

**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 магистра фармације Милице Радан

На седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, одржаној 23.06.2022. године, Одлуком број 1348/2 именовани су чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације, кандидата маг. фарм. Милице Радан, под насловом:

„Одређивање структуре фармакофоре, дизајн и *in vitro* испитивање лиганда са вишеструким дејством као потенцијално ефикаснијих терапеутика сложених неуролошких и менталних обољења“.

Комисија у саставу:

- 1. Др сц. Теодора Ђикић-Стојшић, научни сарадник**
Laboratoire d’Innovation Thérapeutique,
UMR7200 CNRS-Université de Strasbourg, Strasbourg, France
- 2. Др сц. Катарина Вучићевић, редовни професор**
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
- 3. Др сц. Милан Сенћански, виши научни сарадник**
Универзитет у Београду - Институт за нуклеарне науке „Винча“
Институт од националног значаја за Републику Србију
- 4. Др сц. Милкица Цревар, доцент**
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

прегледала је приложену докторску дисертацију и подноси Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета следећи извештај.

ИЗВЕШТАЈ

1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација маг. фарм. Милице Радан, под називом: „Одређивање структуре фармакофоре, дизајн и *in vitro* испитивање лигананда са вишеструким дејством као потенцијално ефикаснијих терапеутика сложених неуролошких и менталних обољења“, написана је на 182 стране стандардног формата (проред 1; фонт *Times New Roman* - 12) и подељена на следећа поглавља: 1. Увод, 2. Циљ рада, 3. Експериментални део, 4. Резултати и дискусија, 5. Закључак, 6. Литература, 7. Прилози. Докторска дисертација на почетку садржи сажетак на српском и енглеском језику и садржај докторског рада, а на крају биографију кандидата, као и потписане следеће изјаве: Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу. Дисертација је написана јасним и прегледним стилем и садржи 60 слика/графика, 33 табеле и 390 литературних навода.

- **Увод докторске дисертације** је организован у неколико тематских целина које су подељене на четири потпоглавља. Најпре су представљени патофизиолошки механизми који су у основи неуролошких и менталних обољења, укључујући шизофренију, депресију, анксиозност, Алцхајмерову и Паркинсонову болест. У оквиру овог потпоглавља, детаљно је представљен утицај различитих неуротрансмитерских система, допаминских, серотонинских, хистаминских, глутаматних, адренергичких и имидазолинских, у патогенетским процесима сложених обољења централног нервног система (ЦНС). У другом потпоглављу су приказане основне информације о структури и функцији аминергичких Г-протеин спрегнутих рецептора (енг. *G-Protein Coupled Receptors*, GPCR), серотонинског 5-НТ_{2А}, допаминског D₂ и хистаминског Н₁ рецептора, као и серотонинског и допаминског транспортера и имидазолинских рецептора. Трећи део увода омогућава разумевање најважнијих компјутерских метода које се могу користити у процесу рационалног дизајна нових лекова са вишеструким деловањем у циљу развоја безбеднијих и ефикаснијих терапеутика неуролошких и менталних обољења. Детаљно су приказани основни теоријски принципи метода заснованих на структури лиганда (енг. *Ligand-Based Drug Design*, LBDD), које омогућавају детаљну анализу фармакофоре и формирање предикционих модела, метода заснованих на структури циљног места дејства (енг. *Structure-Based Drug Design*, SBDD), које омогућавају анализу лиганд-рецептор комплекса на молекулском нивоу, као и виртуелног скрининга (енг. *Virtual Screening*, VS) који омогућава претраживање великих база података. У четвртном потпоглављу су описане *in silico* и *in vitro* методе које се могу користити у раним фазама истраживања лекова у циљу процене пермеабилности једињења кроз крвно-мождану баријеру (КМБ), са

посебним освртом на физичко-хемијске и фармакокинетичке особине ЦНС активних једињења.

- Основни **циљ докторске дисертације** је био формирање интегративног приступа заснованог на примени *in silico* и *in vitro* метода у рационалном дизајну нових лекова за лечење сложених неуролошких и менталних обољења. Први подциљ обухвата развој протокола који интегрише *in silico* компјутерске методе засноване на тродимензионалној структури лиганда и циљног места дејства у процесу рационалног дизајна нових једињења са вишеструким дејством (енг. *multi-target*), која поседују дуалну антагонистичку активност на 5-HT_{2A} и D₂ рецепторима и смањен афинитет за H₁ рецептор. Други подциљ се односи на дефинисање структуре фармакофоре једињења са дуалним антагонистичким деловањем на 5-HT_{2A} и D₂ рецепторима, и повећаном селективношћу у односу на *off-target* H₁ рецептор, сагледавањем основних структурних карактеристика које утичу на испољавање активности и формирање кључних интермолекулских интеракција са аминокиселинама на циљним местима деловања. Трећи подциљ је усмерен на рационални дизајн и *in silico* оптимизацију нових дуалних антагониста 5-HT_{2A} и D₂ рецептора применом методе VS засноване на претраживању хемијских база фрагмената. Четврти подциљ обухвата формирање предиктивних и поузданих модела квантитативног односа структуре и активности (енг. *3D- Quantitative Structure-Activity Relationship*, 3D-QSAR) у циљу дефинисања структурних особина које су кључне за селективно деловање на имидазолинским I₂ рецепторима (I₂-IR) у односу на адренергичке α₂ рецепторе (α₂-AR). Овај подциљ такође подразумева предвиђање физичко-хемијских и фармакокинетичких особина испитиваних лиганата и предлагање структурних модификација за дизајн и оптимизацију нових једињења са потентним и селективним деловањем на I₂-IR. Пети подциљ ове докторске дисертације је усмерен на примену *in vitro* паралелног теста пермеабилности на вештачким мембранама (енг. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, ПАМПА) заједно са компјутерским *in silico* методама у проучавању пермеабилности кроз КМБ једињења која утичу на модулацију активности серотонинских и допаминских система у мозгу. Овај подциљ обухвата процену пермеабилности кроз КМБ дизајнираних дуалних антагониста 5-HT_{2A}/ D₂-R и бицикличних α-иминофосфоната, као селективних лиганата I₂-IR, применом формираног и валидираног хеометријског модела квантитативног односа структуре и особина (енг. *Quantitative Structure-Property Relationship*, QSPR).
- **Експериментални део** овог истраживања садржи преглед свих коришћених референтних стандардних супстанци и растварача, опреме, као и софтверских пакета. Детаљно су приказане компјутерске и експерименталне методологије које

су примењене у оквиру ове дисертације. Описане су и упоређене процедуре припреме система за симулације молекулске динамике (енг. *Molecular Dynamics*, MD), као и студије молекулског докинга. Приказани су поступци припреме и валидације 3D-QSAR модела за проучавање дуалних антагониста 5-HT_{2A} и D₂ рецептора, са смањеним афинитетом за H₁ рецептор. Представљен је протокол за селекцију најбољих структурних фрагмената за рационални дизајн нових ефикаснијих и безбеднијих дуалних антагониста 5-HT_{2A} и D₂ рецептора. Такође, описан је приступ у проучавању фармакофоре селективних лиганата имидазолинских I₂ рецептора. Пружен је увид у методологију проучавања пермеабилности кроз КМБ применом *in vitro* PAMPA теста једињења која утичу на модулацију активности серотонинске и допаминске неуротрансмисије у ЦНС-у. Описан је поступак рачунања молекулских дескриптора испитиваних једињења, као и формирања предиктивних и поузданих QSPR модела. Детаљно је описана теоријска основа и поступак припреме система за симулације усмерене молекулске динамике (енг. *Steered Molecular Dynamics*, SMD) које су коришћене за сагледавање процеса транслокације кроз КМБ на молекулском нивоу.

