

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ - ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ**

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата маг. фарм. Јелене Митровић.

На седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, одржаној 22.06.2023. године, Одлуком број 1607/2 именовани су чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације, кандидата маг. фарм. Јелене Митровић, под насловом:

„Преклиничка испитивања дисперзија нанокристала и липидних наночестица деутерисаних пиразолохинолинонских лиганада – физичкохемијски и биолошки аспекти”

Комисија у саставу:

1. Др Мирослав Савић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
2. Др Ивана Пантелић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
3. Др Милош Петковић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
4. Др Данијела Ранђеловић, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за хемију, технологију и металургију
5. Др Санела Савић, научни сарадник, ДЦП Хемигал, Лесковац

прегледала је приложену дисертацију и подноси Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација маг. фарм. Јелене Митровић, под називом **„Преклиничка испитивања дисперзија нанокристала и липидних наночестица деутерисаних пиразолохинолинонских лиганада – физичкохемијски и биолошки аспекти”**, написана је на 118 страна са једноструким проредом и организована у следећих 7 целина: Увод (24 стране), Циљ истраживања (2 стране), Експериментални део (11 страна), Резултати и дискусија (58 страна), Закључак (7 страна) и Литература (16 страна). На почетку, докторска дисертација садржи сажетак на српском и енглеском језику и садржај поглавља/потпоглавља, а на крају кратку биографију кандидата и потписане изјаве кандидата о ауторству, истовестности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације. Дисертација је написана јасним и прегледним стилем и садржи 39 слика (6 у уводу и 33 у резултатима и дискусији) и 25 табела (1 у уводу, 1 у

експерименталном делу и 23 у резултатима и дискусији). Преглед литературе садржи 222 навода.

Увод садржи преглед информација из литературних извора које су од значаја за теоријску основу истраживања спроведених у оквиру докторске дисертације. У првом делу дат је кратак преглед развоја деривата пиразолохинолинона, досадашња фармаколошка истраживања два деутерисана лиганда, *DK-I-56-1* и *DK-I-60-3*, као и потенцијална ограничења која су повезана са њиховом применом. У наредном, другом делу представљени су изазови у открићу и развоју лекова, пре свега са аспекта слабе растворљивости нових потенцијалних кандидата за лек. Како се у литератури наводе различити формулациони приступи за превазилажење слабе растворљивости, посебан фокус био је на избору оптималног приступа у зависности од особина лековите супстанце, са освртом на могућност примене нанотехнологије. С обзиром да је један од предложених приступа био развој нанокристалних дисперзија, у трећем делу увода су представљене основне карактеристике ових формулација. Поред дефиниције и основних физикохемијских карактеристика, дат је литературни преглед механизма стабилизације нанокристала уз критички осврт на избор стабилизатора узимајући у обзир предложени пут примене. Додатно, описани су најчешће коришћени поступци добијања (израде) нанокристалних дисперзија. Посебан сегмент овог дела увода био је опис лиофилизације као методе за превођење нанокристалних дисперзија у чврст облик ради повећања њихове стабилности током чувања. Детаљно су описане фазе процеса лиофилизације (смрзавање, примарно сушење и секундарно сушење) и промене које се дешавају у нанокристалним дисперзијама током поменутих фаза. Коначно, описани су фармакокинетички аспекти примене ових формулација и специфичности парентералне и оралне примене нанокристала и предложени механизми који доводе до повећања биолошке расположивости. Представљен је табеларан приказ регистрованих лекова који садрже нанокристале, њихов квалитативни састав и постигнути резултати, односно разлози за формулисање ових система. Четврти део увода је био посвећен липидним наночестицама, описом њихових основних карактеристика, врста и најчешће коришћених ексципијенаса у формулацијама и метода израде. Посебно су описане липидне наночестице које садрже висок удео лецитина у липидном матриксу. Фармакокинетички аспекти парентералне и оралне примене липидних наночестица пре свега су били повезани са њиховом структуром и интеракцијама у организму. На крају је дат преглед регистрованих лекова са липидним наночестицама, њихов састав и специфичности примене.

Циљ истраживања био је развој наночестичних формулација за примену новосинтетисаних деутерисаних пиразолохинолинонских супстанци *DK-I-56-1* и *DK-I-60-3*, вођен физикохемијским карактеристикама ових супстанци. Истраживање је било подељено у четири фазе те су наведени конкретни циљеви сваке од фаза. У првој фази истраживања, циљ је био испитивање физикохемијских особина поменутих супстанци које су од значаја за одабир два типа наноформулација који ће се развијати у наредним фазама. Циљ друге фазе био је развој нанокристалних дисперзија *DK-I-56-1* и *DK-I-60-3* за парентерални, односно орални пут примене, респективно као и свеобухватна физикохемијска карактеризација добијених формулација. У посебном делу ове фазе циљ је био повећати стабилност дисперзија лиофилизацијом уз одабир одговарајућих услова процеса и одговарајућих стабилизатора. Циљ треће фазе био је развој липидних наночестица *DK-I-60-3* за оралну примену, са липидним матриксом који садржи висок

удео лецитина. Поред комплетне физикохемијске карактеризације циљ је био одредити структуру добијених наночестица и проценити њихову стабилност. У четвртој фази, циљ је био фармакокинетичко и фармакодинамско профилисање развијених формулација у сврху процене њихове погодности за ове врсте испитивања у преклиничким истраживањима испитиваних супстанци.

Циљеви истраживања су били добро дефинисани.

