su identifikovana 4 podtipa angiotenzinskih receptora: AT₁, AT₂, AT₃ i AT₄. AT₁ receptori posreduju u skoro svim poznatim fiziološkim delovanjima angiotenzina II u kardiovaskularnim, bubrežnim, nervnim, endokrinim ćelijama, jetrenim i drugim ciljnim ćelijama. AT₂ receptori se nalaze u srži nadbubrežne žlezde, materici i u tkivu fetusa. Pretpostavlja se da ovi receptori igraju ulogu u razvoju fetusa i nisu bitnije uključeni u kontrolu krvnog pritiska. AT₁ i AT₂ receptori pokazuju oko 30 % sličnost u sekvenci i sličan afinitet za Ang II. AT₃ i AT₄ receptori još uvek nisu dobro okarakterisani; pretpostavlja se da je ovaj receptor mesto delovanja angiotenzina IV (metabolit Ang II) i ima ulogu u CNS i oslobađanju oksitocina. Značaj poznavanja angiotenzinskih receptora se ogleda u novijim istraživanjima koja navode da su antagonisti AT₁ receptora potencijalno efikasni u lečenju inflamacije, autoimunih reumatskih oboljenja i tumora kao i da AT₂ receptori imaju ulogu u zaštiti i regeneraciji tkiva regulisanjem zapaljenja, fibroze i apoptoze.

Doprinos doktorske disertacije se ogleda u primeni hemometrije i metodologije eksperimentalnog dizajna u razvoju i optimizaciji HPLC metode za određivanje antagonista ANG II receptora. Brz tehnološki razvoj, posebno u oblasti kompjuterizovanih instrumenata omogućio je značajan napredak u oblasti hemometrije u poslednjih tridesetak godina. Najveći broj hemijskih eksperimenata karakteriše multivarijantnost, što znači da na jednu pojavu (zavisno promenljivu) utiče veći broj faktora (nezavisno promenljivih). Tradicionalni pristup eksperimentu je univarijantan, odnosno posmatra se uticaj samo jedne varijable na posmatrani odgovor sistema dok se ostale varijable održavaju na definisanom, konstantnom nivou; na ovaj način se zanemaruju korelacije koje postoje između varijabli. Upotreba eksperimentalnog dizajna omogućava pripremu eksperimenata po određenom statističkom modelu i istovremenu promenu svih faktora koji su od značaja za određivanje. Na ovaj način moguće je definisati eksperimentalne parametre pri kojima se postižu optimalni uslovi ispitivanja i određivanja. U

radu su korišćeni puni *screening* dizajn i metoda površine odgovora. *Screening* dizajnom određeni su faktori koji imaju najznačajniji efekat na posmatrane odgovore sistema dok je metodologija površine odgovora korišćena da bi se pronašao opseg u kome se javljaju optimalni rezultati ispitivanja.

Optimizovane i validirane HPLC metode su primenjene za određivanje binarnih smeša antagonista Ang II receptora: irbesartana i hidrohloriazida; losartana i hidrohloriazida kao i smeše koja sadrži valsartan, amlodipin i hidrohloriazid. U poslednjih nekoliko godina došlo je do značajnog porasta korišćenja kombinacija antihipertenzivnih lekova sa komplementarnim mehanizmima delovanja sa ciljem efikasnijeg smanjenja krvnog pritiska u odnosu na primenu monoterapije. Smernica od 2009. godine Evropskog udruženja za hipertenziju preporučuje korišćenje trostruke kombinacije antihipertenziva koju čine blokator kalcijumovih kanala, antagonista angiotenzin II receptora i tiazidni diuretik kod hipertenzivnih pacijenata sa umerenim, visokim ili vrlo visokim rizikom. Sprovedene kliničke studije su pokazale prednost primene trostruke kombinacije lekova, veću adherencu i komlijansu u odnosu na monoterapiju ili dvostruku kombinaciju [63].

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije mogu se sprovesti dalja istraživanja, usmerena ka studijama odnosa strukture i farmakokinetičkih i farmakodinamičkih karakteristika jedinjenja koja su pokazala najveću aktivnost.

6. Zaključak i predlog Komisije

Nakon pregleda dostavljene teze Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije je konstatovala da je istraživanje u okviru odobrene teme adekvatno postavljeno, precizno sprovedeno i da je zasnovano na savremenim saznanjima i validnoj metodologiji. Kandidat, magistar farmacije Miralem Smajić uspešno je ostvario postavljene ciljeve, dobijeni rezultati su pregledni, jasni i dobro prodiskutovani, što je dokumentovano objavljivanjem 2 rada u časopisima od međunarodnog značaja (M23), 1 rada u vodećem međunarodnom časopisu (M22) i 2 rada saopštena na skupovima međunarodnog značaja. Komisija je zaključila da rezultati istraživanja pružaju originalan i značajan naučni doprinos u oblasti Farmaceutska medicinska hemija i strukturna analiza.

Uzimajući u obzir izloženo, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan Izveštaj Komisije i uputi Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Određivanje strukture farmakofore antagonista angiotenzinskih AT₁ receptora i hemometrijski pristup optimizaciji HPLC metode za određivanje losartana, valsartana i irbesartana”,

Prof. dr Zorica Vujić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu –
Farmaceutski fakultet

dr sc Katarina Nikolić, docent,
Univerzitet u Beogradu –
Farmaceutski fakultet

dr sc Lejla Begić, redovni profesor,
Farmaceutski fakultet,
Univerzitet u Tuzli

U Beogradu, 27.05.2016.