

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
UNIVERZITETA U BEOGRADU – FARMACEUTSKOG FAKULTETA
KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Na osnovu odluke Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta, donete na sednici održanoj 13. jula 2015. godine, imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata magistra farmacije Marka Kalinića, pod naslovom: *Simulacije molekularne dinamike i računarsko dizajniranje inhibitora protein lizin metiltransferaze EZH2.*

Na osnovu priložene disertacije, Komisija u sastavu:

1. dr sc. Slavica Erić (mentor), vanredni profesor, Katedra za farmaceutsku hemiju, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet;
2. dr sc. Vladimir Savić, redovni profesor, Katedra za organsku hemiju, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet;
3. dr sc. Mire Zloh, redovni profesor, Department of Pharmacy, University of Hertfordshire, Hatfield, United Kingdom;

podnosi sledeći

I Z V E Š T A J

1. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija kandidata magistra farmacije Marka Kalinića, pod naslovom *Simulacije molekularne dinamike i računarsko dizajniranje inhibitora protein lizin metiltransferaze EZH2*, napisana je na 241 strani standardnog formata i dokumentovana sa 54 slike (od toga 3 u prilogu), 22 tabele (od toga 9 u prilogu), 413 literaturnih navoda i 3 priloga. Tekst disertacije organizovan je u 7 poglavlja: *Uvod, Cilj rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura i Prilozi.*

U *Uvodu*, dat je pregled epigenetskih mehanizama regulacije transkripcije proteina u zdravim i maligno transformisanim ćelijama i opisan terapijski potencijal modulacije epigenetskih ciljnih mesta dejstva. Detaljnije su opisane struktura i funkcija protein lizin metiltransferaze EZH2, odnosno PRC2 kompleksa u okviru kojeg je EZH2 aktivan. Istaknut je potencijal

inhibicije EZH2 kao strategije u razvoju novih selektivnih antitumorskih lekova, a zatim je predstavljen pregled poznatih inhibitora EZH2. Opisani su mehanizmi razvoja rezistencije na antitumorske lekove, uz poseban osvrt na ulogu membranskih transportera kao što su P-glikoprotein (Pgp) i protein rezistencije karcinoma dojke (BCRP). Istaknut je značaj predviđanja mogućnosti interakcije novih antitumorskih lekova sa ovim transporterima tokom njihovog otkrića i razvoja. U poslednjem delu uvodnog poglavlja, dat je kratak pregled odabranih računarskih metoda koje se koriste u racionalnom dizajniranju lekova, prevashodno simulacija molekularne dinamike (MD), proračuna slobodne energije vezivanja i različitih pristupa *de novo* računarskom dizajnu hemijskih struktura.

U poglavlju *Cilj rada* navedeni su najznačajniji ciljevi istraživanja sprovedenog u okviru disertacije.

Poglavlje *Eksperimentalni deo* podeljeno je u tri celine. U prvoj su opisane računarske metode i protokoli korišćeni za homologo modeliranje i simulacije molekularne dinamike EZH2, u apo obliku i u kompleksu sa 13 poznatih inhibitora ovog enzima. Takođe, opisan je pristup razvoju i validaciji farmakofornih modela inhibitora EZH2. U drugoj celini, opisan je pristup uspostavljanju računarskih modela za klasifikovanje jedinjenja kao supstrata i nesupstrata Pgp-a i BCRP-a. U trećoj celini, predstavljeni su detalji implementacije algoritma za *de novo* dizajn, koja je izvršena u programskom jeziku Python.