Експериментални део наводи материјале и опис метода коришћених у експерименталном раду. Најпре је у првом потпоглављу наведен списак коришћених материјала, а опис метода је дат у наредних 20 потпоглавља. За одређивање сатурационе растворљивости *DK-I-56-1* и *DK-I-60-3* у одабраним растварачима коришћена је модификована *shake-flask* метода. Детаљно је описана методологија израде дисперзија нанокристала уситњавањем у течном медијуму уз навођење варираних параметара. Приликом описа коришћених параметара лиофилизације наведено је на који начин су узорци припремани за сушење. У наредном делу дат је опис израде дисперзија липидних наночестица топлом хомогенизацијом под високим притиском. Анализа величине честица обухватала је методу динамичког расипања светлости и ласерску дифракцију и дати су параметри који су коришћени при мерењима. Наведени су услови испитивања зета потенцијала, мерења *pH* вредности и електричне проводљивости. Наведени су детаљи испитивања ефикасности инкапсулације и једначина коришћена за израчунавање овог параметра. Описани су различити услови термалне анализе у зависности од коришћених узорака и наведена једначина за израчунавање индекса кристаличности. Наведен је опис методе и услови дифракције X-зрака на узорку прашка. Од микроскопских метода коришћена је поларизациона микроскопија, микроскопија атомских сила и скенирајућа електронска микроскопија и наведени су основни принципи метода као и услови испитивања. Брзина растварања нанокристала испитивана је методом са дијализним врећицама уз детаљан опис експеримента. Растворљивост нанокристала одређена је након центрифугирања и дати су детаљи спроведених експеримената. Стабилност развијених формулација тестирана је током чувања испитивањем физикохемијских параметара и током инкубирања у одговарајућим пуферима са или без говеђег серум албумина мерењем величине честица. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом је коришћена за процену интеракција између криопротектаната и стабилизатора нанокристала, поред услова мерења дат је и кратак опис методе. Структурна анализа липидних наночестица је спроведена нуклеарном магнетном резонанцом, наведен је кратак опис методе и услови мерења. Приликом описа *in vivo* фармакокинетичких студија описан је експериментални протокол одобрен од стране Етичке комисије за рад са експерименталним животињама Фармацеутског факултета Универзитета у Београду и Управе за ветерину Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде (решење број 323-07-13805/2020-05 од 31.12.2020.). С обзиром да су рађене четири засебне студије дати су протоколи за сваку понаособ, а затим и опис припреме узорака за *LC-MS/MS* и израчунавање фармакокинетичких параметара. *In vivo* фармакодинамска студија са нанокристалном дисперзијом *DK-I-56-1* спроведена је тестом спонтане локомоторне активности уз праћење пређеног пута и времена имобилности. Као аналитичка метода коришћена је метода течне хроматографије-тандем масене спектрометрије (*LC-MS/MS*) и наведени су услови мерења у методи са и без интерног стандарда. За статистичку анализу коришћени су тестови провере нормалности расподеле, Студент *t*-тест, једнофакторска и

двофакторска ANOVA са одговарајућим *post-hoc* тестовима помоћу софтвера IBM SPSS Statistics (верзија 25).

Примењена методологија је адекватна за реализацију постављених циљева дисертације.

Резултати и дискусија истраживања приказани су на прегледан начин груписани у четири фазе експерименталног рада, текстуално и графички кроз 33 слике и 23 табеле. Резултати и дискусија су организовани тако да прате претходно описане фазе експерименталног рада. Кроз дискусију, на свеобухватан и разумљив начин су изнета тумачења добијених резултата и постављених хипотеза, а уз осврт на релевантне налазе других аутора који имају исти или сличан научни интерес.

Поглавље **Закључак** садржи сажето приказане најважније закључке проистекле из резултата истраживања и њихове анализе, а који су у складу са постављеним циљевима истраживања и организовани према фазама истраживања. На крају је наведен и општи закључак истраживања.

У поглављу **Литература** наведено је 222 референце које су коришћене у докторској дисертацији, цитиране Харвардским стилем.

Б. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

Резултати ове докторске дисертације изложени су у складу са постављеним циљевима истраживања изношењем и тумачењем резултата сваке од изведених фаза експерименталног рада.

У **првој фази** преформулациона испитивања показала су да се супстанце *DK-I-56-1* и *DK-I-60-3* налазе у форми жутог игличастог кристалног прашка, неуједначене величине честица са доминантним сигнаlima дифракције X-зрака при нижим 2θ , док су на 2θ већим од 10° дифракционе линије биле значајно нижег интензитета. Студије растворљивости су показале да су обе супстанце сличних особина, практично нерастворљиве у води, а поред слабе растворљивости у води, растворљивост је била ниска и у уљима. Растворљивост у органским растварачима је била око 1 mg/ml, осим у диметил сулфоксиду. Термална анализа показала је високу температуру топљења (316°C), карактеристичну за кристалне супстанце са високом енергијом кристалне решетке. Супстанце су биле стабилне при загревању, искључујући полиморфне прелазе, и деградацију. Брзим хлађењем растопа супстанце су готово у потпуности кристалисале са немогућношћу добијања стабилног аморфног облика. Иако супстанца није идеалан кандидат за класичне липидне формулације као што су емулзиони системи, због ниске растворљивости у уљима, у последњем делу прве фазе истраживања спроведена је процена могућности формулације липидних система са чврстим липидима. Растворљивост *DK-I-60-3* била је сувише ниска у смешама чврстог и течног липида у смеси упркос коришћењу високих концентрација уља. Додатак 30% лецитина у чврст липид, је омогућио солубилизацију *DK-I-60-3* и добијање хомогених липидних матрикса. Лецитин је са чврстим липидом формирао структуре које омогућују укључивање лековите супстанце у максималној концентрацији 1%.