- **Резултати и дискусија** докторске дисертације су прегледно груписани у три главне целине уз приказ оригиналних слика и табела (31 слика и 18 табела). Прва целина обухвата детаљан опис резултата који су добијени комбиновањем метода заснованих на тродимензионалној структури лиганда и циљног места дејства у проучавању сложене 3D структуре фармакофоре дуалних антагониста 5-HT_{2A}/D₂ рецептора, са смањеним афинитетом за H₁ рецептор. У оквиру ове целине детаљно су описане и стратегије у рационалном дизајну нових дуалних антагониста. У другој целини је приказана интерпретација 3D-QSAR модела и *in silico* предвиђање ADMET (енг. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity*) особина бицикличних α -иминофосфоната, као селективних лиганата имидазолинских I₂ рецептора. Трећа целина обухвата приказ резултата који су добијени *in vitro* PAMPA анализом, QSPR моделовањем, као и SMD симулацијама лиганата који утичу на модулацију активности серотонинских и допаминских система у ЦНС-у. У оквиру ове целине извршено је предвиђање ефективне пермеабилности ($\log P_e$) кроз КМБ дизајнираних дуалних антагониста 5-HT_{2A}/D₂-R и селективних лиганата I₂-IR применом формираног и валидираног QSPR модела.
- **Закључак** докторске дисертације представља сажети приказ добијених резултата који су у складу са претходно постављеним циљевима истраживања.
- У оквиру поглавља **Литература** цитирано је 390 литературних референци.

- У поглављу **Прилози** наведене су табеле које припадају резултатима докторске дисертације као и листа скраћеница.
- Поглавље **Биографија** садржи кратку биографију кандидата.

2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У првом делу резултата докторске дисертације дефинисан је *in silico* протокол за развој ефикаснијих и безбеднијих лиганата који делују као дуални антагонисти 5-HT_{2A}/D₂ рецептора са смањеним афинитетом за *off-target* хистамински H₁ рецептор, комбиновањем метода заснованих на тродимензионалној структури лиганда и циљног места дејства. Испитивани сет података се састојао од структурно различитих антагониста 5-HT_{2A} и D₂ рецептора, који су преузети из ChEMBL базе података. На основу анализе главних компоненти (енг. *Principal Component Analysis*, PCA) једињења су груписана у три кластера: кластер 1 чине трициклични деривати дибензоциклохептена, тј. структурни аналози клозапина; кластер 2 чине деривати 1,2-бензоизотиазола, тј. структурни аналози зипразидона; и кластер 3 чине тетрациклични деривати хиноксалина, тј. структурни аналози луматеперона. У циљу проучавања конформационих стања 5-HT_{2A}, D₂ и H₁ рецептора након везивања структурно различитих лиганата примењене су симулације молекулске динамике. Различите аналитичке методе су коришћене за процену стабилности сваког комплекса рецептора са изабраним референтним једињењима кластера (клозапином, зипразидоном и луматепероном) током 50 ns трајања симулације. Одступања мања од 2 Å у израчунатим RMSD (енг. *Root-Mean Square Deviation*) вредностима за скелет протеина (енг. *backbone*), атоме лиганда и атоме аминокиселина из везивног места су указале да су формирано комплекси постигли равнотежно стање током времена трајања симулације и да нема значајних конформационих промена у испитиваним системима. Такође, стабилност проучаваних комплекса је додатно валидирана рачунањем SASA (енг. *Solvent Accessible Surface Area*) параметра, као и броја водоничних интеракција које се остварују током трајања симулације. Добијени резултати су указали на добро уклапање испитиваних лиганата у активним местима 5-HT_{2A}, D₂ и H₁ рецептора, без појаве значајних промена у броју водоничних веза које се формирају током 50 ns симулације. Израчунате вредности SASA параметра су додатно потврдиле поузданост резултата који су добијени симулацијама MD, указујући да аминокиселине из везујућег места не трпе значајне конформационе промене у фази продукције. Након што је доказано да сви испитивани комплекси остају стабилни током трајања симулације и да систем не подлеже значајним конформационим променама, добијени резултати су даље коришћени у студији молекулског докинга. Инактивне конформације проучаваних рецептора у комплексима са референтним лигандима, добијене након 50 ns симулације MD, су коришћене за формирање биоактивних конформација свих испитиваних лиганата. Наиме, у зависности

од кластера којем припадају, испитивана једињења су докована у одговарајућу конформацију рецептора након симулације MD. Финалне конформације лиганата су изабране на основу израчунате енергије везивања и конформационог преклапања са референтним једињењем.

Биоактивне конформације лиганата генерисане према претходно описаној методологији су даље коришћене за рачунање специфичних GRID независних дескриптора (енг. *GRID Independent Descriptors*, GRIND) и студију 3D-QSAR моделовања. Применом програма *Pentacle* формирана су три различита 3D-QSAR модела која су омогућила дефинисање зависности између структурних особина испитиваних антагониста и њихове активности на 5-HT_{2A}, D₂ и H₁ рецепторима. Опсежна статистичка анализа рачунањем параметара интерне (R^2 и $Q^2 > 0,5$; ниске RMSEE вредности) и екстерне (R^2_{pred} , r^2_m , $r^2_{m^2}$ и $\bar{r}^2_m > 0,5$; $\Delta r^2_m < 0,2$; $RMSEP \leq 2 \times RMSEE$) валидације је потврдила предиктивност и робустност формираних модела који могу да се користе за поуздано квантитативно предвиђање антагонистичке активности дизајнираних лиганата на 5-HT_{2A}, D₂ и H₁ рецепторима.

На основу PLS (енг. *Partial Least Square Regression*) анализе издвојене су GRIND варијабле са најзначајнијим утицајем на pKi вредности за 5-HT_{2A} рецептор (5-HT_{2A}-R): TIP-TIP (var263, var257), DRY-TIP (var447, var460), DRY-N1 (var379), DRY-O (var288), N1-N1 (var176), O-N1 (var510) и N1-TIP (var644, var662). У оквиру сваког кластера извршена је детаљна интерпретација поменутих варијабли, узимајући у обзир најактивније и најмање активно једињење. Уочено је да већина потентних једињења из кластера 2 и 3 поседује варијабле које дефинишу оптималну удаљеност између крајњих хидрофобних и стерних центара. Поред тога, присуство O и N1 проба, чије варијабле позитивно корелишу са проучаваним pKi вредностима, је указало на важност донора и акцептора водоничне везе код високо активних антагониста 5-HT_{2A}-R. Применом молекулског докинга идентификоване су аминокиселине које су кључне за формирање интеракција са активним местом 5-HT_{2A}-R. Бочни остаци аминокиселина Thr160^{3,37} и Asn363^{7,35} су одговорни за формирање водоничне везе са потентним лигандима из кластера 2, док је Asp155^{3,32} одговорна за формирање електростатичке интеракције са протониваним азотом пиперазинског линкера свих проучаваних једињења. Додатно су идентификоване аминокиселине које формирају горњи и доњи хидрофобни цеп у везивном месту 5-HT_{2A}-R и учествују у хидрофобним интеракцијама са хетероцикличним групама испитиваних лиганата. Резултати студије молекулског докинга су показали висок степен слагања са закључцима 3D-QSAR анализе. Дефинисане лиганд-рецептор интеракције су у складу са издвојеним GRIND варијаблама из 3D-QSAR модела за 5-HT_{2A}-R. У оквиру овог дела истраживања анализирани су и сулфонилпиридински деривати који поседују високу активност на нивоу 5-HT_{2A}-R. Специфичност ове групе једињења се огледа у недостатку протониваног азота у структури. 3D-QSAR анализа и студија молекулског докинга су указале да присуство протониваног азота није неопходно за активност, али потенцијално може имати важну улогу у стабилизацији лиганд-рецептор комплекса.

Антагонистичка активност проучаваних једињења на нивоу D₂ рецептора (D₂-R) је анализирана формирањем 3D-QSAR модела и издвајањем најважнијих GRIND варијабли са позитивним и негативним утицајем: DRY-DRY (var43), DRY-TIP (var422, var440), DRY-O (var296), N1-N1 (var149), O-N1 (var470), N1-TIP (var635) и O-TIP (var534, var551, var563). На основу детаљне интерпретације проучаваних варијабли у оквиру сваког кластера, могуће је закључити да је висока активност проучаваних лиганада на D₂-R такође условљена присуством хидрофобних и стерних центара на оптималном растојању. 3D-QSAR анализа је указала на важност присуства донора и акцептора водоничне везе у структури потентних антагониста D₂-R. Студијом молекулског докинга дефинисане су кључне интеракције између проучаваних лиганада и група бочних остатака аминокиселина у активном месту D₂-R. Уочено је да аминокиселина на позицији 7.35, Ser409, учествује у формирању водоничне везе са донорским групама високо активних једињења кластера 2, док Asp114^{3,32} остварује електростатичку интеракцију са протониваним азотом из пиперазинског прстена. Наведене интеракције су у складу са варијаблама које су описане О и N1 пробама из 3D-QSAR студије. Једињења из кластера 2 и 3 су показала повољно уклапање у активно место D₂-R, остварујући хидрофобне интеракције са аминокиселинама из горњег и доњег хидрофобног цепа, које одговарају хидрофобним пробама из 3D-QSAR студије.