Poglavlje *Rezultati i diskusija* takođe je organizovano u tri celine. U prvoj celini, predstavljen je razvoj modela vezivnog mesta za kofaktor u strukturi EZH2. Rezultati simulacija kompleksa poznatih inhibitora i EZH2, dobijenih korišćenjem razvijenog modela, analizirani su u kontekstu dostupnih eksperimentalnih podataka. Razmatrane su ključne strukturne odrednice selektivnosti i aktivnosti inhibitora EZH2, uzimajući u obzir rezultate MM/GBSA proračuna i računarske mutageneze u alanin. Dat je osvrt na odnose strukture i aktivnosti poznatih inhibitora u kontekstu modelovane strukture vezivnog mesta. U drugoj celini, predstavljene su prediktivne karakteristike razvijenih klasifikacionih modela za predviđanje transporta posredovanog Pgp-om i BCRP-om i prikazani rezultati njihove eksterne validacije. Diskutovano je supstratno preklapanje između Pgp-a i BCRP-a i implikacije koje ono ima u dizajnu novih antitumorskih lekova. U trećem segmentu, izloženi su rezultati validacije farmakofornih modela inhibitora EZH2. Diskutovane su ideje i principi implementiranog algoritma za *de novo* dizajn, uz njegovo poređenje sa postojećim algoritmima za ovu namenu. Opisani su i rezultati analize uticaja parametara algoritma na njegovu konvergenciju. Dalje, izloženi su rezultati dizajna novih jedinjenja primenom implementiranog algoritma i koraci

pomoću kojih je inicijalna kolekcija dizajniranih jedinjenja redukovana do 11 struktura, čija je interakcija sa EZH2 proučavana simulacijama molekularne dinamike. Pet jedinjenja, koja su tokom simulacija ostala stabilna u kompleksu, detaljno su analizirana u smislu interakcija sa vezivnim mestom i potencijalom za dalje strukturne modifikacije. Konačno, opisana je optimizacija jednog jedinjenja, korišćenjem simulacija MD i razvijenih modela za predviđanje afiniteta za Pgp i BCRP, koja je za cilj imala eliminisanje afiniteta za Pgp.

U poglavlju *Zaključak*, zbirno su prikazani najznačajniji rezultati istraživanja i njihov značaj u otkriću novih potencijalnih inhibitora EZH2.

U *Literaturi*, citirano je 413 referenci, uključujući softver koji je korišćen u istraživanju, Vankuverskim stilom.

Poglavlje *Prilozi* sadrži 9 tabela i 3 slike. U *Prilogu A*, dati su numerički rezultati pojedinih proračuna slobodne energije koji su diskutovani u osnovnom tekstu. U *Prilogu B* dati su: (i) setovi koji su korišćeni za uspostavljanje modela za predviđanje transporta Pgp-om i BCRP-om; (ii) svi deskriptori uključeni u finalne modele, uz opsege vrednosti kojima su definisani domeni primenjivosti modela; (iii) rezultati validacije modela uz korišćenje alternativnih definicija domena primenjivosti. U *Prilogu C*, prikazane su određene karakteristike funkcija procene korišćenih u algoritmu za *de novo* dizajn.

2. Opis postignutih rezultata

U okviru ove doktorske disertacije izvršena je strukturna racionalizacija aktivnosti poznatih inhibitora EZH2, na čijim osnovama je izvršeno računarsko dizajniranje novih potencijalnih inhibitora ovog enzima.

U početnom delu studije, razvijen je model vezivnog mesta za kofaktor u strukturi EZH2, za koje je na osnovu literaturnih podataka pretpostavljeno da predstavlja vezivno mesto poznatih piridonskih inhibitora EZH2. Simulacijama MD i proračunima slobodne energije vezivanja utvrđeno je dobro slaganje između računarski procenjene i eksperimentalno utvrđene energije vezivanja poznatih inhibitora ($R = 0,74 - 0,88$), čime je potvrđena validnost uspostavljenog modela. Analiza prikupljenih trajektorija i računarska mutageneza odabranih aminokiselina vezivnog mesta u alanin ukazale su da postoji nekoliko ključnih odrednica aktivnosti poznatih inhibitora: (i) uspostavljanje vodoničnih veza i drugih polarnih interakcija sa NHS motivom enzima, prevashodno kosturom proteina u regiji H689 i bočnim lancem N688; (ii)

hidrofobni kontakti sa bočnim lancima post-SET domena (I739, E742, M743) koji su od značaja ne samo za aktivnost, već značajno doprinose selektivnosti inhibitora; (iii) aromatične interakcije sa Y661 i F665, kao i sumpor-aren interakcije sa C663. Dobijeni rezultati ukazali su na neophodnost pravilnog pozicioniranja post-SET domena u cilju stabilizacije inhibitora u vezivnom mestu i istakli značaj modeliranja ovog dela strukture, uz razmatranje njene dinamične prirode korišćenjem simulacija MD. Rezultati ovog dela studije predstavljali su osnovu za definisanje farmakofornog modela koji je iskorišćen kao matrica u *de novo* dizajnu novih potencijalnih inhibitora. Farmakofore su validirane korišćenjem seta poznatih inhibitora i molekula „mamaca“ i pokazale su veoma dobru sposobnost identifikovanja stvarno aktivnih molekula (AUROC 0,857 – 0,911; EF_{5%} 10,68 – 14,22).