Резултати **друге фазе** истраживања показали су успешан развој и физичкохемијску карактеризацију нанокристалних дисперзија испитиваних лиганата, *DK-I-56-1* и *DK-I-60-3*

у концентрацији 2 mg/ml. Одабрани су формулациони и процесни параметри који обезбеђују припрему дисперзија мале и уједначене величине честица. Приликом развоја оралних нанокристалних дисперзија *DK-I-60-3*, анализа величине честица и свеобухватна статистичка анализа показала је да продужење трајања уситњавања на сат времена доводи до смањења величине честица и дистрибуције величине, а количина куглица имала је различит утицај на величину честица у зависности од формулације; генерално, са повећањем запремине куглица долазило је до смањења величине честица. Повећање концентрације натријум-лаурилсулфата је довело до смањене величине честица, што је потврђено и мерењем зета потенцијала, апсолутне вредности овог параметара су расле са повећањем концентрације натријум-лаурилсулфата и односа натријум-лаурилсулфата и поливинилпиролидона. Добијене одабране формулације имале су просечну величину честица < 220 nm, индекс полидисперзности < 0,250 и апсолутну вредност зета потенцијала > 30 mV. Стабилност одабраних формулација потврђена је након једног и три месеца чувања на 25 °C. Као најстабилнија формулација показала се Ф5 са највишом концентрацијом поливинилпиролидона.

Формулације нанокристалних дисперзија *DK-I-56-1* развијене су за парентералну примену. Анализа величине честица показала је да продужење времена уситњавања заправо доводи до повећања величине честица и дистрибуције величине, док повећање запремине куглица на 60% доводи до значајног смањења ових параметара. Као стабилизатори коришћени су полисорбат 80 самостално или у комбинацији са полксамером 407, полксамером 188 и Д- α -токоферол полиетиленгликол 1000 сукцинатом. Са повећањем концентрације полисорбата 80, дошло је до смањења величине честица, међутим, формулације са најнижом и највишом концентрацијом овог стабилизатора су биле нестабилне већ један дан након израде. Приликом комбиновања других стабилизатора са полисорбатом 80 закључено је да укупна концентрација стабилизатора треба да одговара половини концентрације *DK-I-56-1*, а однос полисорбата 80 и другог стабилизатора 1:1. Ове формулације су имале величину честица < 250 nm и индекс полидисперзности < 0,250, а зета потенцијал био је око -20 mV. Нанометарска величина честица потврђена је методом ласерске дифракције, а формулације су се показале стабилним током три недеље чувања на 25 °C. На микрографијама су се издвојиле издужене пљоснате честице нанометарских величина које одговарају величини добијеној другим техникама мерења величине. Анализа чврстог стања била је отежана оскудним подацима о кристалној структури *DK-I-56-1* и *DK-I-60-3* доступним у литератури. Термална анализа диференцијалном скенирајућом калориметријом показала је задржавање кристалне структуре са дискретно нижом тачком топљења која је последица смањене величине честица. Додатно, дифракција X-зрака на узорку прашка је показала значајно смањење интензитета дифракционих линија карактеристично за нанокристалне фазе. Обе супстанце су остале у кристалном облику, мада се не искључује могућност промене параметара јединичне ћелије услед уситњавања. Показано је повећање брзине растварања нанокристала у односу на грубу дисперзију и чисту супстанцу, али и могући методолошки проблем утицаја дијализних врећица на експеримент.

Превођење нанокристалне дисперзије у чврст облик лиофилизацијом је спроведено на примеру формулације НС4 (нанокристална дисперзија *DK-I-56-1* стабилована полисорбатом 80 и полксамером 407). Одабране су три формулације са укупном концентрацијом ексципијенаса 10%: сахароза, сахароза и манитол 1:1 и сахароза и

манитол 3:2. Ове формулације су имале задржану величину честица, индекс полидисперзности $< 0,200$ и висок степен редисперзибилности (око 95%). Све три формулације су биле стабилне у студији смрзавања-одмрзавања, са индексом редисперзибилности након спонтаног одмрзавања од око 95%. Након једног месеца чувања на 25 °С, лиофилизати добијени лиофилизацијом са примарним сушењем на -10 °С су имали значајан пораст величине честица и смањење индекса редисперзибилности на 30-50%, а агрегати величине веће од 1 μm су били детектовани ласерском дифракцијом. Са друге стране, лиофилизати добијени лиофилизацијом са примарним сушењем на -45 °С су били боље стабилности након три месеца чувања. Анализа чврстог стања је указала на значајне разлике у узорцима када се посматра степен кристаличности ексципијенаса, међутим, није дошло до промене морфологије ових узорака током посматраног периода чувања. На микрографијама добијеним скенирајућом електронском микроскопијом и поларизационом микроскопијом могли су се видети агрегати нанокристала као и појединачне честице. Степен интеракција анализираних инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом био је већи када је коришћена сахароза, када се узму у обзир водоничне везе које се формирају између дисахарида и стабилизатора нанокристала. Са друге стране, специфична конформација трехалозе омогућила је добру стабилност током чувања, са готово непромењеном величином честица.