Један од циљева овог истраживања се односи на развој лиганада са вишеструким дејством (енг. *multi-target*) која поседују оптималну антагонистичку активност на 5-HT_{2A} и D₂ рецепторима и смањен афинитет за H₁ рецептор (H₁-R). Антагонистичко деловање на H₁-R је праћено појавом метаболичких нежељених ефеката, укључујући дислипидемију, дијабетес и повећање телесне масе. Студије 3D-QSAR моделовања и молекулског докинга су омогућиле боље разумевање структурних особина једињења и дефинисање кључних интермолекулских интеракција које су значајне за рационални дизајн нових ефикаснијих и безбеднијих лекова за лечење неуролошких и менталних обољења. PLS регресијом су селектоване GRIND варијабле са најзначајнијим утицајем на антагонистичку активност на H₁-R: TIP-TIP (var217, var237), DRY-TIP (var398, var408), DRY-N1 (var343), DRY-O (var275), N1-N1 (var149), O-N1 (var458), N1-TIP (var599) и O-TIP (var534). Опсежном анализом добијених резултата и поређењем са претходно описаним 3D-QSAR студијама за 5-HT_{2A} и D₂ рецепторе, могуће је закључити да присуство два хетероциклична прстена на већем растојању негативно корелише са антагонистичким деловањем на H₁-R. Фармакофорном анализом је уочено да једињења из кластера 1, која поседују стерне и хидрофобне регије на краћем растојању, имају већи афинитет за H₁-R у поређењу са једињењима из кластера 2. Поред тога, анализом GRIND варијабли које описују присуство поларних група у једињењу је показано да донорски и акцепторски региони такође негативно корелишу са испитиваним рК_i вредностима за H₁-R. Коришћењем GPCR базе података (енг. *GPCR database*, GPCRdb) анализирани су аминокиселине у активним местима сва три проучавана рецептора. Одређене разлике у аминокиселинском саставу су уочене на позицијама 3.33 и 5.40 где су код H₁-R присутне поларне аминокиселине Tyr108

и Lys191, док је на позицији 7.35 присутна аминокиселина Met451, са хидрофобним својствима. Супротно томе, на позицији 7.35 код 5-HT_{2A} и D₂ рецептора су присутне поларне аминокиселине Asn363 (5-HT_{2A}-R) и Ser409 (D₂-R), које остварују важне водоничне интеракције са високо потентним једињењима и потенцијално могу утицати на постизање селективности и стабилизацију формираних лиганд-рецептор комплекса.

За све формиране 3D-QSAR моделе дефинисан је хемијски простор у оквиру ког је могуће извршити поуздано предвиђање антагонистичке активности на 5-HT_{2A}, D₂ и H₁ рецепторима. Применом *leverage* приступа генерисани су *Williams* графици где је уочено да испитивани антагонисти, који припадају дериватима дибензоциклохептена, 1,2-бензоизотиазола и тетрацикличног хиноксалина, не одступају ван дефинисаног домена применљивости. Према томе, закључено је да фармакофорна анализа представља основу за рационални дизајн дуалних антагониста 5-HT_{2A} и D₂ рецептора, са смањеним афинитетом за H₁-R, док формирану регресиони модели могу бити коришћени за поуздано предвиђање антагонистичке активности дизајнираних једињења на проучаваним рецепторима.

Комбиновањем метода заснованих на структури циљног места дејства и структури лиганда пружен је увид у најзначајније структурне карактеристике дуалних антагониста 5-HT_{2A} и D₂ рецептора, са смањеним афинитетом за H₁-R. Добијени резултати су указали да веће растојање између крајњих липофилних и стерних центара једињења, као и присуство два хетероциклична прстена са донорима и акцепторима водоничне везе на оптималном растојању, позитивно корелише са активношћу на 5-HT_{2A} и D₂ рецепторима, а негативно са везивањем за H₁-R. На основу фармакофорне анализе дефинисане су стратегије за рационални дизајн нових једињења. У циљу постизања иновативности у дизајну нових дуалних антагониста, применом *in silico* методе VS извршено је претраживање комерцијално доступних база фрагмената, *Enamine Essential Fragment Library* и *General Fragment Library*. Структурни фрагменти водећих (енг. *lead*) једињења, зипразидона, луматеперона и ChEMBL90882, су коришћени као основа за идентификацију нових хемијских структура које могу остварити повољно уклапање у активним местима проучаваних рецептора. Укупно је дизајнирано нових тридесет лиганада од којих су A2, B3 и C3 изабрани као најбољи кандидати за даља истраживања и оптимизацију. 3D-QSAR анализом је показано да изабрана дизајнирана једињења поседују висок ниво активности на 5-HT_{2A} и D₂ рецепторима, као и селективности у односу на H₁-R, у поређењу са водећим (енг. *lead*) једињењима. Студија молекулског докинга је потврдила њихово повољно уклапање у везивним местима проучаваних рецептора. *In silico* ADMET анализом је показано да дизајнирана једињења поседују оптималне физичко-хемијске и фармакокинетичке особине, указујућу на њихову потенцијално бољу ефикасност и безбедност у односу на водећа (енг. *lead*) једињења у погледу настанка метаболичких и кардиоваскуларних нежељених ефеката.

У другом делу резултата докторске дисертације приказана је детаљна анализа структуре фармакофоре селективних лиганата I₂-IR. У циљу дефинисања кључних структурних особина бицикличних α-иминофосфоната, које утичу на постизање оптималне активности на I₂-IR и селективности у односу на α₂-AR, формирана су два 3D-QSAR модела. Рачунањем статистичких параметара интерне и екстерне валидације показано је да формирано модели поседују поуздан метод за проучавање нових структурних аналога и предвиђање њихове активности на оба рецептора. Варијабле са најзначајнијим утицајем на испитиване pK_i вредности су указале да ароматична супституција бицикличне структуре (var19, var303, var355), као и присуство електронегативних супституената на оптималном растојању (var183), утичу на селективно деловање на I₂-IR. Супротно томе, повећање удаљености између хидрофобних и стерних центара ван дефинисаног опсега позитивно корелише са активношћу на α₂-AR (var355). *In silico* предвиђањем њихових ADMET особина показано је да увођење ароматичних супституената доприноси повећању logP вредности проучаваних α-иминофосфоната, као и већем афинитету за везивање за протеине плазме. У поређењу са идазоксаном, испитивана једињења су показала нижи ризик за испољавање токсичног деловања, док ниједно једињење није идентификовано као супстрат ефлуксног П-гликопротеина. Резултати постигнути у оквиру овог дела истраживања могу имати важну улогу у даљој оптимизацији селективних лиганата I₂-IR који представљају потенцијално нове лиганде за лечење когнитивних поремећаја сложених неуролошких и менталних обољења. Такође, формирано 3D-QSAR модели могу бити коришћени за поуздано предвиђање активности нових дизајнираних једињења у оквиру дефинисаног домена применљивости.

Трећи део резултата докторске дисертације обухвата приказ интегративног приступа у проучавању пермеабилности кроз КМБ једињења која утичу на модулацију активности серотонинских и допаминских система у мозгу. Испитивани сет се састојао од осамнаест једињења која су најпре коришћена за процену ефективне пермеабилности применом *in vitro* PAMPA теста. Сва испитивана једињења, укључујући нове hDAT супстрате као и остале лиганде који се користе у терапији неуролошких и менталних обољења изузев зипразидона, су класификована у групу високо пермеабилних ($\log P_e > -5,33$). Нижа $\log P_e$ вредност у односу на остала једињења је израчуната за зипразидон, који је груписан у ниско пермеабилне ($-6,14 < \log P_e (-5,88) < -5,66$). Добијени резултати су у складу са доступним експериментално одређеним вредностима logBB параметра.