U drugom segmentu studije, izvršen je razvoj računarskih modela za predviđanje transporta posredovanog Pgp-om i BCRP-om, čiji je cilj bio da omoguće dizajn i optimizaciju novih jedinjenja koja ne bi predstavljala supstrate ovih transportera, i koja bi time imala manji rizik od razvoja rezistencije. Prikupljeni su visoko konzistentni setovi podataka korišćenjem jasno definisanih kriterijuma za procenu pouzdanosti dostupnih eksperimentalnih podataka. Korišćenjem ovih setova i dve različite metode mašinskog učenja (veštačke neuronske mreže i *support vector machines*) razvijeni su modeli čije su prediktivne performanse interno i eksterno validirane. Validacijom je pokazano da predstavljeni modeli imaju uravnotežen odnos senzitivnosti i specifičnosti predviđanja, prosečnu tačnost ~ 80% i primenjivost u velikom delu hemijskog prostora od značaja za medicinsku hemiju. Istaknuta je interpretabilnost deskriptora uključenih u finalne modele u kontekstu njihove primenjivosti u optimizaciji struktura novodizajniranih jedinjenja. Takođe, izvršena je analiza supstratnog preklapanja Pgp-a i BCRP-a koja je ukazala na postojanje veoma ograničenog hemijskog prostora u kojem se mogu naći jedinjenja koja nisu supstrati nijednog od ova dva transportera. Razvoj i validacija ovih modela predstavljali su osnovu za modifikacije strukture novodizajniranih jedinjenja u trećem segmentu studije.

U poslednjem delu studije, izvršena je implementacija algoritma za *de novo* dizajn hemijskih struktura koji omogućava istovremenu optimizaciju u prostoru više ciljeva dizajna. Opisani algoritam omogućava dizajn struktura podudarnih sa definisanom farmakofornom hipotezom, koje bi istovremeno trebalo da budu sintetski dostupne i da poseduju adekvatne fizičko-hemijske karakteristike. Farmakoforne hipoteze korišćene u dizajnu dobijene su iz kompleksa simuliranih primenom MD, a u proceni farmakoforne sličnosti korišćena je i sličnost oblika dizajniranih struktura sa bioaktivnim konformacijama inhibitora.

Primenom algoritma za *de novo* dizajn, formirana je kolekcija od 2.237 struktura, koja je filtrirana u nekoliko koraka u cilju identifikovanja optimalnih struktura za računarski zahtevnije simulacije MD. Filtriranjem su uklonjene potencijalno promiskuitetne strukture i strukture neadekvatnih fizičko-hemijskih karakteristika. U finalnom koraku, korišćenjem molekulskog dokinga na više konformacija EZH2, odabrano je 11 struktura za MD simulacije. Od ovih 11 struktura, 5 je pokazalo zadovoljavajuću energiju vezivanja, procenjenu MM/GBSA metodom. Odabrane strukture poseduju sličnost sa poznatim inhibitorima u načinu interakcije sa vezivnim mestom, ali istovremeno predstavljaju suštinski različite hemotipove u odnosu na sve poznate inhibitore. Za svih 5 struktura predložene su dalje strukturne modifikacije koje mogu potencijalno usloviti povećanje afiniteta za EZH2.

U poslednjem delu studije, prikazana je optimizacija jedne od struktura (PHB-00471), za koju je predviđeno da predstavlja dualni supstrat Pgp-a i BCRP-a. Kao cilj optimizacije definisan je dizajn Pgp nesupstrata koji će zadržati afinitet za EZH2. Opisano je nekoliko ciklusa strukturnih modifikacija koje su bile vođene analizom senzitivnosti deskriptora u razvijenom Pgp modelu i rezultatima dodatnih simulacija MD. Kao rezultat optimizacije dobijena je struktura PHB-00471m, za koju je predviđeno da nije supstrat Pgp-a i da ima bolju energiju vezivanja za EZH2, pri čemu je njena molekulska masa neznatno uvećana a fizičko-hemijske karakteristike ostale su u prihvatljivim okvirima.

