

UNIVERZITET U BEOGRADU - FARMACEUTSKI FAKULTET

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE

Predmet: Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata magista farmacije Dušana Ružića

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, održanoj 10.3.2022. godine, Odlukom broj 499/2 imenovani su članovi Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije, kandidata mag. farm. Dušana Ružića, pod naslovom:

„Racionalni dizajn, sinteza i *in vitro* ispitivanja selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6 “.

Komisija u sastavu:

1. Dr sc. Olivera Čudina, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. Dr sc. Miloš Petković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr sc. Tatjana Srdić-Rajić, naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta sledeći izveštaj.

IZVEŠTAJ

1. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mag. farm. Dušana Ružića, pod nazivom „**Racionalni dizajn, sinteza i *in vitro* ispitivanja selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6**“, napisana je na 209 strana sa jednostrukim proredom i organizovana u sledećih 7 celina: **Uvod** (57 strana), **Ciljevi rada** (1 strana), **Eksperimentalni deo** (20 strana), **Rezultati i diskusija** (73 strane), **Zaključak** (4 strane), **Literatura** (21 strana) i **Prilozi** (26 strana). Na početku, doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku i sadržaj poglavlja/podpoglavlja, a na kraju kratku biografiju kandidata i potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije i korišćenju doktorske disertacije. Disertacija je napisana jasnim i preglednim stilom i sadrži 69 slika/grafika i 23 tabele. Pregled literature sadrži 316 navoda.

- **Uvod doktorske disertacije** sadrži detaljan pregled metoda racionalnog dizajna lekova, sa posebnim osvrtom na teorijske koncepte metoda dizajniranja lekova zasnovanih na trodimenzionalnim strukturama liganada, fragmenata i ciljnih mesta dejstva inhibitora histon deacetilaza. U drugom delu uvoda su prikazani osnovni pojmovi u vezi sa epigenetikom, kao i razvojem lekova u oblasti epigenetike. Prikazane su detaljne informacije o histon deacetilazama i izdvojeni podaci o strukturoj biologiji, fiziološkim i patološkim ulogama izoforme histon deacetilaze 6 (HDAC6). Prikazan je literaturni pregled poznatih selektivnih inhibitora HDAC6, kao i razmatranje strategija dizajniranja selektivnih HDAC6 inhibitora na osnovu trodimenzionalne strukture katalitičkog džepa HDAC6 enzima. U trećem delu uvoda su prikazane sintetske strategije za dobijanje derivata hidroksamskih kiselina, kao i mogućnosti sinteze zaštićenih derivata hidroksamskih kiselina. U poslednjem, četvrtom delu uvoda su prikazani biološki *in vitro* modeli za ispitivanje efekata novosintetisanih HDAC6 inhibitora, polazeći od *in vitro* enzimskih testova za određivanje polovine maksimalne inhibitorne koncentracije, IC₅₀. Dodatno, prikazani su modeli ispitivanja uticaja jedinjenja na vijabilnost tumorskih ćelija, na indukciju apoptoze, promene u ćelijskom ciklusu, kao i na promene u migratornim i invazivnim osobinama tumorskih ćelija dojke.
- **Osnovni cilj doktorske disertacije** je sinteza i biološka karakterizacija novih, nanomolarnih i selektivnih HDAC6 inhibitora koji pokazuju antikancerske efekte na *in vitro* modelima karcinoma dojke. Prikazano je šest međusobno sledljivih podciljeva disertacije. Prvi podcilj je priprema validnih i prediktivnih modela kvantitativnog

odnosa trodimenzionalne strukture i inhibitorne aktivnosti (3D-QSAR) za dva skupa jedinjenja, inhibitora humane histon deacetilaze 1 (HDAC1) i histon deacetilaze 6 (HDAC6). Drugi podcilj je bio kompjutersko dizajniranje novih, selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6. Drugi podcilj je podrazumevao integraciju saznanja dobijenih tumačenjem 3D-QSAR modela i pretragom novih fragmenata (cink-vezivnih grupa, kao i heterocikličnih i karbocikličnih jedinjenja) sa ciljem dizajniranja novih, selektivnih HDAC6 inhibitora. Treći podcilj su bile sinteze odabranih jedinjenja na osnovu računarskog dizajniranja HDAC6 inhibitora (derivati 1-difenilmetil piperazina i derivati 5,5-difenilimidazolidin-2,4-diona). Četvrti podcilj je bio određivanje inhibitornih koncentracija (IC_{50}) nosintetisanih jedinjenja na humanim HDAC1, HDAC3, HDAC6 i HDAC8 izoenzimima u bioluminogenim testovima. Peti podcilj je bio ispitivanje uticaja nosintetisanih i identifikovanih potentnih neselektivnih i selektivnih HDAC6 inhibitora na proapoptotske promene i promene u ćelijskom ciklusu ćelija tumora dojke (MDA-MB-231 i MCF-7) pri *in vitro* uslovima. Kao poslednji, šesti cilj je bio usmeren ka ispitivanjima uticaja izdvojenih jedinjenja na migratorne i invazivne osobine ćelija tumora dojke (MDA-MB-231 i MCF-7) u dvodimenzionalnim (*transwell*) testovima.

- **Materijali i metode** su prikazani kroz detaljne opise računarskih i eksperimentalnih metodologija, kao i pregleda korišćenih softverskih paketa, laboratorijske opreme i hemikalija. Materijali i metode su organizovani u šest podpoglavlja. Prvo podpoglavlje sadrži opise računarskih tehnika i metoda za pripremu 3D-QSAR modela za HDAC1 i HDAC6 inhibitornu aktivnost, kao i tehniku molekuskog dokinga za pripremu bioaktivnih konformacija ispitivanih HDAC inhibitora. Drugopodpoglavlje prikazuje protokol za odabir fragmenata, kao hetero- i karbocikličnih jedinjenja za dizajn novih, selektivnih HDAC6 inhibitora. U trećem podpoglavlju je prikazana priprema biblioteke fragmenata za virtuelnu pretragu novih cink-vezivnih grupa koje služe za dizajn selektivnih HDAC6 inhibitora. U četvrtom i petom podpoglavlju su prikazane procedure za sintezu derivata 1-(difenilmetil)-piperazina i derivata 5,5-difenilimidazolidin-2,4-diona. U šestom podpoglavlju su dati detaljni opisi protokola ispitivanja *in vitro* antikancerskih osobina nosintetisanih inhibitora histon deacetilaza na ćelijama tumora dojke (MDA-MB-231 i MCF-7).