Израчунате вредности $\log P_e$ параметра из PAMPA студије су даље употребљене у анализи квантитативног односа структуре и особина (QSPR). Молекулски дескриптори који описују геометријске, тополошке, конституционалне, електронске и физичко-хемијске особине испитиваних једињења су израчунати применом *Dragon* и *ADMET Predictor* софтвера. Три различите регресионе анализе, PLS, MLR (енг. *Multiple Linear Regression*) и SVM (енг. *Support-Vector Machine*), су коришћене за формирање модела који дефинишу математичку зависност између израчунате ефективне пермеабилности и

молекулских дескриптора који дефинишу структурне особине проучаваних једињења. Формирани QSPR модели су валидирани рачунањем параметара интерне и екстерне валидације, а најбољу тачност у предвиђању $\log P_e$ вредности за екстерни сет података (тест сет) је показао QSPR-SVM модел.

Молекулски дескриптори који су показали најзначајнији утицај на испитиване $\log P_e$ вредности су: H_{0p} (енг. *H autocorrelation of lag 0 / weighted by polarizability*) и SolvEMt_3D (енг. *Length of the solvation energy moment vector*). H_{0p} дескриптором су дефинисане тополошке и геометријске особине једињења изражене у функцији молекулске масе, поларизабилности, електронегативности и *Van der Waals* запремине. Највеће вредности овог дескриптора су израчунате за једињења са ниским $\log P_e$ вредностима, попут оланзапина и зипразидона. Супротно томе, ниске вредности H_{0p} су у корелацији са високом пермеабилношћу кроз КМБ тј. високим $\log P_e$ вредностима. Структурном анализом проучаваних једињења и израчунатих вредности H_{0p} дескриптора закључено је да присуство атома који имају високе вредности поларизабилности, попут хлора и сумпора, негативно утиче на пермеабилност кроз КМБ. Структурне модификације попут замене атома хлора са атом флуора, замена сулфонамидске функционалне групе са амидском, као и уклањање атома сумпора из структуре, могу бити од значаја у процесу оптимизације једињења која делују на нивоу рецепторских система у ЦНС-у. SolvEMt_3D дескриптор такође поседује негативно утицај на испитиване $\log P_e$ вредности, дефинишући утицај поларности једињења на пролазак кроз КМБ. Интерпретацијом најзначајнијих дескриптора пружен је увид у структурне особине које су кључне за пролазак испитиваних једињења кроз КМБ. Структурна и фармаколошка различитост испитиваног сета података дефинише квалитет и широку применљивост формираног QSPR-SVM модела, који може да се користи за брзо и поуздано предвиђање пермеабилности кроз КМБ нових структурних аналога који утичу на модулацију серотонинске и допаминске неуротрансмисије у мозгу.

У циљу сагледавања процеса транслокације кроз КМБ на молекулском нивоу, примењене су симулације усмерене молекулске динамике (SMD). Испитивана једињења су проучавана у систему који се састојао од молекула воде равномерно распоређених испод и изнад DOPC (енг. *1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) мембране. SMD симулације су се заснивале на повлачењу једињења кроз липидни двослој, који имитира КМБ, деловањем променљиве еластичне силе на атоме који се крећу константном брзином. Добијени резултати су приказани графички, дефинишући утицај примењене силе на свако једињење у функцији времена. Кретање једињења у воденој средини је праћено силом која је нижа од 150 pN. Улазак једињења у липидни двослој доводи до формирања јачих интеракција у систему, што последично утиче на повећање силе која делује на атоме једињења све док не изађе опет у водену средину. Високе вредности примењене силе су израчунате за ропинирол ($F_{\max} = 395,88$ pN), зипразидон ($F_{\max} = 348,53$ pN) и кветиапин ($F_{\max} = 334,69$ pN), који уједно поседују најниже $\log P_e$ вредности. Према томе, могуће је закључити да високе F_{\max} вредности негативно корелишу са проласком једињења кроз

КМБ. Проучавањем времена трајања симулације уочено је да се зипразидон највише задржава у мембрани (17 ns), док је hDAT супстрат (AM879/11741391) кроз липидни двослој прошао за 6 ns. Добијени резултати су у складу са израчунатим вредностима $\log P_e$ параметра из PAMPA студије. Примењене SMD симулације се могу користити за скрининг и процену релативне пермеабилности кроз КМБ структурно различитих једињења, али и као основа за сложене прорачуне слободне енергије у даљем истраживању.

Структурни и фармаколошки диверзитет једињења коришћених за формирање QSPR-SVM модела, као и потврђена екстерна предиктивност, су омогућили поуздано предвиђање ефективне пермеабилности дизајнираних дуалних антагониста 5-HT_{2A}/D₂-R, као и селективних лиганата I₂-IR кроз КМБ. На основу добијених резултата могуће је закључити да већина испитиваних једињења припада групи високо пермеабилних ($\log P_e > -5,33$), изузев дуалних антагониста C4, C14 и C17 који се класификују у групу средње пермеабилних једињења ($-5,66 < \log P_e < -5,33$).

3. УПОРЕДНА АНАЛИЗА СА РЕЗУЛТАТИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Поремећаји менталног здравља и неуролошка обољења су данас међу водећим узроцима нарушавања квалитета живота људи у свету. Комплексни патогенетски механизми који су у основи ових обољења су праћени дисфункцијом бројних неуротрансмитерских система у мозгу. Из тог разлога, једињења са вишеструким деловањем, која утичу на модулацију активности различитих рецепторских система, имају велики значај у развоју потенцијално ефикаснијих и безбеднијих лекова у терапији сложених неуролошких и менталних болести.

Потентни антипсихотици друге генерације, попут клозапина, зипразидона и рисперидона, своју ефикасност у лечењу симптома удружених са менталним поремећајима остварују антагонистичким деловањем на серотонинским 5-HT_{2A} и допаминским D₂ рецепторима [1]. Међутим, њихова активност на нивоу *off-target* хистаминског H₁ рецептора је праћена појавом метаболичких нежељених ефеката, укључујући повећање телесне масе, дислипидемију и хипергликемију [2, 3]. Из тог разлога, развој лиганата са оптималним антагонистичким деловањем на 5-HT_{2A} и D₂ рецепторима, и уједно смањеним афинитетом за H₁ рецептор, представља основу терапијске ефикасности и безбедности нових лекова за лечење неуролошких и менталних обољења. Луматеперон је нови лек из групе атипичних антипсихотика, недавно одобрен за лечење шизофреније и биполарног поремећаја, а тренутно у трећој фази клиничких испитивања за лечење униполарне велике депресије [4, 5]. Осим што делује као антагониста 5-HT_{2A} и D₂ рецептора, луматеперон утиче на модулацију глутаматне неуротрансмисије и инхибира поновно преузимање серотонина. Узимајући у обзир значајну ефикасност и безбедност у погледу кардиоваскуларних и метаболичких

нежељених ефеката, луматеперон представља важно водеће (енг. *lead*) једињење за развој нових лиганада са вишеструким деловањем.