У **трећој фази** истраживања развијене су липидне наночестице *DK-I-60-3*, користећи липидни матрикс одређен у првој фази истраживања. Развијене су формулације са 10% и 15% липидне фазе, стабилизоване полисорбатом 80, са концентрацијом *DK-I-60-3* 1,0 mg/ml и 1,5 mg/ml, респективно. Величина честица формулација била је мања од 100 nm, а индекс полидисперзности $< 0,300$, тако да су добијене формулације биле у одређеном степену транспарентне. Физичкохемијска карактеризација дала је следеће резултате: зета потенцијал од -34 до -50 mV, *pH* вредност од 4,2 до 5,5, електрична проводљивост од 145 до 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ и ефикасност инкапсулације већа од 99% након једног дана и 30 дана од израде. Међутим, током чувања је примећена седиментација дела супстанце на дну бочице која је указала на одређени вид нестабилности који није могао бити уочен праћењем физичкохемијских карактеристика. Стога је концентрација *DK-I-60-3* у формулацијама смањена за 20%, а добијене дисперзије су имале исте карактеристике као иницијално развијене формулације, док до седиментације током чувања није дошло. На микрографијама добијеним микроскопијом атомских сила, уочене су појединачне честице малих величина уроњене у окружење, са омотачем дебљине око 2 nm. Термалном анализом је потврђено кристално стање липидног матрикса. Структурна анализа нуклеарном магнетном резонанцом показала је слојевиту структуру наночестица са липидним језгром састављеним од триглицерида чврстог липида и овојницом у којој се примарно налазе фосфолипиди лецитина и уклопљен лиганд *DK-I-60-3*. Полисорбат 80 је био хидрофобним делом молекула уроњен у липидни матрикс док је хидрофилна глава мобилна у воденој фази што значајно доприноси стабилности система.

У **четвртој фази** спроведене су *ин vivo* фармаколошке студије на експерименталним животињама. У првом експерименту резултати су показали мање интериндивидуалне варијације у погледу стања ситости или глади након примене нанокристалне формулације *DK-I-60-3* у односу на грубу дисперзију. Додатно, добијене су два до три пута веће вредности максималне концентрације и површине испод криве у плазми и мозгу. Дуже задржавање *DK-I-60-3* у мозгу и јетри је указало на могуће формирање депоа у овим

органима. У неурофармакокинетичкој студији у којој су упоређене нанокристална дисперзија и дисперзија липидних наночестица, липидне наночестице су повећале максималну концентрацију у плазми и површину испод криве, а ово повећање је било праћено повећањем концентрација у мозгу у истом обиму. У студији биолошке расположивости апсолутна биорасположивост нанокристала и липидних наночестица је процењена у односу на интравенски раствор. Системска изложеност је била значајно већа након примене раствора у односу на орално примењене наноформулације. Апсолутна биорасположивост нанокристала била је $24,46 \pm 7,81\%$ док је након липидних наночестица била око 1,4 пута већа ($34,71 \pm 12,43\%$).

Неурофармакокинетичка студија на мишевима након интраперитонеалне примене нанокристала *DK-I-56-1* у односу на раствор и уобичајено коришћену грубу дисперзију показала је да је смањење величине честица довело до повећања биорасположивости у крви и мозгу, а одсуство органских растварача и високих концентрација сурфактанта је било кључно за повећање биокомпатибилности формулације и смањења негативних утицаја ексципијенаса на фармакокинетику *DK-I-56-1*. Концентрација *DK-I-56-1* у мозгу након нанокристалне формулације била је компарабилна са резултатима након примене раствора који је, због ниске растворљивости *DK-I-56-1* имао високу концентрацију диметил-сулфоксида и *Cremophor EL*. Са друге стране, након примене суспензије добијен је бимодални профил концентрације у мозгу.

Компатибилност развијене формулације нанокристала *DK-I-56-1* у склопу фармакодинамских испитивања показана је тестом спонтане локомоторне активности. Хиперлокомоција, која је примењена у мишева који су третираны нанокристалном дисперзијом у односу на плацебо и физиолошки раствор јасно је указала на самостално деловање лиганда, без утицаја компонената формулације (ексципијенаса) на резултате. С обзиром да су разлике између третмана у пређеном путу и времену имобилности биле више изражене у другом делу експеримента, добијени резултати указују да је одржање хиперлокомоције било последица активности *DK-I-56-1*, без негативних утицаја ексципијенаса примењених приликом коришћења наноемулзија.

V. УПОРЕДНА АНАЛИЗА ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Повећана примена високопропусног скрининга и комбинаторијске синтезе резултовала је развојем лековитих супстанци са слабом растворљивошћу у води, те чак 90% нових хемијских ентитета (*new chemical entity*) и 40% лековитих супстанци на тржишту има ограничену растворљивост (Kaleru и Kennanti, 2015; Merisko-Liversidge и Liversidge, 2011). Стога, рани развој формулације има све већи значај и постаје интегрални део открића и развоја лекова. Значај одабира одговарајућих формулационих приступа огледа се у обезбеђивању спровођења фармаколошких (фармакодинамских и фармакокинетичких) и токсиколошких студија, због чега се ове формулације називају и омогућујућим формулацијама (*eng. enabling formulations*) (Li и Zhao, 2007). За повећање растворљивости, традиционално користе се средства за подешавање *pH* вредности (за молекуле који јонизују), корастварачи и солубилизатори, водећи рачуна о максималним дозвољеним нивоима ових ексципијенаса у препаратима (Williams и сар., 2013; Pestel и сар., 2006). Међутим, уколико испитивана супстанца има ограничену растворљивост у

овим растварачима, формулисање безбедних препарата може бити изазов. Примена нанотехнологије, стога, има све већу примену у раним фазама развоја лека јер обезбеђује формулацију безбедних формулација за готово све путеве примене.