U prvom podpoglavlju je dat opis pripreme dva 3D-QSAR modela pomoću poznatih inhibitora humanih histon deacetilaze i histon deacetilaze 6. Molekulskim dokingom u program GOLD 5.6.0. pripremljene su bioaktivne konformacije jedinjenja i izdvojene za pripremu 3D-QSAR modela koji opisuju HDAC1 i HDAC6 inhibitorne aktivnosti.

U drugom podpoglavlju je prikazan protokol pretrage novih fragmenata sličnih 1,8-naftalimidu iz dve virtuelne biblioteke u okviru baze jedinjenja *Life Chemicals*. Izračunati su deskriptori u Dragon softverskom paketu (*McGowan* zapremina, V_x , *Moriguchi* particioni koeficijent oktanol-voda, MLogP i ukupna površina fragmenta izračunata iz *van der Waals*-ovih prečnika $S_{a_{tot}}$) i upoređeni sa vrednostima 1,8-naftalimida. Cilj pretrage novih heterocikličnih i karbocikličnih fragmenata korišćen je u strategiji zamene naftalimidnog skeleta („*swapping cores*“) poznatog HDAC6 inhibitora skriptaida. Ovom strategijom su dizajnirana nova jedinjenja za računarska predviđanja i identifikaciju potencijalnih selektivnih HDAC6 inhibitora za sinteze.

U trećem podpoglavlju su korišćene biblioteke koje sadrže poznate cink-vezivne fragmenate (*Otava Chemicals* i ZINC baza) ili malih organskih molekula, da bi se identifikovale nove, nehidroksamske helatorske grupe. Ovakve cink-vezivne grupe mogu da posluže u dizajnu novih selektivnih HDAC6 inhibitora koji ne sadrže hidroksamsku kiselinu, kao najčešće sintetisanu cink-vezivnu grupu. Primenjen je virtuelni skrining zasnovan na trodimenzionalnoj strukturi katalitičkog džepa enzima HDAC6 u programu FLAP za izdvajanje potencijalnih cink-vezivnih grupa. Molekulskim dokingom u programu GOLD 5.6.0 su ispitane vezivne poze, orijentacija fragmenata i uspostavljanje cink-fragment interakcija u katalitičkim džepovima HDAC1, HDAC6, HDAC6 i HDAC8 izoformi. Vodeći se navedenim kriterijumima, najbolji kandidati su identifikovani i ispitana je njihova stabilnost u HDAC6 izoformi tehnikom molekulske dinamike.

U četvrtom podpoglavlju je dat opis korišćenih sintetskih prekursora, reagenasa, rastvarača i opreme za sintezu derivata 1-(difenilmetil)-piperazina. Prikazane su detaljne sintetske procedure za alkilaciju 1-(difenilmetil)-piperazina različitim bromometilestrima (Procedura A) i sintezu hidroksamskih kiselina (Procedura B).

U petom podpoglavlju je dat opis korišćenih sintetskih prekursora, reagenasa, rastvarača i opreme za sintezu derivata 5,5-difenilimidazolidina. Prikazane su detaljne sintetske procedure za sintezu 5,5-difenilimidazolidin-2,4-diona (korak 1), opšta procedura za alkilaciju 5,5-difenilimidazolidin-2,4-diona sa tri različita bromometilestra (korak 2), opšta procedura za hidrolizu metil estara (korak 3), opšta procedura za sintezu zaštićenih (cikličnih) derivata hidroksamske kiseline (korak 4) i opšta procedura za sintezu finalnih derivata hidroksamske kiseline.

U šestom podpoglavlju su detaljno navedeni oprema, enzimi, ćelijske kulture, standardi, hemikalije i rastvarači za izvođenje enzimskih i ćelijskih testova, kao i uslovi gajenja ćelija tumora dojke. Opisan je protokol za izvođenje *in vitro* bioluminogenih testova za ispitivanje polovine maksimalne inhibitorne koncentracije

(IC₅₀) na četiri izoforme histon deacetilaza (HDAC1, HDAC3, HDAC6 i HDAC8). Prikazani su protokoli ispitivanja na tumorskim ćelijama dojke, i to za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na vijabilnost ćelija kancera dojke (MTT test), na indukciju apoptoze ćelija kancera dojke (citometrijski test korišćenjem aneksina i 7AAD boje), na promene u mitohondrijskom membranskom potencijalu (citometrijski test korišćenjem JC-1 boje), na promene u ćelijskom ciklusu (citometrijski test korišćenjem propidijum jodida). Na kraju ovog podpoglavlja dati su opisi dvodimenzionalnih protokola za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na inhibiciju migracije i invazije ćelija kancera dojke (*transwell* migracioni i invazivni testovi, kao i *wound healing* test za ispitivanje migracije MCF-7 ćelija).

Navedene računarske i eksperimentalne metode su u potpunosti adekvatne za ispunjavanje predloženih ciljeva doktorske disertacije.

- **Rezultati i diskusija** doktorske disertacije prikazani su pregledno, korišćenjem originalnih grafičkih i tabelarnih prikaza (41 slika i 12 tabela). Rezultati su grupisani u deset celina. U prvoj celini je prikazana interpretacija 3D-QSAR modela za HDAC1 inhibitornu aktivnost, dok je u drugoj celini prikazana interpretacija 3D-QSAR modela za HDAC6 inhibitornu aktivnost. U trećoj celini je uporedno prikazana interpretacija najznačajnijih GRIND promenljivih zastupljenih u oba 3D-QSAR modela, dok je u četvrtoj celini prikazan rezultat ispitivanja domena primenljivosti generisanih 3D-QSAR modela. U petoj celini je prikazan način odabira potencijalnih selektivnih HDAC6 inhibitora razmatranjem računarskih predviđanja, isplativnosti sinteze, kao i fizičko-hemijskih osobina novodizajniranih jedinjenja. U šestoj celini je prikazano određivanje odnosa hemijske strukture i selektivne HDAC6 inhibicije primenom molekuskog dokinga. U sedmoj celini su prikazani rezultati *in silico* pretrage novih, nehidroksamskih cink-vezivnih grupa. U osmoj i devetoj celini su prikazani rezultati strukturne analize i fizičko-hemijska karakterizacije novosintetisanih derivata 1-(difenilmetil)-piperazina i 5,5-difenil-imidazolidin-2,4-diona. U desetoj celini su prikazani rezultati *in vitro* enzimskih i ćelijskih testiranja novosintetisanih HDAC6 inhibitora.
- **Zaključak** doktorske disertacije je prikazan sažeto, isticanjem inovativnosti rezultata i analizom najvažnijih rezultata koji su u skladu sa definisanim ciljevima istraživanja.
- U poglavlju **Literatura** u okviru doktorske disertacije navedeno je 316 referenci.