У поређењу са претходним истраживањима која су се бавила применом компјутерских техника у проучавању антагониста 5-HT_{2A} и D₂ рецептора, ова докторска дисертација пружа јединствену свеобухватну анализу фармакофоре дуалних 5-HT_{2A}/D₂ антагониста узимајући у обзир активност на *off-target* хистаминском H₁ рецептору [6–8]. Дефинисање кључних структурних карактеристика које су одговорне за оптимално антагонистичко деловање на 5-HT_{2A} и D₂ рецепторима али и смањен афинитет за H₁ рецептор представља основу за рационални дизајн безбеднијих и ефикаснијих лекова за лечење сложених неуролошких и менталних обољења. Широко опсега активности и структурна различитост представљају главне бенефите испитиваног сета података који осигуравају добар квалитет и широку применљивост креираних 3D-QSAR модела. У односу на претходне студије које су се углавном заснивале на проучавању једне групе једињења, фармакофорна анализа у овом истраживању обухвата једињења која је могуће груписати у три кластера: трициклични деривати дибензоциклохептена (кластер 1), деривати 1,2-бензоизотиазола (кластер 2) и тетрациклични деривати хиноксалина (кластер 3) [8–10]. Проучавање механизма интеракције између биолошких рецептора и лиганада је у великој мери зависно од њихових почетних конформација [11]. Формирање биоактивних конформација испитиваних једињења комбиновањем метода заснованих на структури циљног места дејства представља основу за добијање поузданих 3D-QSAR модела [12, 13]. Полазећи од доступних ригидних тродимензионалних структура 5-HT_{2A}, D₂ и H₁ рецептора, симулације молекулске динамике су примењене у циљу проучавања конформационих промена након везивања структурно различитих антагониста. Инактивне конформације проучаваних рецептора у комплексима са референтним лигандима, клозапином, зипразидоном и луматепероном, добијене након 50 ns симулације MD су коришћене у студији молекулског докинга за генерисање биоактивних конформација свих испитиваних лиганада. Овим приступом омогућено је формирање 3D-QSAR модела који су показали значајно уклапање са резултатима докинг анализе. Селектоване GRIND варијабле су омогућиле препознавање кључних лиганд-рецептор интеракција [14–16], указујући на потенцијалну примену формираних модела за поуздано предвиђање активности дизајнираних дуалних 5-HT_{2A}/D₂ антагониста. На основу компаративне анализе резултата добијених из студије 3D-QSAR моделовања и студије молекулског докинга дефинисане су стратегије за дизајн нових дуалних антагониста 5-HT_{2A}/D₂ рецептора са смањеним афинитетом за H₁ рецептор. Последњих година, дизајнирање лекова засновано на фрагментима (енг. *Fragment Based Drug Design*, FBDD) заузима све већи значај у процесу оптимизације и развоја водећих (енг. *lead*) једињења [17, 18]. Претраживање великих база фрагмената применом метода VS омогућава идентификацију хемијских структура које поседују карактеристичан профил везивања за макромолекуле од интереса [19]. Овим истраживањем је пружен јединствен увид у структуру фармакофоре дуалних антагониста 5-HT_{2A}/D₂ рецептора са смањеним афинитетом за H₁

рецептор која је представљала основу за претраживање комерцијално доступних база фрагмената. Изабране структуре су коришћене као полазне основе за рационални дизајн нових дуалних антагониста са повољним физичко-хемијским и фармакокинетичким особинама.

Лиганди имидазолинских I₂ рецептора представљају потенцијално нову групу једињења за лечење когнитивних поремећаја сложених неуролошких и менталних болести [20]. С обзиром на то да још увек нису доступни подаци о структури везујућег места I₂-IR, проучавање потентних и селективних лиганата овог рецептора омогућава боље разумевање његовог фармаколошког деловања. Већина лиганата који делују на нивоу I₂-IR су 2-супституисани имидазолини (идазоксан, трацизолин, 2-BFI). У циљу истраживања нових лиганата заснованих на структури имидазолина развијена је група бицикличних α -иминофосфоната који су експериментално показали висок ниво активности на I₂-IR и селективности у односу на α_2 -AR [21]. Ово је прва студија која нуди детаљан опис структуре фармакофоре бицикличних α -иминофосфоната, пружајући увид у најважније структурне карактеристике које утичу на селективно деловање проучаваних лиганата на I₂-IR у односу на *off-target* α_2 -AR. Добијени резултати се могу користити у даљој оптимизацији једињења, док формирану 3D-QSAR модели могу имати потенцијалну примену у предвиђању активности нових структурних аналога.

Већина *in vivo* и *in vitro* техника које се користе у испитивању пермеабилности једињења кроз КМБ су временски веома захтевне, па из тог разлога постоји потреба за развојем брзих и економски исплативих метода које се заснивају на примени различитих *in silico* приступа. *In vitro* PAMPA модели имају широку примену у проучавању пасивне пермеабилности кроз КМБ малих липофилних молекула [22, 23]. Израчунате вредности $\log P_e$ параметра се могу користити за формирање предиктивних QSPR модела који омогућавају проучавање односа структуре и особина једињења, указујући на кључне молекулске дескрипторе који дефинишу утицај структурних особина на пролазак једињења кроз липидну мембрану у ЦНС-у. Различите методе линеарне и нелинеарне зависности се примењују за формирање математичких QSPR модела који захтевају процену тачности предвиђања рачунањем статистичких параметара валидације [24]. Регресиони модели формирану на овај начин се могу користити као брзе скрининг методе за предвиђање пермеабилности нових једињења која припадају дефинисаном домену применљивости, али и за предлагање структурних модификација у циљу њихове даље оптимизације.

У овој дисертацији први пут је испитана пермеабилност кроз КМБ нових супстрата допаминског транспортера (енг. *Dopamine Transporter*, DAT) чије модификације могу условити развој потенцијално нових једињења за лечење сложених неуролошких обољења [25]. Структурна и фармаколошка различитост осталих једињења из испитиваног сета података, која утичу на модулацију активности серотонинских и допаминских система у мозгу, је условила формирање поузданог, стабилног и валидираног QSPR модела са

широким доменом применљивости. Молекулски дескриптори са најзначајнијим утицајем на испитиване $\log P_e$ вредности, SolvEMt_3D и H_{OP} , дефинишу утицај тополошких особина, 3D геометрије и поларизабилности испитиваних једињења на пермеабилност кроз КМБ. Претходним студијама је такође показана важност електротополошких, геометријских, као и физичко-хемијских параметара на пролазак једињења кроз КМБ [22, 26–28]. Формирани и валидирани QSPR модел је употребљен за предвиђање ефективне пермеабилности кроз КМБ дизајнираних дуалних антагониста 5-HT_{2A}/D₂ рецептора и бицикличних α -иминофосфоната, као селективних лигананда I₂-IR.

SMD методологија има широку примену у проучавању различитих биолошких процеса, укључујући везивање лиганда за рецепторе, транспорт једињења кроз мембранске канале, као и испитивању пермеабилности лиганда кроз различите мембранске системе [29–33]. Проучавање пермеабилности кроз КМБ применом SMD методе омогућава разумевање процеса транслокације на молекулском нивоу. У оквиру ове дисертације први пут је на овај начин испитана пермеабилност кроз КМБ нових hDAT супстрата и осталих једињења са познатом ефикасношћу у лечењу неуродегенеративних и психијатријских обољења. Добијени резултати су обезбедили важне информације о силама које делују на систем током процеса транслокације, пружајући добру основу за даља истраживања у овој области [34].

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Miyamoto, S.; Duncan, G. E.; Marx, C. E.; Lieberman, J. A. Treatments for Schizophrenia: A Critical Review of Pharmacology and Mechanisms of Action of Antipsychotic Drugs. *Mol. Psychiatry*, **2005**, *10* (1), 79–104. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001556>.
- [2] Kroeze, W. K.; Hufeisen, S. J.; Popadak, B. A.; Renock, S. M.; Steinberg, S.; Ernsberger, P.; Jayathilake, K.; Meltzer, H. Y.; Roth, B. L. H1-Histamine Receptor Affinity Predicts Short-Term Weight Gain for Typical and Atypical Antipsychotic Drugs. *Neuropsychopharmacology*, **2003**, *28* (3), 519–526. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300027>.
- [3] Reynolds, G. P.; Kirk, S. L. Metabolic Side Effects of Antipsychotic Drug Treatment – Pharmacological Mechanisms. *Pharmacol. Ther.*, **2010**, *125* (1), 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.10.010>.
- [4] Syed, A. B.; Brašić, J. R. The Role of Lumateperone in the Treatment of Schizophrenia. *Ther. Adv. Psychopharmacol.*, **2021**, *11*, 204512532110340. <https://doi.org/10.1177/20451253211034019>.
- [5] Intra-Cellular Therapies. Intra-Cellular Therapies Announces US FDA Approval of Caplyta (Lumateperone) for the Treatment of Bipolar Depression in Adults. 2021.