Деутерисани пиразолохинолинони, *DK-I-56-1* и *DK-I-60-3*, који су били предмет докторске дисертације, се интензивно проучавају као селективни лиганди за ГАБА_A рецепторе са α_6 субјединицом (Divović Matović и сар., 2022; Knutson и сар., 2018; Sieghart и сар., 2022). Иако је њихова метаболичка стабилност повећана услед присуства деутеријума у структури, примена на анималним моделима је ограничена слабом растворљивошћу у води (Knutson и сар., 2018). Добро је познато да супстанце са слабом растворљивошћу у води припадају једној од две групе - циглена прашина (енг. *brick dust*) или масним лоптицама (енг. *grease ball*). Формулациони приступи за превазилажење слабе растворљивости зависе од тога којој групи испитивана супстанца припада, те је од великог значаја утврдити основне особине супстанци које ће указати на припадност једној од поменутих група (Bergström и сар., 2016). Из тог разлога, преформулациона истраживања у првој фази експерименталног рада била су усмерена ка добијању информација о значајним физичкохемијским особинама за поменути класификацију, коришћењем малих количина супстанци. Пошто је показано да су супстанце кристалне, са органиченом растворљивошћу у води, уљима и уобичајено коришћеним растварачима, као један од приступа формулацији изабране су дисперзије нанокристала.

Како је у раној фази открића и развоја лека доступна мала количина лековите супстанце, велики значај докторске дисертације огледа се у коришћењу модификоване методе уситњавања у течном медијуму коришћењем уређаја за лизу ћелија, први пут примењеним у истраживању Согриас и сар. (2017). Иако су у поменутом раду варирани формулациони параметри, утицај процесних параметара није испитан, те је у овој докторској дисертацији дат значајан увид у процес уситњавања. Нанокристалне дисперзије одликује низ особина као што су повећање растворљивости и повећање брзине растварања лековите супстанце (Jermain и сар., 2018; Peltonen и Hirvonen, 2018; Peltonen и Strachan, 2020), тако да је физичкохемијска карактеризација добијених формулација била између осталог усмерена ка испитивању ових карактеристика. У дисертацији је дат критички осврт на примењене методологије, указујући на ограничења појединих метода, као и комплементарност различитих техника. Добијени резултати докторске дисертације су слични резултатима истраживања супстанци сличних особина као што су арипипразол (Xu и сар., 2012), херпетрион (Guo и сар., 2013), фенофибрат (Yang и сар., 2014) и ритонавир (Karakucuk и сар., 2019).

Један од основних недостатака нанокристалних дисперзија је њихова краткорочна стабилност, због чега се углавном преводе у чврсто стање сушењем смрзавањем (лиофилизацијом) или сушењем распршивањем (Yue и сар., 2013). Приликом лиофилизације, међутим, постоји велики ризик од агрегације нанокристала, због чега је важно одабрати параметре процеса и одговарајуће стабилизаторе (Yue и сар. 2014). Као стабилизатори најчешће се користе дисахариди као што је сахароза и трехалоза, али ретко у комбинацији са манитолом као средством за допуњавање. У докторској дисертацији су коришћене различите комбинације ових ексципијенаса, процењена стабилност добијених лиофилизата и процењене су интеракције стабилизатора, које могу објаснити резултате

студије стабилности. Добијени резултати указују и на значај додатка манитола као пуниоца.

Као друга врста наноносача, формулисане су липидне наночестице. Међутим, услед ограничене растворљивости *DK-I-60-3* у уљима, формулација уобичајених врста липидних наночестица као што су чврсте липидне наночестице и наноструктурирани липидни носачи није била могућа. У преформулационим испитивањима утврђено је да за успешну солубилизацију *DK-I-60-3* чврст липид треба комбиновати са високом концентрацијом лецитина. Добијени матрикси су раније испитивани за пилокарпин базу и пилокарпин-хидрохлорид, 17 β -естрадиол хемихидрат, миконазол-нитрат и диклофенак-натријум (Attama i sar., 2008; Kenechukwu i sar., 2017; Friedrich и Müller-Goymann, 2003), а успешно уклапање *DK-I-60-3* у липидне наночестице потврђено је високим вредностима ефикасности инкапсулације. Због високе концентрације лецитина, било је неопходно спровести анализу структуре добијених наночестица, и то је урађено методом нуклеарне магнетне резонанце. Показано је да наночестице имају слојевиту структуру, слично као у истраживању Schubert и сар. (2006). Поред тога, истом методом локализована је испитивана суспензија у омотачу који се састоји од фосфолипида, што може бити значајно са аспекта ослобађања и последично брзине апсорпције и деловања *DK-I-60-3* након оралне примене.

Четврта фаза била је посвећена ин виво експериментима како би се испратило понашање развијених формулација након примене. Након оралне примене нанокристала *DK-I-60-3* добијене су мање интериндивидуалне варијације у апсорпцији у односу на стање ситости, слично као у случају итраконазола (Mou и сар., 2011). Иако није утврђен тачан механизам повећања апсорпције и последично биолошке расположивости, јасно је да је мања величина честица нанокристала у односу на грубу дисперзију био кључни фактор. Испитивана формулација даље није утицала на дистрибуцију супстанци до циљног органа (мозга). При испитивању оралне примене липидних наночестица у поређењу са нанокристалима, добијени су слични резултати као у испитивању циклоспорина (Müller и сар., 2006) и саквинавира (Xia и сар., 2018), што указује на сличан механизам апсорпције. И у овој студији, након апсорпције није било додатних разлика у дистрибуцији супстанце у односу на примењене третмане.