2. Opis postignutih rezultata

Rezultati ove doktorske disertacije podeljeni su u deset podpoglavlja i u skladu su sa postavljenim ciljevima istraživanja.

U podpoglavlju **4.1.** prikazani su i prodiskutovani rezultati formiranog 3D-QSAR modela koji opisuje HDAC1 inhibitornu aktivnost. Dobijeni 3D-QSAR model ima dobra prediktivna svojstva, što je okarakterisano statističkim parametrima interne validacije ($R^2=0,9$, $Q^2=0,61$, $RMSEE=0,302$), kao i eksterne validacije ($R^2_{pred}=0,744$, parametri r^2 metrike – r^2_m , $r^{2'}_m$, r_m^2 koji su veći od 0,5 i čija je greška predviđanja $RMSEP=0,276$). Na osnovu PLS regresione analize, izdvojeno je šest grupa GRIND promenljivih kao najuticajnijih na pK_{iHDAC1} . Te GRIND promenljive su: N1-N1 promenljiva (var211), TIP-TIP promenljive (var242, var281 i var293), DRY-TIP promenljiva (var503), O-N1 promenljiva (var583), O-TIP promenljiva (var 645) i N1-TIP promenljiva (var741).

U podpoglavlju **4.2.** prikazani su i prodiskutovani rezultati formiranog 3D-QSAR modela koji opisuje HDAC6 inhibitornu aktivnost. Dobijeni 3D-QSAR model ima dobra prediktivna svojstva, što je okarakterisano statističkim parametrima interne validacije ($R^2=0,91$, $Q^2=0,75$, $RMSEE=0,261$), kao i eksterne validacije ($R^2_{pred}=0,859$, parametri r^2 metrike – r^2_m , $r^{2'}_m$, r_m^2 koji su veći od 0,5 i čija je greška predviđanja $RMSEP=0,341$). Tumačenjem rezultata PLS regresione analize, izdvojeno je sedam najznačajnijih klasa GRIND deskriptora: O-O promenljive (var99 i var109), TIP-TIP promenljive (var234 i var246), DRY-O promenljiva (var303), DRY-N1 (var335), DRY-TIP promenljiva (var440), O-TIP promenljiva (var572) i N1-TIP (var630 i var641).

U podpoglavlju **4.3.** je prikazana komparativna analiza najznačajnijih GRIND nezavisnih promenljivih koje su zastupljene u oba 3D-QSAR modela (za HDAC1 i HDAC6 inhibitornu aktivnost). Zaključeno je da promenljive DRY-TIP (var440) i DRY-O (var303) iz HDAC6 3D-QSAR modela definišu hidrofobnost CAP grupe kao važnu determinantu za povećanje selektivnosti ka HDAC6 izoformi, odnosno pokazano je da hidrofobne CAP grupe utiču na smanjenje enzimske inhibicije jedarne HDAC1 izoforme. Pored hidrofobnosti, tumačenjem deskriptora iz grupe TIP-TIP u oba modela je sugerisano da i molekulska voluminoznost CAP grupe diktira selektivnost inhibitora ka HDAC6 izoformi. Na osnovu tri važne klase GRIND deskriptora (DRY-TIP, DRY-O i TIP-TIP) istaknuto je da identifikacija novih hidrofobnih i voluminoznih CAP grupa (u poređenju sa vodećim jedinjenjem skriptaidom) treba da bude ciljana strategija u dizajniranju novih HDAC6 selektivnih inhibitora. Tumačenjem DRY-O deskriptora u oba modela,

zaključeno je da dužina alifatičnog ugljovodoničnog niza predstavlja strukturnu karakteristiku koju je važno optimizovati sa ciljem da se dobiju selektivni HDAC6 inhibitori. Na osnovu analize najznačajnijih DRY-O deksriptora, predloženo je da u sintezi novih inhibitora budu sintetisani inhibitori i sa alifatičnim (broj ugljenikovih atoma od 1 – 7) i aromatičnim linkerom, kako bi se dobila ideja o odnosima strukture i selektivne HDAC6 inhibitorne aktivnosti (SAR selektivnih HDAC6 inhibitora).

U podpoglavlju **4.4.** je prikazan domen primenljivosti pripremljenih 3D-QSAR modela pomoću Williams-ovog dijagrama. Zaključeno je da jedinjenja koja čine *training* i test set u 3D-QSAR oba modela imaju *leverage* vrednosti koje su ispod granične (h^*) i ujedno njihovi standardizovani reziduali su u opsegu ± 3 standardne devijacije. Sa Williams-ovih dijagrama se može uočiti da ne postoje *outlier* jedinjenja (ona čija je hemijska struktura značajno različita od ostalih molekula koji definišu 3D-QSAR modele). Definisani su hemijski prostori u kome je moguće u budućim studijama dizajniranje novih HDAC6 inhibitora validno predvideti i izdvojiti potencijalne kandidate za sintezu.

U podpoglavlju **4.5.** je prikazana metoda za identifikaciju novih fragmenata, kao CAP grupa, u poređenju sa vrednostima deskriptora McGowan zapremina (V_x), Moriguchi particioni koeficijenta oktanol-voda (MLogP) i ukupne površina fragmenta izračunate iz van der Waals-ovih prečnika ($S_{a_{tot}}$) 1,8-naftalimida u strukturi skriptajda, kao šablona. S obzirom da nije moguće dodati fragmente u program Pentacle i izračunati njihove GRIND deskriptore, iskorišćen je program Dragon za računanje deskriptora koji imaju isti fizičko-hemijski značaj kao najuticajniji GRIND deskriptori (TIP-TIP, DRY-TIP, DRY-O). Konačni izbor fragmenata za sinteze je zasnovan i na proceni odnosa troškova za nabavku ili sintezu fragmenta i dostupne polazne mase fragmenta. Odabrana su dva fragmenta: 1-(difenilmetil)-piperazin (sinonim: 1-benzhidrilni piperazin) i 5,5-difenilimidazolidin-2,4-dion (koji je ujedno i lek fenitoin). Metoda pretrage fragmenata na osnovu deskriptorske sličnosti sa 1,8-naftalimidom, uz analizu troškovne isplativnosti fragmenata predstavlja jedan od stubova racionalnog dizajniranja selektivnih HDAC6 inhibitora u ovoj doktorskoj disertaciji.