3. Uporedna analiza rezultata kandidata sa podacima iz literature

EZH2 je protein lizin metiltransferaza čija su prekomerna ekspresija i mutacije katalitičkog domena dovedene u vezu za većim brojem maligniteta kod ljudi. Tokom 2012. godine u literaturi su objavljene prve strukture kofaktor-kompetitivnih inhibitora EZH2 čija je biološka evaluacija potvrdila terapijski potencijal inhibicije ovog epigenetskog enzima [1–3]. Tri inhibitora EZH2 trenutno se nalazi u kliničkim ispitivanjima kao potencijalna terapija određenih formi hematoloških maligniteta. Od objavljivanja prvobitnih struktura, koje su bazirane na piridonskom jezgru, u literaturi je evidentno interesovanje za otkriće novih hemotipova inhibitora EZH2, kao potencijalnih antitumorskih lekova [4–6]. U ostvarenju ovog cilja, do sada je gotovo isključivo korišćen eksperimentalni skrining kolekcija sintetisanih jedinjenja, pri čemu je optimizacija inicijalnih molekula, najčešće aktivnih u visokom mikromolarnom opsegu, vršena klasičnim metodama medicinske hemije. Verovatan razlog za dominantnost ovog pristupa jeste činjenica da dostupne kristalne strukture

katalitičkog domena EZH2 [7,8] nisu kompletne niti dovoljno informativne za dizajn baziran na strukturi ciljnog mesta. Neuspeh u kokristalizaciji poznatih inhibitora sa EZH2 istovremeno znači da strukturna osnova aktivnosti ovih jedinjenja do sada nije razjašnjena [9].

Model kompletnog vezivnog mesta za kofaktor sa struktuiranim post-SET domenom koji je predložen u ovoj studiji dobro se slaže sa poznatim činjenicama o strukturama protein lizin metiltransferaza (PKMT) sa SET domenom [10]. Zaključci studije o ulozi post-SET domena u stabilizaciji liganada značajni su u kontekstu racionalnog dizajna novih molekula selektivnih ne samo za EZH2, već i za druge predstavnike PKMT familije. Dobijeni rezultati o načinu vezivanja poznatih inhibitora za EZH2 potkrepljeni su rezultatima biohemijske karakterizacije ovih jedinjenja iz literature, a stepen slaganja između izračunatih i eksperimentalnih energija vezivanja u nivou je koji je očekivan za primenjenu metodu [11]. Strukturna racionalizacija aktivnosti piridonskih inhibitora EZH2 izvršena u ovoj studiji do sada nije opisana u literaturi, i veoma je korisna u daljem razvoju i otkriću inhibitora ovog terapijski značajnog ciljnog mesta dejstva.

Novije studije pokazale su da piridonski inhibitori EZH2 predstavljaju supstrate za Pgp i BCRP [12], što može uticati na njihovu distribuciju u organizmu a potencijalno i efikasnost, odnosno može predstavljati osnovu za razvoj rezistencije na ove potencijalne antitumorske lekove [13]. Tokom razvoja tetrahidropiperidinskih inhibitora EZH2, aktivan efluks iz ćelija predstavljao je ograničavajući faktor za postizanje dobre ćelijske efikasnosti [4]. Ove činjenice upućuju da razmatranje afiniteta za Pgp i BCRP, omogućeno razvojem odgovarajućih klasifikacionih modela u ovoj studiji, ima dobru osnovu i značajno je u otkriću novih inhibitora. Prediktivne karakteristike prezentovanih modela uporedive su sa drugim modelima iz literature [14–16], i upućuju na njihovu korisnost u sklopu racionalnog dizajna novih struktura. Izložena analiza supstratnog preklapanja Pgp-a i BCRP-a daje originalan doprinos razumevanju izazova koji predstavlja dizajn lekova koji ne stupaju u interakciju sa membranskim transporterima.