У неурофармакокинетичком експерименту са нанокристалима *DK-I-56-1* као поредбени третмани коришћени су раствор са високом концентрацијом диметил-сулфоксида и *Cremophor EL* (као у истраживању Fan и сар. (2018) и уобичајено коришћена суспензија (Knutson и сар., 2018). Разлике у дистрибуцији примењене након примене раствора могу се објаснити значајним утицајем коришћених ексципијенаса описаним у литератури (Vadary и сар., 1998; Gelderblom и сар., 2001), а нижа биорасположивост након суспензије последица велике величине честица и слабе растворљивости, као у истраживању Sigfridsson и сар. (2013). Основна предност нанокристала је, у том смислу, у односу на раствор била избегавање могућности за неправилно фармакокинетичко понашање и токсичност узроковане ексципијенсима, а у односу на суспензију поуздана биорасположивост и правилнија фармакокинетика, што је значајно у преклиничким студијама кандидата за лек са слабом растворљивошћу.

Одсуство утицаја ексципијенаса на ефекте *DK-I-56-1* показано је фармакодинамском студијом. Наноемулзија која је коришћена као носач супстанце у ранијим истраживањима

(Knutson и сар., 2018) је имала благу бихејвиоралну активност, могуће због комплексног састава и коришћења диметилсулфоксида и бензилалкохола, што је компликовало тумачење резултата. Сprovedени тест спонтане локомоторне активности показао је да је примећена хиперлокомоција била последица само активности *DK-I-56-1*, без доприноса коришћеног вехикулума. Додатно ова студија је потврдила резултате фармакокинетичке студије у испоруци ефективних концентрација *DK-I-56-1* у мозак након интраперитонеалне примене нанокристалне формулације, одређених комбинованим електрофизиолошким и фармакокинетичким резултатима приказаним у (Knutson и сар., 2018).

Свеукупно гледано, поређењем са публикованим резултатима из литературе за лековите супстанце сличних физикохемијских особина, део резултата докторске дисертације је у сагласности са подацима из литературе. С обзиром да формулација наночестичних носача за новосинтетисане деутерисане лиганате није до сада истраживана, одређени резултати добијени и представљени у оквиру ове докторске дисертације нису могли бити проверени у публикованим изворима, те се сматрају доприносом истраживачког рада кандидата.

Литература

Attama, A.A., Reichl, S., Müller-Goymann, C.C., 2008. Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *Int. J. Pharm.* 355(1-2), 307-313

Badary, O.A., Al-Shabanah, O.A., Al-Gharably, N.M., Elmazar, M.M., 1998. Effect of Cremophor EL on the Pharmacokinetics, Antitumor Activity and Toxicity of Doxorubicin in Mice. *Anticancer Drugs* 9(9), 809-815.

Bergström, C.A., Charman, W.N., Porter, C.J., 2016. Computational prediction of formulation strategies for beyond-rule-of-5 compounds. *Adv Drug Deliv Rev.* 101, pp.6-21.

Corrias, F., Schlich, M., Sinico, C., Pireddu, R., Valenti, D., Fadda, A.M., Marceddu, S., Lai, F., 2017. Nile red nanosuspensions as investigative model to study the follicular targeting of drug nanocrystals. *Int. J. Pharm.* 524 (1–2), 1–8.

Divović Matović, B., Knutson, D., Mitrović, J., Stevanović, V., Stanojević, B., Savić, S., Cook, J.M., Savić, M.M., 2022. Behavioural interaction of pyrazoloquinolinone positive allosteric modulators at $\alpha 6$ GABAA receptors and diazepam in rats: Anti-diazepam-induced ataxia action as a structure-dependent feature. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 131(6), 514-524.

Fan, P.C., Lai, T.H., Hor, C.C., Lee, M.T., Huang, P., Sieghart W., Ernst, M., Knutson, D.E., Cook, J., Chiou, L.C., 2018. The $\alpha 6$ subunit-containing GABA A receptor: A novel drug target for inhibition of trigeminal activation. *Neuropharmacology* 140, 1-13.

Friedrich, I., Müller-Goymann, C.C., 2003. Characterization of solidified reverse micellar solutions (SRMS) and production development of SRMS-based nanosuspensions. *Eur J Pharm Biopharm.* 56(1), 111-119.

Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., Sparreboom, A., 2001. Cremophor EL: The Drawbacks and Advantages of Vehicle Selection for Drug Formulation. *Eur. J. Cancer* 37(13), 1590-1598.

Guo, J.J., Yue, P.F., Lv, J.L., Han, J., Fu, S.S., Jin, S.X., Jin, S.Y., Yuan, H.L., 2013. Development and in vivo/in vitro evaluation of novel herpetrione nanosuspension. *Int. J. Pharm.* 441(1-2), 227-233.

Jermain, S.V., Brough, C., Williams III, R.O., 2018. Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery—an update. *Int. J. Pharm.* 535(1-2), 379-392.

Kalepu, S., Nekkanti, V., 2015. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm. Sin. B.* 5(5), 442-453.

Karakucuk, A., Teksin, Z.S., Eroglu, H., Celebi, N., 2019. Evaluation of improved oral bioavailability of ritonavir nanosuspension. *European J. Pharm. Sci.* 131, 153-158.