U podpoglavlju **4.6.** je prikazana studija slučaja racionalizacije selektivnog HDAC6 inhibitornog profila derivata hidroksamske kiseline (jedinjenje B18), sintetisanog u saradnji sa istraživačima na Univerzitetu Poitiers, Francuska. Jedinjenje B18 predstavlja metil 1-((8-(hidroksiamino)-8-oksooktil)oksi)-2-naftoat i ispitivanjima enzimske HDAC inhibicije pokazano je da selektivno inhibira HDAC6 izoformu ($IC_{50}=95$ nM). Studijom molekuskog dokinga je objašnjen selektivan profil inhibicije drugog katalitičkog džepa HDAC6 izoforme u odnosu na sve ostale izoforme. Smatra se da je jedinjenje B18 selektivni inhibitor zbog voluminozne CAP grupe (naftalenski prsten interaguje hidrofobnim π - π interakcijama sa površinskim fenilalaninskim bočnim ostacima) i dodatno se stabilizuje na površini džepa π -sumpor interakcijom sa metioninom 682. Hidroksamska kiselina koordinira katalitički jon cinka Zn^{2+} bidentatno u aktivnom džepu

HDAC6. Pripremom doking protokola za ispitivanje vezivnih poza i orijentacija jedinjenja B18 u ostalim HDAC izoformama, dobijena je jedinstvena platforma za predviđanje vezivnih afiniteta novih derivata hidroksamskih kiselina na svih 11 metal-zavisnih HDAC izoformi.

U podpoglavlju **4.7.** je prikazana integrativna računarska studija identifikacije novih cink-vezivnih grupa koje mogu da unaprede strategije dizajniranja selektivnih HDAC6 inhibitora. Kombinacijom tehnika virtuelnog skrininga zasnovanog na trodimenzionalnoj strukturi ciljnog mesta (HDAC6 enzima), molekuskog dokinga i molekulske dinamike identifikovana je nova nehidroksamska cink-vezivna grupa, 2-aminometil-benzimidazol. Predviđeno je da 2-aminometil-benzimidazol bidentatno koordinira katalitički jon Zn^{2+} u katalitičkom džepu HDAC6 izoforme, dok je koordinacija jona Zn^{2+} u ostalim izoformama (HDAC1, HDAC4 i HDAC8) predviđena sa značajno manjim vrednostima funkcija vrednovanja (CSFF). Razmatrajući hemijsku strukturu predložene nove cink-vezivne grupe, zaključeno je da ona predstavlja hibridni fragment koji sadrži aromatični linker i cink-vezivnu grupu u strukturi.

U podpoglavljima **4.8.** i **4.9.** je prikazana strukturalna analiza i fizičko-hemijska karakterizacija novosintetisanih derivata 1-(difenilmetil)-piperazina i 5,5-difenilimidazolidin-2,4-diona. Metode koje su korišćene za rešavanje strukture novosintetisanih jedinjenja su NMR spektroskopije (1H NMR i ^{13}C NMR eksperimenti), kao i masena analiza visoke rezolucije (LC/ESI ToF masena spektrometrija). Uspešno je sintetisano svih 11 predloženih derivata na maloj sintetskoj skali (od polaznog materijala prosečne mase 100 mg), u zadovoljavajućim prinosima u opsegu od 17,86% do 64,03%.

U podpoglavlju **4.10.** je dat prikaz *in vitro* i *in vivo* biohemijskih testiranja i farmakološke karakterizacije antikancerske aktivnosti novositetisanih derivate. Rezultati *in vitro* određivanja inhibitorne koncentracije (IC_{50}) sintetisanih jedinjenja na četiri izoforme (HDAC1, HDAC3, HDAC6 i HDAC8) su izdvojila 7 nanomolarnih HDAC6 inhibitora od ukupno 11 derivata hidroksamskih kiselina sintetisanih u ovoj doktorskoj disertaciji (uspešnost, odnosno *hit rate* pri dobijanju HDAC6 inhibitora je 64%). Detaljnim tumačenjem profila HDAC inhibicije, identifikovana su tri jedinjenja (BDR-6, BDR-9 i FDR-2) koja imaju veće indekse selektivnosti nego polazno jedinjenje skriptaid (indeksi selektivnosti HDAC1/6 su redom 25,4; 47,5 i 73) u odnosu na indeks selektivnosti skriptaida HDAC1/HDAC6=6,5. Projekat racionalnog dizajniranja novih inhibitora je uspešno doprineo otkriću novih, malih organskih molekula, kao selektivnih HDAC6 inhibitora. Skriningom citotoksičnih aktivnosti novosintetisanih jedinjenja na dve ćelijske linije (trostruko negativne ćelije kancera dojke MDA-MB-231 i estrogeni receptor pozitivne ćelije kancera dojke MCF-7) pronađeno je da jedinjenja BDR-6, BDR-8, BP-8, BDR-9 i FDR-4 imaju umerene citotoksične efekte na ispitivanim ćelijama kancera dojke (srednja vrednost IC_{50} oko 50 μM). Najprominentniji efekat na indukciju apoptoze

kancerskih ćelija ima neselektivni, nanomolarni HDAC inhibitor BDR-8, dok selektivni HDAC6 inhibitori BDR-6 i BDR-9 dovode do indukcije apoptoze tek nakon 72 časa od tretiranja ćelija. Inhibitor BDR-8 (pri koncentracijama ispod njegove IC_{50} vrednosti 10 i 20 μ M) koncentraciono i vremenski zavisno indukuje ranu apoptozu, u obe ćelijske linije (preko 50% u MDA-MB-231 ćelijama i preko 30% u MCF-7 ćelijama nakon 72 sata). Smatra se da je najverovatniji mehanizam indukcije apoptotske kaskade u obe ćelijske kulture kancera dojke unutrašnji put apoptoze (promenom mitohondrijskog membranskog potencijala, $\Delta\Psi_m$). Jedinjenje BDR-8 pokazuje najdramatičniji pad $\Delta\Psi_m$ nakon tretiranja obe kancerske linije.