- [6] Duan, X.; Zhang, M.; Zhang, X.; Wang, F.; Lei, M. Molecular Modeling and Docking Study on Dopamine D2-like and Serotonin 5-HT2A Receptors. *J. Mol. Graph. Model.*, **2015**, *57*, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2015.01.014>.
- [7] Möller, D.; Salama, I.; Kling, R. C.; Hübner, H.; Gmeiner, P. 1,4-Disubstituted Aromatic Piperazines with High 5-HT2A/D2 Selectivity: Quantitative Structure-Selectivity Investigations, Docking, Synthesis and Biological Evaluation. *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, *23* (18), 6195–6209. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.050>.
- [8] Zhang, C.; Li, Q.; Meng, L.; Ren, Y. Design of Novel Dopamine D2 and Serotonin 5-HT2A Receptors Dual Antagonists toward Schizophrenia: An Integrated Study with QSAR, Molecular Docking, Virtual Screening and Molecular Dynamics Simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2020**, *38* (3), 860–885. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1590244>.
- [9] Ahmadi, R.; Sepehri, B.; Ghavami, R.; Irani, M. Robust and Predictive QSAR Models for Predicting the D2, 5-HT1A, and 5-HT2A Inhibition Activities of Fused Tricyclic Heterocycle Piperazine (Piperidine) Derivatives as Atypical Antipsychotic Drugs. *J. Mol. Struct.*, **2022**, *1259*, 132753. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132753>.
- [10] Rathore, A.; Asati, V.; Mishra, M.; Das, R.; Kashaw, V.; Kashaw, S. K. Computational Approaches for the Design of Novel Dopamine D2 and Serotonin 5-HT2A Receptor Dual Antagonist towards Schizophrenia. *Silico Pharmacol.*, **2022**, *10* (1), 7. <https://doi.org/10.1007/s40203-022-00121-5>.
- [11] Daré, J. K.; Freitas, M. P. Is Conformation Relevant for <sc>QSAR</Sc> Purposes? <sc>2D</Sc> Chemical Representation in a <sc>3D-QSAR</Sc> Perspective. *J. Comput. Chem.*, **2022**, *43* (13), 917–922. <https://doi.org/10.1002/jcc.26848>.
- [12] Ruzic, D.; Petkovic, M.; Agbaba, D.; Ganesan, A.; Nikolic, K. Combined Ligand and Fragment-based Drug Design of Selective Histone Deacetylase – 6 Inhibitors. *Mol. Inform.*, **2019**, *38* (5), 1800083. <https://doi.org/10.1002/minf.201800083>.
- [13] Mukhtar, S.; Sajid Kiani, Y.; Jabeen, I. Molecular Docking Simulations and GRID-Independent Molecular Descriptor (GRIND) Analysis to Probe Stereoselective Interactions of CYP3A4 Inhibitors. *Med. Chem. Res.*, **2017**, *26* (10), 2322–2335. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1933-7>.
- [14] Kimura, K. T.; Asada, H.; Inoue, A.; Kadji, F. M. N.; Im, D.; Mori, C.; Arakawa, T.; Hirata, K.; Nomura, Y.; Nomura, N.; et al. Structures of the 5-HT2A Receptor in Complex with the Antipsychotics Risperidone and Zotepine. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2019**, *26* (2), 121–128. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0180-z>.
- [15] Wang, S.; Che, T.; Levit, A.; Shoichet, B. K.; Wacker, D.; Roth, B. L. Structure of the D2 Dopamine Receptor Bound to the Atypical Antipsychotic Drug Risperidone. *Nature*, **2018**, *555* (7695), 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature25758>.
- [16] Shimamura, T.; Shiroishi, M.; Weyand, S.; Tsujimoto, H.; Winter, G.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Cherezov, V.; Liu, W.; Han, G. W.; et al. Structure of the Human Histamine H1 Receptor Complex with Doxepin. *Nature*, **2011**, *475* (7354), 65–70.

<https://doi.org/10.1038/nature10236>.

- [17] de Souza Neto, L. R.; Moreira-Filho, J. T.; Neves, B. J.; Maidana, R. L. B. R.; Guimarães, A. C. R.; Furnham, N.; Andrade, C. H.; Silva, F. P. In Silico Strategies to Support Fragment-to-Lead Optimization in Drug Discovery. *Front. Chem.*, **2020**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00093>.
- [18] Bancet, A.; Raingeval, C.; Lomberget, T.; Le Borgne, M.; Guichou, J.-F.; Krimm, I. Fragment Linking Strategies for Structure-Based Drug Design. *J. Med. Chem.*, **2020**, *63* (20), 11420–11435. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00242>.
- [19] Yamaotsu, N.; Hirono, S. In Silico Fragment-Mapping Method: A New Tool for Fragment-Based/Structure-Based Drug Discovery. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **2018**, *32* (11), 1229–1245. <https://doi.org/10.1007/s10822-018-0160-8>.
- [20] Kotagale, N. R.; Taksande, B. G.; Inamdar, N. N. Neuroprotective Offerings by Agmatine. *Neurotoxicology*, **2019**, *73*, 228–245. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.05.001>.
- [21] Abás, S.; Rodríguez-Arévalo, S.; Bagán, A.; Griñán-Ferré, C.; Vasilopoulou, F.; Brocos-Mosquera, I.; Muguruza, C.; Pérez, B.; Molins, E.; Luque, F. J.; et al. Bicyclic α -Iminophosphonates as High Affinity Imidazoline I 2 Receptor Ligands for Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.*, **2020**, *63* (7), 3610–3633. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02080>.
- [22] Vucicevic, J.; Nikolic, K.; Dobričić, V.; Agbaba, D. Prediction of Blood–Brain Barrier Permeation of α -Adrenergic and Imidazoline Receptor Ligands Using PAMPA Technique and Quantitative-Structure Permeability Relationship Analysis. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2015**, *68*, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.12.014>.
- [23] Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. High Throughput Artificial Membrane Permeability Assay for Blood–Brain Barrier. *Eur. J. Med. Chem.*, **2003**, *38* (3), 223–232. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(03)00012-6).
- [24] Roy, K.; Kar, S.; Das, R. N. Statistical Methods in QSAR/QSPR. In *A Primer on QSAR/QSPR Modeling*; Springer, Cham, 2015; pp 37–59. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17281-1_2.
- [25] Djikic, T.; Martí, Y.; Spyrakis, F.; Lau, T.; Benedetti, P.; Davey, G.; Schloss, P.; Yelekci, K. Human Dopamine Transporter: The First Implementation of a Combined in Silico/in Vitro Approach Revealing the Substrate and Inhibitor Specificities. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2019**, *37* (2), 291–306. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1426044>.
- [26] Zhang, L.; Zhu, H.; Oprea, T. I.; Golbraikh, A.; Tropsha, A. QSAR Modeling of the Blood–Brain Barrier Permeability for Diverse Organic Compounds. *Pharm. Res.*, **2008**, *25* (8), 1902–1914. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9609-0>.
- [27] Subramanian, G.; Kitchen, D. B. Computational Models to Predict Blood–Brain Barrier Permeation and CNS Activity. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **2003**, *17* (10), 643–664. <https://doi.org/10.1023/B:JCAM.0000017372.32162.37>.

- [28] Nikolic, K.; Filipic, S.; Smoliński, A.; Kaliszan, R.; Agbaba, D. Partial Least Square and Hierarchical Clustering in ADMET Modeling: Prediction of Blood – Brain Barrier Permeation of α -Adrenergic and Imidazoline Receptor Ligands. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2013**, *16* (4), 622. <https://doi.org/10.18433/J3JK5P>.
- [29] Izrailev, S.; Stepaniants, S.; Isralewitz, B.; Kosztin, D.; Lu, H.; Molnar, F.; Wriggers, W.; Schulten, K. Steered Molecular Dynamics BT - Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas; Deuffhard, P., Hermans, J., Leimkuhler, B., Mark, A. E., Reich, S., Skeel, R. D., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1999; pp 39–65.
- [30] Pakdel, M.; Raissi, H.; Shahabi, M. Predicting Doxorubicin Drug Delivery by Single-Walled Carbon Nanotube through Cell Membrane in the Absence and Presence of Nicotine Molecules: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2020**, *38* (5), 1488–1498. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1611474>.
- [31] Patel, J. S.; Berteotti, A.; Ronsisvalle, S.; Rocchia, W.; Cavalli, A. Steered Molecular Dynamics Simulations for Studying Protein–Ligand Interaction in Cyclin-Dependent Kinase 5. *J. Chem. Inf. Model.*, **2014**, *54* (2), 470–480. <https://doi.org/10.1021/ci4003574>.
- [32] Pedram, M. Z.; Shamloo, A.; Alasti, A.; Zadeh, E. G. Steered Molecular Dynamic Simulation Approaches for Computing the Blood Brain Barrier (BBB) Diffusion Coefficient; 2015; pp 1699–1703. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19387-8_413.
- [33] Thai, N. Q.; Theodorakis, P. E.; Li, M. S. Fast Estimation of the Blood–Brain Barrier Permeability by Pulling a Ligand through a Lipid Membrane. *J. Chem. Inf. Model.*, **2020**, *60* (6), 3057–3067. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00834>.
- [34] Bennion, B. J.; Be, N. A.; McNerney, M. W.; Lao, V.; Carlson, E. M.; Valdez, C. A.; Malfatti, M. A.; Enright, H. A.; Nguyen, T. H.; Lightstone, F. C.; et al. Predicting a Drug’s Membrane Permeability: A Computational Model Validated With in Vitro Permeability Assay Data. *J. Phys. Chem. B*, **2017**, *121* (20), 5228–5237. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b02914>.

4. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДИСЕРТАЦИЈЕ

Списак радова који чине део докторске дисертације

1. Abás, S., Rodríguez-Arévalo, S., Bagán, A., Griñán-Ferré, C., Vasilopoulou, F., Brocos-Mosquera, I., Muguruza, C., Pérez, B., Molins, E., Luque, F. J., Pérez-Lozano, P., de Jonghe, S., Daelemans, D., Naesens, L., Brea, J., Loza, M. I., Hernández-Hernández, E., García-Sevilla, J. A., García-Fuster, M. J., **Radan, M.**, Djikic, T., Nikolic, K., Pallàs, M., Callado, L., Escolano, C. (2020). Bicyclic α -lminophosphonates as High Affinity Imidazoline I2 Receptor Ligands for Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(7), 3610–3633. (M21a, Chemistry, Medicinal (3/63) IF₂₀₂₀ = 7.446).
2. **Radan, M.**, Ruzic, D., Antonijevic, M., Djikic, T., & Nikolic, K. (2021). In silico identification of novel 5-HT2A antagonists supported with ligand- and target-based drug design methodologies. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 39(5), 1819–1837. Published online: 17 Mar 2020. (M22, Biochemistry/Molecular Biology (125/299) IF₂₀₁₈ = 3.310).
3. **Radan, M.**, Djikic, T., Obradovic, D., & Nikolic, K. (2022). Application of in vitro PAMPA technique and in silico computational methods for blood-brain barrier permeability prediction of novel CNS drug candidates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 168, 106056. (M21, Pharmacology & Pharmacy (74/279) IF₂₀₂₁ = 5.112)
4. **Radan, M.**, Djikic, T., & Nikolic, K. (2022). Discovery of new chemotypes of dual 5-HT2A/D2 receptor antagonists with a strategy of drug design methodologies. *Future Medicinal Chemistry*, 14(13), 963-989. (M22, Chemistry, Medicinal (21/63) IF₂₀₂₁ = 4.767).

Списак усмених саопштења М32

1. S. Rodríguez-Arévalo, A. Bagán, P. Pérez-Lozano, F. Vasilopoulou, C. Griñán-Ferré, M. Pallàs, B. Pérez, L. F. Callado, E. Hernández, J. M. García-Fuster, J. A. García-Sevilla, **M. Radan**, T. Djikic, K. Nikolic, J. Brea, M. I. Loza, L. Naesens, C. Escolano. Preclinical data on (2-imidazolin-4-yl) phosphonates. 19th National Meeting “New challenges in drug discovery”, Faculty of Pharmacy of the University of the Basque Country, Vitoria-Gasteiz (Spain). July 8-11, 2019.
2. **Milica Radan**, Mirjana Antonijevic, Teodora Djikic, Dusan Ruzic, Katarina Nikolic. Combined 3D-QSAR modeling, molecular dynamics and molecular docking studies in rational drug design of novel 5-HT2A antagonists. 8th International Conference on Computational Bioengineering (ICCB2019 Proceedings), Belgrade, Serbia. September 4-6, 2019.
3. **Milica Radan**, Dusan Ruzic, Mirjana Antonijevic, Teodora Djikic and Katarina Nikolic. Application of computational methods for antipsychotic drug design and optimization.

10th International Conference on Biotechnology and Bioengineering (ICBB2020). Dec. 16-18, 2020. Virtual (Video Online)

Списак међународних саопштења штампаних у изводу М34

1. **Radan M**, Antonijević M, Đikić T, Nikolić K, Agbaba D. Combined ligand and structure-based approach in search of 5-HT_{2A} receptor agonists and antagonists. VII Serbian Congress of Pharmacy with international participation; Belgrade, October 10-14, 2018. *Arh.farm* 2018;68: 389-390.
2. **Milica Radan**, Mirjana Antonijevic, Dusan Ruzic, Teodora Djikic, Danica Agbaba, and Katarina Nikolic. Structure and ligand based drug design strategies in the development of novel serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonists. 2nd Symposium in Biomedicine: Basic and Clinical Neuroscience, May, 2019. Belgrade, Serbia. p14
3. **Milica M. Radan**, Teodora M. Djikic, Dusan B. Ruzic, Katarina M. Nikolic. Rational drug design of novel 5-HT_{2A} antagonists. 7th Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia. 2nd November, 2019. p119
4. S. Rodríguez-Arévalo, S. Abás,^a A. Bagán, C. Griñán-Ferré, F. Vasilopoulou, I. Brocos-Mosquera,^b C. Muguruza, L. F. Callado, B. Pérez, J. Brea, M. I. Loza, E. Hernández-Hernández, J. A. García-Sevilla, M. J. García-Fuster, **M. Radan**, T. Djikic, K. Nikolic, C. Díaz, J. Pérez, C. Ramos, F. Vicente, E. Molins, M. Pallàs, and C. Escolano. A bicyclic α -iminophosphonate improves cognitive decline in 5xFAD murine model. Italian Young Medicinal Chemistry Virtual Meeting, 22-24 JULY, 2020.
5. **Milica Radan**, Dusan Ruzic, Mirjana Antonijevic, Teodora Djikic, and Katarina Nikolic. In silico rational drug design and modelling studies of novel 5-HT_{2A} receptor antagonists. EFMC-ISMIC & EFMC-YMCS Virtual Poster Session Powered by the EFMC Young Scientists Network, September 9, 2020.
6. **Milica Radan**, Dusan Ruzic, Mirjana Antonijevic, Teodora Djikic, and Katarina Nikolic. Discovery of new 5-HT_{2A} receptor antagonists with a strategy of combining ligand and target-based drug design methodologies. 3rd Meeting of the European Research Network on Signal Transduction: From the genomic to the systems level, October 12-14, 2020. Flash poster talk
7. **Milica Radan**, Dusan Ruzic, Mirjana Antonijevic, Teodora Djikic, Katarina Nikolic. Discovery of potential multi-target-directed 5-HT_{2A} receptor ligands. 4th ERNEST conference, virtual meeting, April 12-14, 2021.
8. Carmen Escolano, Abas Sonia, Sergio Rodriguez-Arevalo, Andrea Bagan, Christian Griñan-Ferre, Fotini Vasilopoulou, Merce Pallas, Pilar Perez-Lozano, Iria Brocos-Mosquera, Carolina Muguruza, Luis Callado, Belen Perez, Jose Brea, M Loza, Elena Hernandez-Hernandez, Jesus Garcia-Sevilla, M Garcia-Fuster, **Milica Radan**, Katarina Nikolic, Teodora Djikic, Caridad Diaz, Jose Perez del Palacio, Carmen Ramos, Francisca Vicente, Elies Molins. A bicyclic α -iminophosphonate improves cognitive decline in 5xFAD murine model of neurodegeneration. *The FASEB Journal* 35(S1), 2021.

9. Katarina Nikolic, **Milica Radan**, and Teodora Djikic. Discovery of new potent and selective 5-HT_{2A}/D₂ receptor antagonists with a strategy of drug design methodologies. The Fifth General Meeting of the European Research Network on Signal Transduction. University of Bari Aldo Moro, Bari, Italy. October 4-8, 2021.
10. **Milica Radan**, Teodora Djikic and Katarina Nikolic., Drug design strategies in discovery of new chemotypes of dual 5-HT_{2A}/D₂-R antagonists. 6th ERNEST conference, Building a Comprehensive Map of GPCR Signal Transduction. Virtual meeting. March 28-31, 2022

5. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Резултати докторске дисертације обухватају три тематске целине које се заснивају на примени *in silico* и *in vitro* метода у проучавању структурно различитих једињења која могу имати важну улогу у лечењу сложених неуролошких и менталних болести.