Kenechukwu, F.C., Attama, A.A., Ibezim, E.C., 2017. Novel solidified reverse micellar solution-based mucoadhesive nano lipid gels encapsulating miconazole nitrate-loaded nanoparticles for improved treatment of oropharyngeal candidiasis. *J. Microencapsul.* 34(6), 592-609.

Knutson, D.E., Kodali, R., Divović, B., Treven, M., Stephen, M.R., Zahn, N.M., Dobričić, V., Huber, A.T., Meirelles, M.A., Verma, R.S., et al., 2018. Design and synthesis of novel deuterated ligands functionally selective for the γ -aminobutyric acid type a receptor (GABAAR) $\alpha 6$ subtype with improved metabolic stability and enhanced bioavailability. *J Med Chem.* 61 (6), 2422–2446.

Li, P., Zhao, L., 2007. Developing early formulations: practice and perspective. *Int. J. Pharm.* 341(1-2), 1-19.

Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G., 2011. Nanosizing for Oral and Parenteral Drug Delivery: A Perspective on Formulating Poorly-Water Soluble Compounds Using Wet Media Milling Technology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63(6), 427-440.

Mou, D., Chen, H., Wan, J., Xu, H., Yang, X., 2011. Potent dried drug nanosuspensions for oral bioavailability enhancement of poorly soluble drugs with pH-dependent solubility. *Int. J. Pharm.* 413(1-2), 237-244.

Müller, R.H., Runge, S., Ravelli, V., Mehnert, W., Thünemann, A.F., Souto, E.B., 2006. Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *Int J Pharm.* 317(1), 82-89.

Peltonen, L., Hirvonen, J., 2018. Drug nanocrystals—versatile option for formulation of poorly soluble materials. *Int. J. Pharm.* 537(1-2), 73-83.

Peltonen, L., Strachan, C.J., 2020. Degrees of order: A comparison of nanocrystal and amorphous solids for poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 586, 119492.

Pestel, S., Martin, H.J., Maier, G.M., Guth, B., 2006. Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal, and liver function in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 54(2), 200-214.

Schubert, M.A., Harms, M., Müller-Goymann, C.C., 2006. Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *Eur J Pharm Sci.* 27(2-3), 226-236.

Sieghart, W., Chiou, L.C., Ernst, M., Fabjan, J., Savić, M.M., Lee, M.T., 2022. $\alpha 6$ -Containing GABAA Receptors: Functional Roles and Therapeutic Potentials. *Pharmacol Rev.* 74(1), 238-270.

Sigfridsson, K., Lundqvist, A., Strimfors, M., 2013. Evaluation of exposure properties after injection of nanosuspensions and microsuspensions into the intraperitoneal space in rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39(11), 1832-1839.

Williams, H.D., Trevaskis, N.L., Charman, S.A., Shanker, R.M., Charman, W.N., Pouton, C.W., Porter, C.J., 2013. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol. Rev.* 65 (1), 315–499.

Xia, D., He, Y., Li, Q., Hu, C., Huang, W., Zhang, Y., Wan, F., Wang, C., Gan, Y., 2018. Transport mechanism of lipid covered saquinavir pure drug nanoparticles in intestinal epithelium. *J Control Release*. 269, 159-170.

Xu, Y., Liu, X., Lian, R., Zheng, S., Yin, Z., Lu, Y., Wu, W., 2012. Enhanced dissolution and oral bioavailability of aripiprazole nanosuspensions prepared by nanoprecipitation/homogenization based on acid–base neutralization. *Int. J. Pharm.* 438(1-2), 287-295.

Yang, H., Teng, F., Wang, P., Tian, B., Lin, X., Hu, X., Zhang, L., Zhang, K., Zhang, Y., Tang, X., 2014. Investigation of a nanosuspension stabilized by Soluplus® to improve bioavailability. *Int. J. Pharm.* 477(1-2), 88-95.

Yue, P.F., Li, G., Dan, J.X., Wu, Z.F., Wang, C.H., Zhu, W.F., Yang, M., 2014. Study on formability of solid nanosuspensions during solidification: II novel roles of freezing stress and cryoprotectant property. *Int. J. Pharm.* 475(1-2), 35-48.

Yue, P.F., Li, Y., Wan, J., Yang, M., Zhu, W.F., Wang, C.H., 2013. Study on formability of solid nanosuspensions during nanodispersion and solidification: I. Novel role of stabilizer/drug property. *Int. J. Pharm.* 454(1), 269-277.

Г. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Радови у врхунским међународним часописима (M21)

1. **Mitrović, J.R.**, Divović, B., Knutson, D.E., Đoković, J.B., Vulić, P.J., Randjelović, D.V., Dobričić, V.D., Čalija, B.R., Cook, J.M., Savić, M.M. and Savić, S.D., 2020. Nanocrystal dispersion of DK-I-56–1, a poorly soluble pyrazoloquinolinone positive modulator of $\alpha 6$ GABAA receptors: Formulation approach toward improved in vivo performance. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 152, p.105432. **IF (2020) = 4,517; Pharmacology & Pharmacy (80/276) M21**
2. **Mitrović, J.R.**, Divović-Matović, B., Knutson, D.E., Đoković, J.B., Kremenović, A., Dobričić, V.D., Randjelović, D.V., Pantelić, I., Cook, J.M., Savić, M.M. and Savić, S.D., 2021. Overcoming the low oral bioavailability of deuterated pyrazoloquinolinone ligand dk-i-60-3 by nanonization: A knowledge-based approach. *Pharmaceutics*, 13(8), p.1188. **IF (2021) = 7,227; Pharmacology & Pharmacy (30/279) M21**
3. **Mitrović, J.R.**, Divović-Matović, B., Knutson, D.E., Petković, M., Djorović, D., Randjelović, D.V., Dobričić, V.D., Đoković, J.B., Lunter, D.J., Cook, J.M. and Savić, M.M., 2023. High amount of lecithin facilitates oral delivery of a poorly soluble pyrazoloquinolinone ligand formulated in lipid nanoparticles: Physicochemical, structural and pharmacokinetic performances. *International Journal of Pharmaceutics*, 633, p.122613. **IF (2021) = 6,274; Pharmacology & Pharmacy (41/279) M21**