U pokušajima da se dodatno rasvetle mehanizmi antikancerskog efekta jedinjenja BDR-8, ispitivanjima promena u progresiji ćelijskog ciklusa na MCF-7 ćelija došlo se do zaključka da postoji zastoj u S i G2/M fazama ciklusa, uz koncentraciono zavisni porast nakupljanja MCF-7 ćelija u G2/M fazi. Tretiranjem MDA-MB-231 ćelija BDR-8 inhibitorom primećen je najveći procenat ćelija u sub-G1 fazi (pri koncentracijama od 10 i 20 μ M, ćelije su apoptotične), zbog čega se smatra da je primarni mehanizam BDR-8 jedinjenja indukcija apoptoze pri testiranim koncentracijama, nego zastoj u ćelijskom ciklusu.

Ispitivanjem antimigratornih i antiinvazivnih osobina jedinjenja BDR-8 u testovima *transwell migration* i *matrigel invasion* na MDA-MB-231 ćelijama, zaključeno je da neselektivni nanomolarni BDR-8 inhibitor inhibira u visokim procentima migratorna (68%) i invazivna (59%) svojstva ovih trostruko-negativnih ćelija kancera dojke. Iznenađujuće, selektivni HDAC6 inhibitor, jedinjenje BDR-9 na istim ćelijama ne pokazuje antimigratorne osobine. U migracionom testu (*wound-healing*) na MCF-7 ćelijama je dokazan značajan antimigratorni potencijal BDR-9 selektivnog HDAC6 inhibitora, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima o efektima selektivne inhibicije HDAC6 izoforme.

Kao glavni rezultat ove doktorske disertacije izdvaja se jedinstvena *in silico* platforma za identifikaciju i dizajn novih, selektivnih HDAC6 inhibitora kao malih organskih molekula. Ova platforma je u daljim istraživanjima translirana na sintetske strategije za ekonomično dobijanje novih, selektivnih HDAC6 inhibitora koji mogu da posluže kao hemijske probe za ispitivanje odnosa ciljno mesto delovanja-modulacija bolesti u budućim istraživanjima.

3. Uporedna analiza rezultata disertacije sa podacima iz literature

U okviru poglavlja Rezultati i diskusija, dobijeni rezultati istraživanja su detaljno analizirani i razmatrani u kontekstu dostupnih literaturnih podataka.

U prvom delu doktorske disertacije je obrazložena teorijska osnova i značaj pripreme 3D-QSAR modela u dizajniranju novih inhibitora. U periodu kad je autor disertacije objavio studiju dizajniranja selektivnih HDAC6 inhibitora (Ruzic et al., 2019), nisu postojale komparativne QSAR studije u kojima je prikazano poređenje strukturnih determinanata koje definišu selektivnost ka odgovarajućoj HDAC izoformi. Uvidom u bazu PubMed, pronađene su 64 publikacije u kojima su objavljene 3D-QSAR studije koje definišu HDAC inhibitornu aktivnost. Među pronađenim radovima, postoji 6 radova u kojima je pomoću 3D-QSAR studija spregnutim sa drugim *in silico* tehnikama pristupljeno problemu selektivnosti ka određenoj HDAC izoformi. Prvi pokušaji 3D-QSAR modelovanja inhibitora selektivnih za klasu II HDAC-ova su publikovani 2008. godine (**Ragno et al., 2008**). Nakon skoro jednu deceniju, publikovane su studije koje ispituju kvantitativne odnose strukture i HDAC2 (**Pham-The et al., 2017**), HDAC8 (**Kashyap & Kakkar, 2020a, 2020b**) i HDAC1 inhibitorne aktivnosti (**Sirous et al., 2020**). Među navedenim publikacijama, ne postoje studije u kojima su pripremljeni 3D-QSAR modeli za dve ili više HDAC izoenzimskih inhibitora. U skladu sa navedenim informacijama, u ovoj disertaciji je prvi put prikazano poređenje dva 3D-QSAR modela za grupe inhibitora jedarne izoforme HDAC1 i citoplazmatske izoforme HDAC6 i izvedeni su zaključci o strukturnim osobinama koje treba da poseduju jedinjenja da bi se povećala inhibitorna aktivnost ka HDAC6 enzimu, a smanjila inhibitorna aktivnost na HDAC1 izoformi. Konačno, zaključeno je da su hidrofobnost i molekulska zapremina CAP grupe, kao i priroda (alifatični i/ili aromatični) i dužina alifatičnog ugljovodoničnog linkera (optimalno 5 ugljenikovih atoma) glavne strukturne determinante koje treba da budu smernice za dizajniranje selektivnih HDAC6 inhibitora.

Problem dizajniranja selektivnih HDAC6 inhibitora se i dalje u krugovima medicinskih hemičara razmatra kao ambivalentan. Razlozi za sintezu i dizajniranje selektivnih HDAC6 inhibitora su:

- Bezbedniji profil selektivnih HDAC6 inhibitora u odnosu na neselektivne HDAC inhibitore (**Shah, 2019**).
- Zbog citoplazmatske lokalizacije, inhibitori HDAC6 izoforme ne pripadaju grupi citotoksičnih hemioterapeutika kada se primene u selektivnim koncentracijama (**Gaisina et al., 2016**).

Koristeći biofizičke metode, dve istraživačke grupe su 2016. godine priložile prve kristalografske strukture HDAC6 izoforme (**Hai & Christianson, 2016; Miyake et al., 2016**). Tada su istraživači Christianson i Hai deponovali nekoliko kristalnih struktura kompleksa HDAC6-inhibitor čije je poreklo bilo iz zebrica (*Danio rerio*, zebrafish). Zbog problema sa kristalizacijom mišje i humane HDAC6 izoforme u radu istih autora objavljena je i struktura humanog drugog katalitičkog domena (CD2) u kompleksu sa trihostatinom A (PDB:[5EDU](#)). Zbog visokih procenata identiteta i sličnosti u amino-kiselinskoj sekvenci između humane izoforme i izoforme dobijene iz zebrica, smatra se da je izučavanje kompleksa HDAC6–inhibitor iz zebrica validan i pouzdan model za računarske studije dizajniranja HDAC6 inhibitora (**Hai & Christianson, 2016**).