De novo dizajn hemijskih struktura je sve češće korišćen pristup u otkriću novih bioaktivnih jedinjenja [17,18]. Implementacija algoritma za *de novo* dizajn prezentovana u ovoj studiji kombinuje više uspešnih pristupa iz literature [19–22] u jedinstvenu celinu. Opisani algoritam omogućava istovremenu optimizaciju više ciljeva dizajna i eksplicitno uzima u obzir sintetsku dostupnost dizajniranih struktura. Ovo su dva zahteva koja se u literaturi često ističu kao preduslov uspešne metode za *de novo* dizajn [23,24].

Strukture većine poznatih, selektivnih inhibitora EZH2 bazirane su na piridonskoj osnovnoj strukturi i imaju ograničenu hemijsku raznovrsnost, neki od njih i loše farmakokinetičke osobine, dok su inhibitori druge osnovne strukture pokazali ograničenu ćelijsku efikasnost. Stoga postoji objektivna potreba za otkrićem strukturno novih jedinjenja koja bi selektivno inhibirala EZH2, kako zbog njihove korisnosti u istraživanjima hemijske biologije tako i zbog njihovog terapijskog potencijala [25]. Strukture novih potencijalnih inhibitora EZH2 predloženih u ovoj studiji hemijski su jedinstvene u poređenju sa poznatim inhibitorima, a u literaturi do sada nije opisana primena *de novo* dizajna u otkriću kofaktor-kompetitivnih inhibitora EZH2. Takođe, pokazana mogućnost dizajna jedinjenja koja Pgp ne transportuje a koja mogu inhibirati EZH2 može biti veoma korisna u daljem razvoju efikasnih inhibitora ovog ciljnog mesta dejstva.

Literatura:

- [1] Verma SK, Tian X, LaFrance LV, Duquenne C, Suarez DP, Newlander KA, et al. Identification of Potent, Selective, Cell-Active Inhibitors of the Histone Lysine Methyltransferase EZH2. *ACS Med Chem Lett* 2012;3:1091–6. doi:10.1021/ml3003346.
- [2] Qi W, Chan H, Teng L, Li L, Chuai S, Zhang R, et al. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:21360–5. doi:10.1073/pnas.12103711110.
- [3] Knutson SK, Wigle TJ, Warholc NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, Klaus CR, et al. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol* 2012;8:890–6. doi:10.1038/nchembio.1084.
- [4] Nasveschuk CG, Gagnon A, Garapaty-Rao S, Balasubramanian S, Campbell R, Lee C, et al. Discovery and Optimization of Tetramethylpiperidiny Benzamides as Inhibitors of EZH2. *ACS Med Chem Lett* 2014;5:378–83. doi:10.1021/ml400494b.
- [5] Zhang L, Song X, Wang N, Zhao L, Feng Q, You X, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 1-methyl-3-oxo-2,3,5,6,7,8-hexahydroisoquinolins as potential EZH2 inhibitors. *RSC Adv* 2015. doi:10.1039/C5RA02365C.
- [6] Kung P-P, Huang B, Zehnder L, Tatlock J, Bingham P, Krivacic C, et al. SAH derived potent and selective EZH2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2015;25:1532–7. doi:10.1016/j.bmcl.2015.02.017.
- [7] Antonysamy S, Condon B, Druzina Z, Bonanno JB, Gheyi T, Zhang F, et al. Structural Context of Disease-Associated Mutations and Putative Mechanism of Autoinhibition Revealed by X-Ray Crystallographic Analysis of the EZH2-SET Domain. *PLoS ONE* 2013;8:e84147. doi:10.1371/journal.pone.0084147.
- [8] Wu H, Zeng H, Dong A, Li F, He H, Senisterra G, et al. Structure of the Catalytic Domain of EZH2 Reveals Conformational Plasticity in Cofactor and Substrate Binding Sites and Explains Oncogenic Mutations. *PLoS ONE* 2013;8:e83737. doi:10.1371/journal.pone.0083737.
- [9] Kaniskan HÜ, Konze KD, Jin J. Selective Inhibitors of Protein Methyltransferases. *J Med Chem* 2015;58:1596–629. doi:10.1021/jm501234a.