Саопштења са међународног скупа штампана у изводу (M34)

1. **Mitrović J**, Bjelošević M, Knutson DE, Kremenović A, Lunter D, Ahlin Grabnar P, Cook JM, Savić MM, Savić SD. Freeze-dried nanocrystal dispersion of novel deuterated pyrazoloquinolinone ligand (DK-I-56-1): process parameters and cryoprotectant selection through stability study. 9th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, 2022, Ljubljana, Slovenija

2. **Mitrović J**, Petković M, Randjelović D, Đoković J, Knutson D, Cook J, Savić V, Savić M, Savić S. Physicochemical/structural investigation of lipid nanoparticles with high lecithin amounts loaded with patent protected pyrazoloquinolinone ligand DK-I-60-3. 13th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 2021, Rotterdam, Holandija.
3. **Mitrović J**, Divović B, Đoković J, Dobričić V, Knutson D, Cook J, Savić M, Savić S. Pharmacokinetic and biodistribution studies of novel patent protected pyrazoloquinolinones formulated as nanosuspension. 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 2021.
4. **Mitrović J**, Bjelošević M, Đoković J, Ahlin Grabnar P, Planinšek O, Knutson DE, Cook JM, Savić MM, Savić SD. Nanosuspensions of novel deuterated pyrazoloquinolinones ligand (DK-I-56-1): lyophilisation procedure development through cryoprotectant selection and stability study. 3rd International Symposium on Pharmaceutical Engineering Research, 2019, Braunschweig, Nemačka.
5. **Mitrović J**, Divović B, Dobričić V, Čalija B, Vulić P. J, Knutson D. E, Cook J. M, Savić M. M, Savić S. D. Nanonization of new patent protected substances - carrier selection for preclinical research: physicochemical and in vivo behavioral characterization. 10th International BioNanoMed, 2019, Grac, Austrija.
6. **Mitrović J**, Đoković J, Čalija B, Savić S. Physicochemical and structural characterization of nanostructured lipid carriers with high amount of liquid lipid intended for parenteral administration. 3rd European Conference on Pharmaceutics, 2019, Bologna, Italy.

Саопштења са скупа националног значаја штампана у изводу (M64)

1. **Mitrović J**, Đoković J, Savić M, Savić S. Nanosuspensions of deuterated pyrazoloquinolinones – impact of preparation process parameters on physicochemical characteristics. 3rd Congress of Pharmacists of Montenegro, 2019, Budva, Crna Gora.
2. **Mitrović J**, Đoković J, Dobričić V, Čalija B, Vulić P, Savić M, Savić SD. Nanostrukturirane lipidne nanočestice kao potencijalni nosači DK-I-60-3: Preformulaciona i formulaciona istraživanja. Arh.farm. 2018; 68(3):624-625.

Д. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Резултати докторске дисертације приказали су успешан развој две врсте наночестичних система намењених за испоруку два новосинтетисана пиразолохинолинонска лиганда, *DK-I-56-1* и *DK-I-60-3*: нанокристала и липидних наночестица. Познавање физичкохемијских особина супстанци показало се од пресудног значаја за одабир формулационих стратегија за превазилажење ниске растворљивости, посебно када су у фокусу новосинтетисане супстанце. Са друге стране, развој формулација које би се користиле у преклиничким студијама треба да узме у обзир једноставан састав система, и ниску концентрацију ексципијенаса, како би се омогућило испитивање особина супстанци након примене. У том смислу, добијене формулације су обезбедиле повећање биорасположивости, али истовремено и дистрибуцију лиганда вођењу њиховим особинама.

Ђ. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

С обзиром на тренутну недоступност софтвера за проверу оригиналности докторске дисертације, према допису Универзитета у Београду број 612-2380/1-23 од 28.6.2023. оцена оригиналности ове докторске дисертације биће накнадно достављена.

МЕНТОР

Др Снежана Савић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Е. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу прегледа докторске дисертације маг. фарм. Јелене Митровић под називом „Преклиничка испитивања дисперзија нанокристала и липидних наночестица деутерисаних пиразолохинолинонских лиганата – физичкохемијски и биолошки аспекти” може се закључити да је кандидат испунио постављене циљеве и да резултати приказани у дисертацији представљају оригиналан и значајан научни допринос, што је потврђено њиховим објављивањем у облику три рада у међународним часописима.

Комисија, стога, предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и након добијања сагласности Већа научних области медицинских наука Универзитета у Београду одобри маг. фарм. Јелени Митровић јавну одбрану докторске дисертације.

Београд, 07.07.2023.

Чланови Комисије:

1. _____

Др Мирослав Савић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

2. _____

Др Ивана Пантелић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

3. _____

Др Милош Петковић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

4. _____

Др Данијела Ранђеловић, научни саветник
Универзитет у Београду - Институт за хемију, технологију и металургију

5. _____

Др Санела Савић, научни сарадник
ДЦП Хемигал, Лесковац