Poznato je na osnovu biofizičkih istraživanja (kristalografije zasnovana na X-zracima) da hidrofobne CAP grupe intereaguju sa manjim džepovima na površini HDAC6 enzima, čiju površinu određuju hidrofobne bočne rezidue amino kiselina (**Roche & Bertrand, 2016**). U saglasnosti sa prethodno definisanim osobinama površine katalitičkog džepa HDAC6 izoforme, u *in silico* istraživanjima u ovoj doktorskoj disertaciji je takođe pre i nakon objavljivanja kristalnih struktura pokazano da je hidrofobnost CAP grupe važna strukturalna determinanta koja doprinosi selektivnosti ka HDAC6 izoformi (**Ruzic et al., 2019**). Dodatno, nakon primene tehnike molekuskog dokinga, potvrđeno je da su izabrane hidrofobne CAP grupe u strukturama novodizajniranih inhibitora komplementarne sa malim, hidrofobnim džepovima na obodu katalitičkog HDAC6 džepa (**Bouchet et al., 2019**).

Sinteza novodizajniranih jedinjenja (derivata 1-difenilmetil piperazina) je izvedena najčešće korišćenom reakcijom za dobijanje derivata hidroksamskih kiselina, u kojoj se odgovarajući metil estri u baznoj sredini u metanolu kao rastvaraču konvertuju do derivata hidroksamske kiseline (Reddy et al., 2000; Butler et al., 2010).

Sinteza novodizajniranih derivata hidroksamskih kiselina iz klase derivata 5,5-difenilimidazolidin-2,4-diona je zbog nestabilnosti heterociklusa imidazolidin-2,4-diona (imidaska grupa u strukturi je nestabilna u prisustvu hidroksilamina) izvedena koristeći komercijalno dostupan donor hidroksilamina. Derivat koji je korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji je O-(tetrahidro-2H-piran-2-il)hidoksilamin, sličnom sintetskom procedurom koja je opisana za sintezu skriptaida, koji takođe sadrži imidsku grupu u strukturi (**Fleming et al., 2015**). Sinteza supstituisanih hidroksamata zasniva se na aktivaciji

karboksilne kiseline kuplujućim reagensima (najčešće EDC, 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid u obliku hidrohloridne soli) uz hidroksibenzotriazol (HOBt) u odgovarajućem rastvaraču (DCM, DMF). Intermedijerndi hidroksamata je često lipofilniji, pa ga je moguće hromatografijom na koloni izolovati i ukloniti polaznu karboksilnu kiselinu. Deprotekcija zaštićenog hidroksamata se izvodi uz korišćenje p-toluensulfonske kiseline (p-TsOH) (Alam, 2019).

Sintetisanih 11 derivata hidroksamskih kiselina u ovoj doktorskoj disertaciji su nova jedinjenja, koja ne mogu biti pronađena u dostupnim bibliotekama organskih jedinjenja, kao što su Enamine (**Enamine database**), SciFinder (**CAS SciFinderⁿ**), Life Chemicals (**Life Chemicals**). Uspešnost računarske studije dizajniranja inhibitora izoforme histon deacetilaze 6 može se statistički opravdati kroz koncept *hit rate*-a u otkriću lekova (Zhu et al., 2013) koji u ovoj disertaciji iznosi 64% (broj jedinjenja koja imaju nanomolarne vrednosti IC₅₀ na HDAC6 izoformi je 7 u odnosu na ukupan broj sintetisanih jedinjenja 11).

Zbog prethodno opisane citoplazmatske lokalizacije HDAC6 izoforme i implikacija u deacetilaciji proteina koji ulaze u sastav citoskeleta, očekivano je da inhibicija HDAC6 interferira sa procesima progresije tumora. Drugim rečima, selektivni HDAC6 inhibitori predstavljaju obećavajuću klasu inhibitora koji u precizno definisanim koncentracijama pri *in vitro* i *in vivo* uslovima treba da inhibiraju nastanak i diseminaciju metastatskog fenotipa maligne bolesti, pre nego da indukuju citotoksični efekat (Haggarty et al., 2003; Ling et al., 2018).

Razmatrajući *in vitro* enzimske rezultate, pokazano je da derivati koji sadrže alifatični linker (broj ugljenikovih atoma >5) i aromatični linker u strukturi jedinjenja doprinose nanomolarnom afinitetu jedinjenja ka HDAC6 izoformi (Porter et al., 2017; Wang et al., 2018). U saglasnosti sa rezultatima istraživačke grupe profesora Alana Kozikowskog (Gaisina et al., 2016) sintetisani selektivni HDAC6 inhibitori u ovoj doktorskoj disertaciji ne pokazuju izražen citotoksični efekat na ćelijama kancera dojke (jedinjenja BDR-6, BDR-9, tubastatin A) u poređenju sa potentnim neselektivnim HDAC inhibitorom (BDR-8). Male strukturne perturbacije u strukturi derivata 1-benzhidrilnog piperazina (promena dužine alifatičnog linkera) su doprinele razjašnjavanju odnosa hemijske strukture HDAC inhibitora i njihovog citotoksičnog efekta.

Konačno, za razliku od neselektivnog inhibitora BDR-8, selektivni inhibitori sintetisani i prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju proapoptotski efekat pri tretmanu ćelija kancera dojke na visokim koncentracijama. Koncentracije inhibitora korišćene u ovim istraživanjima su u rasponu od 10 – 75 µM, za koje se smatra da neselektivno inhibiraju i ostale HDAC izoforme u ispitivanim ćelijama (Depetter et al., 2019). Zbog toga selektivni HDAC6 inhibitori, pri navedenim eksperimentalnim uslovima, pokazuju

klasične epigenetičke antikancerske efekte (indukcija rane faze apoptoze preko unutrašnjeg puta, zastoj u ćelijskom ciklusu), sa posebnim akcentom da se ovi efekti ne uočavaju ranije od 72 sata nakon tretiranja kancerskih ćelija. Zbog svega navedenog, potrebno je u budućim istraživanjima tehnikom *western blot-a* odrediti selektivne koncentracije HDAC6 inhibitora *in vivo* pri kojima ne dolazi do hiperacetilacije histona H3 i H4, kao biomarkera inhibicije jedarnih HDAC izoformi (**Beyer et al., 2017**).

Konačno, u ovoj doktorskoj disertaciji su sintetisani selektivni HDAC6 inhibitori, kao jedinjenja sa antimigratornim osobinama u testu zarastanja rana (*wound-healing*). Za razliku od selektivnih HDAC6 inhibitora, snažan antimigratorni i antiinvazivni efekat na MDA-MB-231 ćelijama (u testovima *transwell migration i matrigel invasion*) pokazalo je jedinjenje BDR-8, kao neselektivni HDAC inhibitor. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima o povezanosti inhibicije histon deacetilaza sa redukcijom migratornog i invazivnog fenotipa kancera dojke (**Park et al., 2011**).