- [10] Campagna-Slater V, Mok MW, Nguyen KT, Feher M, Najmanovich R, Schapira M. Structural Chemistry of the Histone Methyltransferases Cofactor Binding Site. *J Chem Inf Model* 2011;51:612–23. doi:10.1021/ci100479z.
- [11] Hou T, Wang J, Li Y, Wang W. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Inf Model* 2011;51:69–82. doi:10.1021/ci100275a.
- [12] Zhang P, de Gooijer MC, Buil LCM, Beijnen JH, Li G, van Tellingen O. ABCB1 and ABCG2 restrict the brain penetration of a panel of novel EZH2-inhibitors. *Int J Cancer* 2015;n/a – n/a. doi:10.1002/ijc.29566.
- [13] Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:219–34. doi:10.1038/nrd1984.
- [14] Pinto M, Digles D, Ecker GF. Computational models for predicting the interaction with ABC transporters. *Drug Discov Today Technol* 2014;12:e69–77. doi:10.1016/j.ddtec.2014.03.007.
- [15] Montanari F, Ecker GF. Prediction of drug–ABC-transporter interaction — Recent advances and future challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;86:17–26. doi:10.1016/j.addr.2015.03.001.
- [16] Chen L, Li Y, Yu H, Zhang L, Hou T. Computational models for predicting substrates or inhibitors of P-glycoprotein. *Drug Discov Today* 2012;17:343–51. doi:10.1016/j.drudis.2011.11.003.
- [17] Schneider G. De novo design – hop(p)ing against hope. *Drug Discov Today Technol* 2013;10:e453–60. doi:10.1016/j.ddtec.2012.06.001.
- [18] Schneider G, Baringhaus K-H. De Novo Design: From Models to Molecules. In: Schneider G, editor. *Novo Mol. Des.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2013, p. 1–55.
- [19] Hartenfeller M, Zettl H, Walter M, Rupp M, Reisen F, Proschak E, et al. DOGS: Reaction-Driven de novo Design of Bioactive Compounds. *PLoS Comput Biol* 2012;8:e1002380. doi:10.1371/journal.pcbi.1002380.
- [20] Durrant JD, Lindert S, McCammon JA. AutoGrow 3.0: An improved algorithm for chemically tractable, semi-automated protein inhibitor design. *J Mol Graph Model* 2013;44:104–12. doi:10.1016/j.jmglm.2013.05.006.
- [21] Huang Q, Li L-L, Yang S-Y. PhDD: A new pharmacophore-based de novo design method of drug-like molecules combined with assessment of synthetic accessibility. *J Mol Graph Model* 2010;28:775–87. doi:10.1016/j.jmglm.2010.02.002.
- [22] Nicolaou CA, Apostolakis J, Pattichis CS. De Novo Drug Design Using Multiobjective Evolutionary Graphs. *J Chem Inf Model* 2009;49:295–307. doi:10.1021/ci800308h.
- [23] Nicolaou CA, Brown N. Multi-objective optimization methods in drug design. *Drug Discov Today Technol* 2013;10:e427–35. doi:10.1016/j.ddtec.2013.02.001.
- [24] Nicolaou CA, Kannas C, Loizidou E. Multi-Objective Optimization Methods in De Novo Drug Design. *Mini Rev Med Chem* 2012;12:979–87. doi:10.2174/138955712802762284.
- [25] Verma SK, Knight SD. Recent progress in the discovery of small-molecule inhibitors of the HMT EZH2 for the treatment of cancer. *Future Med Chem* 2013;5:1661–70. doi:10.4155/fmc.13.136.

4. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Kalinić M, Zloh M, Erić S. Structural insights into binding of small molecule inhibitors to Enhancer of Zeste Homolog 2. *J Comput Aided Mol Des* 2014;28:1109–28. doi:10.1007/s10822-014-9788-1.

(IF2013: 2,782; **M21**)

Erić S, **Kalinić M**, Ilić K, Zloh M. Computational classification models for predicting the interaction of drugs with P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. *SAR QSAR Environ Res* 2014;25:939–66. doi:10.1080/1062936X.2014.976265.

(IF2013: 1,924; **M21**)

Erić S, **Kalinić M**. Računarski modeli za predviđanje transporta lekova posredovanog P-glikoproteinom. *Arh Farm* 2015;65:89–114.

(**M53**)

Kalinić M, Zloh M, Erić S. Molecular Dynamics of Selective Inhibitors Complexed with Enhancer of Zeste Homolog 2. *APS UKPharmSci* 2014. September 8-10, 2014; University of Hertfordshire, Hatfield, UK.