У првом делу овог истраживања формиран је *in silico* протокол за дизајн нових дуалних антагониста 5-HT_{2A} и D₂ рецептора, са смањеним афинитетом за H₁ рецептор, комбиновањем метода заснованих на тродимензионалној структури лиганда и циљног места деловања. Симулације молекулске динамике су пружиле увид у основна конформациона стања проучаваних лиганд-рецептор комплекса, чија је стабилност додатно валидирана рачунањем различитих аналитичких параметара (RMSD, SASA, број водоничних веза). Добијени резултати су примењени у студији молекулског докинга у циљу генерисања специфичних биоактивних конформација свих испитиваних лиганда, коришћених за 3D-QSAR студију. Овај приступ у формирању конформација лиганда доприноси иновативности у истраживању и већој поузданости резултата 3D-QSAR анализе у коју је на овај начин преко биоактивних конформација инкорпорирана информација и о интеракцији са циљним местом дејства. Наиме, добијени конформери су коришћени за формирање 3D-QSAR модела и селекцију специфичних GRIND дескриптора који дефинишу структурне детерминанте кључне за постизање дуалног антагонистичког деловања на 5-HT_{2A} и D₂ рецепторима, али и за постизање селективности у односу на *off-target* H₁ рецептор. Структурна различитост испитиване групе једињења значајно доприноси широкој применљивости формираних 3D-QSAR модела, док је опсежном статистичком анализом параметара интерне и екстерне валидације потврђена њихова поузданост у предвиђању. Сагледавањем утицаја најважнијих варијабли из 3D-QSAR анализе, као и кључних интермолекулских интеракција између проучаваних лиганд-рецептор комплекса, закључено је да веће растојање између крајњих липофилних и стерних центара једињења позитивно корелише са активношћу на 5-HT_{2A} и D₂ рецепторима, а негативно са везивањем за H₁ рецептор. Поред тога, позитиван ефекат на дуално 5-HT_{2A}/D₂ антагонистичко деловање је показало присуство хетероцикличног

прстена са особинама акцептора водоничне везе, који је етил пиперазинским линкером одвојен од другог прстена, који треба да поседује и акцепторске и донорске групе. Добијени резултати су послужили као основа за дефинисање стратегије за дизајн нових дуалних антагониста 5-HT_{2A} и D₂ рецептора, са смањеним афинитетом за H₁ рецептор. Виртуелним скринингом база фрагмената идентификоване су нове хемијске структуре које су коришћене у рационалном дизајну потенцијално ефикаснијих и безбеднијих лекова за лечење сложених неуролошких и менталних обољења. На основу предвиђених ADMET особина и резултата 3D-QSAR студије и студије молекулског докинга селектовани су кандидати, A2, B3 и C3, погодни за даљу синтезу и биолошка испитивања. Детаљна анализа фармакофоре испитиваних лиганада је омогућила разумевање деловања дуалних 5-HT_{2A}/D₂ антагониста на молекулском нивоу, пружајући најважније информације које се могу користити у процесу дизајна и оптимизације нових једињења. Такође, формиран 3D-QSAR модели се могу користити као брзе скрининг методе за предвиђање антагонистичког деловања дизајнираних једињења на 5-HT_{2A}, D₂ и H₁ рецепторима.

У другом делу резултата развијени су 3D-QSAR модели за дефинисање фармакофоре бицикличних α -иминофосфоната. Проучавањем њихове активности на имидазолинским I₂ и адренергичким α_2 рецепторима омогућено је разумевање утицаја одређених структурних особина које могу бити од значаја за постизање неуропротективног деловања ових лиганада. Селективна активност на I₂ рецептору доприноси њиховом пожељном фармаколошком деловању, док је деловање на α_2 рецепторима повезано са појавом нежељених ефеката. Из тог разлога, предложени модели могу бити од значаја у процесу оптимизације структуре нових селективних лиганада I₂-IR, али и у предвиђању њихове активности у раним фазама истраживања, пре процеса синтезе.

Трећи део ове докторске дисертације обухвата интеграцију *in vitro* и *in silico* метода у проучавању пермеабилности кроз КМБ једињења која утичу на модулацију активности серотонинске и допаминске неуротрансмисије у ЦНС-у. *In vitro* РАМПА тест је коришћен за процену ефективне пермеабилности испитиваног сета података, а добијени резултати су примењени у анализи квантитативног односа структуре и особина. Пермеабилност кроз КМБ нове групе hDAT супстрата, са потенцијалним неуропротективним деловањем, је први пут проучавана у овој студији. Добијени резултати су указали на висок ниво њихове пермеабилности кроз КМБ. Формирани QSPR-SVM модел, који је показао изузетне перформансе, је омогућио дефинисање утицаја молекулских дескриптора H_{0r} и SolvEMt_3D на проучаване logP_e вредности. Детаљна интерпретација поменутих дескриптора је указала на значајну улогу тополошких и геометријских особина, као и поларизабилности на пролазак једињења кроз КМБ. Структурна и фармаколошка различитост проучаваних једињења значајно доприносе широкој применљивости формираног QSPR-SVM, који може да се користи за брзо и поуздано предвиђање пермеабилности кроз КМБ нових једињења која припадају дефинисаном домену

применљивости. Из тог разлога, формиран модел је употребљен за предвиђање пермеабилности дизајнираних дуалних антагониста 5-HT_{2A}/D₂ рецептора и селективних лиганата I₂-IR, а добијени резултати су показали да већина једињења припада групи високо пермеабилних ($\log P_e > -5,33$). Додатна анализа испитиваних једињења применом SMD методе је омогућила разумевање процеса транслокације кроз КМБ на молекулском нивоу, а добијени резултати представљају важну основу за даља испитивања у сложеним прорачунима слободне енергије. Предложене методологије и процедуре представљају брзе, поуздане и економски прихватљиве приступе који могу имати важну улогу у раним фазама истраживања нових лекова за лечење сложених неуролошких и менталних обољења.

6. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу извештаја о провери оригиналности докторске дисертације коришћењем програма *iThenticate* регистровано подударање текста износи 9%. Овај степен подударности последица је претходно публикованих резултата истраживања докторанда, цитата, личних имена, општих места и података, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, извештај из програма *iThenticate* указује на оригиналност докторске дисертације.

Датум

06. 07. 2022.

Ментор

Проф. др Катарина Николић

Катедра за фармацеутску хемију
Универзитет у Београду - Фармацеутски Факултет

7. ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу изложеног, Комисија закључује да је кандидат магистар фармације Милица Радан успешно реализовала постављене циљеве истраживања и да резултати приказани у овој докторској дисертацији представљају значајан научни допринос у области Фармацеутске-медицинске хемије и структурне анализе.

Резултати докторске дисертације су публиковани у једном раду у врхунском међународном часопису (M21) и два рада у истакнутим међународним часописима (M22) где је Милица Радан први аутор, као и у једном раду објављеном у међународном часопису од изузетне вредности (M21a) где кандидат није међу прва три аутора, три усмена саопштења (M32) и 10 саопштења на међународним научним скуповима штампана у изводу (M34).

Комисија у наведеном саставу позитивно оцењује докторску дисертацију магистра фармације Милице Радан и предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај о израђеној докторској дисертацији и упути га Већу научних области медицинских наука, ради добијања сагласности за јавну одбрану докторске дисертације под називом:

„Одређивање структуре фармакофоре, дизајн и *in vitro* испитивање лиганата са вишеструким дејством као потенцијално ефикаснијих терапеутика сложених неуролошких и менталних обољења“.

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације

Др сц. Теодора Ђикић-Стојшић, научни сарадник
Laboratoire d'Innovation Thérapeutique,
UMR7200 CNRS-Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Др сц. Катарина Вучићевић, редовни професор
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

Др сц. Милан Сенћански, виши научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за нуклеарне науке „Винча“
Институт од националног значаја за Републику Србију

Др сц. Милкица Цревар, доцент
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

Београд, 06.07.2022.