(**M34**)

Erić S, **Kalinić M**, Ilić K. Computational models for predicting the transport of drug-like compounds by P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. 19th EuroQSAR: Knowledge Enabled Ligand Design. August 26-30, 2012; Vienna, Austria.

(**M34**)

Kalinić M, Zloh M, Erić S. Istraživanje molekularne osnove za selektivnu inhibiciju *Enhancer of Zeste Homologa 2* primenom molekularne dinamike i proračuna slobodne energije. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem. 15-19. oktobar 2014.; Beograd, Srbija.

(**M64**)

Kalinić M, Zloh M, Erić S. Razvoj klasifikacionih modela za predviđanje transporta lekova P-glikoproteinom i *Breast cancer resistance* proteinom primenom *support vector machine* metode. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem. 15-19. oktobar 2014.; Beograd, Srbija.

(**M64**)

5. Zaključak - obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

EZH2 je epigenetski enzim čija selektivna inhibicija predstavlja novu strategiju u terapiji određenih formi maligniteta. Strukturna osnova aktivnosti i selektivnosti do danas otkrivenih inhibitora EZH2 nedovoljno je poznata, što otežava razvoj strukturno novih jedinjenja koja će inhibirati ovaj enzim. Pored ograničene hemijske raznovrsnosti, poznati inhibitori EZH2 imaju suboptimalne farmakokinetičke karakteristike i supstrati su za membranske transportere, Pgp i BCRP, što može ograničiti njihovu distribuciju u organizmu i usloviti izostanak efikasnosti. Iz ovih razloga postoji objektivna potreba za otkrićem novih inhibitora EZH2, pri čemu bi u njihovom dizajnu trebalo razmatrati interakcije sa Pgp-om i BCRP-om. Predviđanje transporta posredovanog Pgp-om i BCRP-om, međutim, predstavlja značajan izazov usled polispecifičnosti ovih transportera i predmet je brojnih studija u literaturi.

Rezultati istraživanja ostvarenog u okviru ove disertacije daju doprinos razumevanju strukturnih odrednica selektivne inhibicije EZH2 i uspostavljaju racionalnu osnovu za dizajn novih inhibitora baziran na strukturi vezivnog mesta na enzimu. Pregledom literature ustanovljeno je da je ovo prva studija u kojoj je razvijen model celovitog vezivnog mesta EZH2 i u kojoj je sistematično, primenom simulacija molekularne dinamike, proučavana interakcija poznatih inhibitora sa ovim ciljnim mestom. Ovi nalazi zatim su upotrebljeni za uspostavljanje farmakofornog modela i *de novo* računarski dizajn potencijalnih inhibitora EZH2. Kao rezultat, predložene su strukture 5 potencijalnih inhibitora zasnovanih na osnovnim strukturama koje nisu zastupljene kod poznatih inhibitora. Predložene strukture stoga predstavljaju potencijalno nove hemotipove inhibitora ovog enzima. Razvijeni klasifikacioni modeli za predviđanje transporta posredovanog Pgp-om i BCRP-om pružili su doprinos definisanju hemijskog prostora u kojem je najveća verovatnoća pronalaženja supstrata ova dva transportera i omogućili su racionalnu modifikaciju strukture jednog od dizajniranih jedinjenja. Klasifikacioni modeli kao i model vezivnog mesta EZH2, razvijeni u ovoj studiji, mogu predstavljati racionalnu osnovu za optimizaciju poznatih i otkriće novih selektivnih inhibitora ovog terapijski značajnog ciljnog mesta dejstva.

Na osnovu izložene analize, Komisija smatra da je kandidat uspešno realizovao postavljene ciljeve istraživanja i predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj Izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod naslovom *Simulacije molekularne dinamike i računarsko dizajniranje inhibitora protein lizin metiltransferaze EZH2*, kandidata magistra farmacije Marka Kalinića.

U Beogradu,

10. septembar 2015. godine

Članovi Komisije:



dr. sc **Slavica Erić**, vanredni profesor (mentor)

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju



dr. sc **Vladimir Savić**, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za organsku hemiju



dr. sc **Mire Zloh**, redovni profesor

University of Hertfordshire, Department of Pharmacy (Hatfield, UK)