4. Literatura

- Alam, M. A. (2019). Methods for Hydroxamic Acid Synthesis. *Current Organic Chemistry*, 23(9), 978–993.
<https://doi.org/10.2174/1385272823666190424142821>
- Beyer, M., Kiweler, N., Mahboobi, S., & Krämer, O. H. (2017). How to Distinguish Between the Activity of HDAC1-3 and HDAC6 with Western Blot. In O. H. Krämer (Ed.), *HDAC/HAT Function Assessment and Inhibitor Development: Methods and Protocols* (pp. 355–364). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6527-4_26
- Bouchet, S., Linot, C., Ruzic, D., Agbaba, D., Fouchaq, B., Roche, J., Nikolic, K., Blanquart, C., & Bertrand, P. (2019). Extending Cross Metathesis To Identify Selective HDAC Inhibitors: Synthesis, Biological Activities, and Modeling. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10(6), 863–868.
<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00440>
- Butler, K. V., Kalin, J., Brochier, C., Vistoli, G., Langley, B., & Kozikowski, A. P. (2010). Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *Journal of the American Chemical Society*, 132(31), 10842–10846. <https://doi.org/10.1021/ja102758v>
- CAS SciFinder[®]. (n.d.). CAS. Retrieved April 6, 2022, from <https://www.cas.org/solutions/cas-scifinder-discovery-platform/cas-scifinder>
- Depetter, Y., Geurs, S., Vreese, R. D., Goethals, S., Vandoorn, E., Laevens, A., Steenbrugge, J., Meyer, E., Tullio, P. de, Bracke, M., D'hooghe, M., & Wever, O. D. (2019). Selective pharmacological inhibitors of HDAC6 reveal biochemical activity but functional tolerance in cancer models. *International Journal of Cancer*, 145(3), 735–747. <https://doi.org/10.1002/ijc.32169>
- Fleming, C. L., Ashton, T. D., Nowell, C., Devlin, M., Natoli, A., Schreuders, J., & Pfeffer, F. M. (2015). A fluorescent histone deacetylase (HDAC) inhibitor for cellular imaging. *Chemical Communications*, 51(37), 7827–7830.
<https://doi.org/10.1039/C5CC02059J>
- Gaisina, I. N., Tueckmantel, W., Ugolkov, A., Shen, S., Hoffen, J., Dubrovskiy, O., Mazar, A., Schoon, R. A., Billadeau, D., & Kozikowski, A. P. (2016). Identification of HDAC6-Selective Inhibitors of Low Cancer Cell Cytotoxicity. *ChemMedChem*, 11(1), 81–92. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500456>

- Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M., & Schreiber, S. L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(8), 4389–4394. <https://doi.org/10.1073/pnas.0430973100>
- Hai, Y., & Christianson, D. W. (2016). Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nature Chemical Biology*, *12*(9), 741–747. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2134>
- Home—Enamine. (n.d.). <https://enamine.net/>
- Kashyap, K., & Kakkar, R. (2020a). An insight into selective and potent inhibition of histone deacetylase 8 through induced-fit docking, pharmacophore modeling and QSAR studies. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, *38*(1), 48–65. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1567388>
- Kashyap, K., & Kakkar, R. (2020b). Pharmacophore-enabled virtual screening, molecular docking and molecular dynamics studies for identification of potent and selective histone deacetylase 8 inhibitors. *Computers in Biology and Medicine*, *123*, 103850. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2020.103850>
- Leading supplier of HTS compounds, building blocks | Life Chemicals. (n.d.). Retrieved April 6, 2022, from <https://lifechemicals.com/>
- Ling, Y., Guo, J., Yang, Q., Zhu, P., Miao, J., Gao, W., Peng, Y., Yang, J., Xu, K., Xiong, B., Liu, G., Tao, J., Luo, L., Zhu, Q., & Zhang, Y. (2018). Development of novel β -carboline-based hydroxamate derivatives as HDAC inhibitors with antiproliferative and antimetastatic activities in human cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *144*, 398–409. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.061>
- Miyake, Y., Keusch, J. J., Wang, L., Saito, M., Hess, D., Wang, X., Melancon, B. J., Helquist, P., Gut, H., & Matthias, P. (2016). Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. *Nature Chemical Biology*, *12*(9), 748–754. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2140>
- Park, S. Y., Jun, J. A., Jeong, K. J., Heo, H. J., Sohn, J. S., Lee, H. Y., Park, C. G., & Kang, J. (2011). Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncology Reports*, *25*(6), 1677–1681. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1236>
- Pham-The, H., Casañola-Martin, G., Diéguez-Santana, K., Nguyen-Hai, N., Ngoc, N. T., Vu-Duc, L., & Le-Thi-Thu, H. (2017). Quantitative structure–activity relationship analysis and virtual screening studies for identifying HDAC2 inhibitors from known HDAC bioactive chemical libraries. *SAR and QSAR in Environmental Research*, *28*(3), 199–220. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2017.1294198>
- Porter, N. J., Mahendran, A., Breslow, R., & Christianson, D. W. (2017). Unusual zinc-binding mode of HDAC6-selective hydroxamate inhibitors. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences*, 114(51), 13459–13464.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1718823114>
- Ragno, R., Simeoni, S., Rotili, D., Caroli, A., Botta, G., Brosch, G., Massa, S., & Mai, A. (2008). Class II-selective histone deacetylase inhibitors. Part 2: Alignment-independent GRIND 3-D QSAR, homology and docking studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(3), 621–632.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.05.004>
- Reddy, A. S., Kumar, M. S., & Reddy, G. R. (2000). A convenient method for the preparation of hydroxamic acids. *Tetrahedron Letters*, 41(33), 6285–6288.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)01058-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01058-3)
- Roche, J., & Bertrand, P. (2016). Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 121, 451–483.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.047>
- Ruzic, D., Petkovic, M., Agbaba, D., Ganesan, A., & Nikolic, K. (2019). Combined Ligand and Fragment-based Drug Design of Selective Histone Deacetylase – 6 Inhibitors. *Molecular Informatics*, 38(5), 1800083.
<https://doi.org/10.1002/minf.201800083>
- Shah, R. R. (2019). Safety and Tolerability of Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors in Oncology. *Drug Safety*, 42(2), 235–245. <https://doi.org/10.1007/s40264-018-0773-9>
- Sirous, H., Campiani, G., Brogi, S., Calderone, V., & Chemi, G. (2020). Computer-Driven Development of an in Silico Tool for Finding Selective Histone Deacetylase 1 Inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(8), E1952.
<https://doi.org/10.3390/molecules25081952>
- Wang, X.-X., Wan, R.-Z., & Liu, Z.-P. (2018). Recent advances in the discovery of potent and selective HDAC6 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1406–1418. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.040>
- Zhu, T., Cao, S., Su, P.-C., Patel, R., Shah, D., Chokshi, H. B., Szukala, R., Johnson, M. E., & Hevener, K. E. (2013). Hit Identification and Optimization in Virtual Screening: Practical Recommendations Based Upon a Critical Literature Analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(17), 6560–6572.
<https://doi.org/10.1021/jm301916b>

5. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo disertacije

Spisak radova koji čine deo doktorske disertacije

1. **Ruzic, D.**, Petkovic, M., Agbaba, D., Ganesan, A., & Nikolic, K. (2019). Combined Ligand and Fragment-based Drug Design of Selective Histone Deacetylase-6 Inhibitors. *Molecular Informatics*, 38(5). (M21, Mathematical & Computational Biology (11/59) IF₂₀₁₉ = 2,741).
2. Bouchet, S., Linot, C., **Ruzic, D.**, Agbaba, D., Fouchaq, B., Roche, J., Nikolic, K., Blanquart, C. and Bertrand, P., 2019. Extending Cross Metathesis To Identify Selective HDAC Inhibitors: Synthesis, Biological Activities, and Modeling. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10(6), pp.863-868. (M21, Chemistry, Medicinal (17/61) IF₂₀₁₉ = 3,975).
3. Alves Avelar, L. A.; **Ruzic, D.**; Djokovic, N.; Kurz, T.; Nikolic, K. Structure-Based Design of Selective Histone Deacetylase 6 Zinc Binding Groups. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2020, 38 (11), 3166–3177. (M22, Biochemistry/Molecular Biology (125/299) IF₂₀₁₈ = 3.310).

Poglavlja u knjigama/monografijama međunarodnog značaja (M14)

1. **Ruzic, D.**, Djokovic, N., & Nikolic, K. (2021). Fragment-Based Drug Design of Selective HDAC6 Inhibitors. In *Protein-Ligand Interactions and Drug Design* (pp. 155-170). Humana, New York, NY.

Spisak usmenih saopštenja M32:

1. **Ruzic, D.**, Nikolic K., Agbaba D. *Contemporary approaches in design of novel histone-deacetylase 6 inhibitor*, COST conference CM1406 EpiChemBio, September 28-29, 2015, Budapest, Hungary (oral presentation)
2. **Ruzic D.**, Nikolic K, Agbaba D, Ganesan A. *Molecular docking studies into new crystal second catalytic domain of HDAC6*. CM1406 – Epigenetic Chemical Biology (EPICHEMIBIO) – COST CM1406. WG1 Scientific Workshop – EPIGENETIC CHEMICAL PROBES. Belgrade, 16. January 2017. page 16. (oral presentation)
3. **Ruzic D.**, Agbaba D., Nikolic K. Ganesan A. *Molecular modelling – design of selective Histone Deacetylase 6 epigenetic inhibitors*, Department of Biophysical Chemistry, Max Planck University, Goettingen, Germany (August 19, 2016) p.15 (oral presentation)

4. **Ruzic D.**, Djokovic N, Petkovic M, Agbaba D, Lahtela-Kakkonen M, Nikolic K, A. Ganesan. *Computer aided design of histone deacetylase inhibitors*. Epigenetic Chemical Biology – Action CM1406, Computational Methods in Drug Design. Training School 22 – 24 March 2018, Istanbul, Turkey (oral presentation)
5. **D. Ružić**, N. Djoković, M. Petković, D. Agbaba, M. Lahtela-Kakkonen, A. Ganesan and K. Nikolić. Rational design of selective histone deacetylase inhibitors. 14th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry), September 26-30, 2018, Belgrade, Serbia. PHYSICAL CHEMISTRY 2016 (oral presentation), Volume II, 923-929p.
6. **Ruzic, D.**, Djokovic, N., Petkovic, M., Agbaba, D., Gul, S., Lahtela-Kakkonen, M., Ganesan, A., and Nikolic, K. *Rational design and evaluation of selective HDAC inhibitors*. EpiChemBio WG1 meeting, Salerno, 4-5 March 2019, (oral presentation)

Spisak međunarodnih saopštenja štampanih u izvodu M34:

1. **Ruzic D.**, Nikolic K, Agbaba D. *A theoretical study of interaction between HDAC-1 and HDAC-6 enzymes and in silico designed inhibitors*, Fourth Conference of Young Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia, November 5, 2016. 101p.
2. **Ruzic D.**, Nikolic K. Agbaba D, Ganesan A. *Computer aided drug design – a step closer to selective HDAC-6 inhibitor?* 3rd Freiburg Epigenetic Spring Meeting and COST Action EpiChemBio CM1406, Freiburg (10-13. April 2016)
3. **Ruzic D.**, Sencanski M, Nikolic K, Agbaba D, Ganesan A. *Structural insight in HDAC-6 inhibition: Molecular docking studies of naphthalimide based HDAC inhibitors*, COST Action EpiChemBio CM1406, Groningen (15-16. September 2016), 27-28p.
4. L. A. Alves Avelar, **D. Ruzic**, K. Nikolic, T. Kurz. *Design and synthesis of novel Histone Deacetylase 6 zinc binding groups*, EpiChemBio (CM1406) and MuTaLig (CA15135) COST actions joint meeting 2017 Porto (PT), Sept 22-24 2017
5. **D. Ruzic**, M. Petkovic, D. Agbaba, K. Nikolic and A. Ganesan. *HyDroxAmiC acid in HDAC inhibitors – Valuable, though not irreplaceable Zinc Binding Group*, COST Action EpiChemBio CM1406, The Many Faces of Epigenetics. Multidisciplinary Perspectives "over" Genetics, 6-8 December 2017, Maison Française d'Oxford
6. K. Nikolic, **D. Ruzic**, N. Djokovic, M. Petkovic, D. Agbaba, M. L. Kakkonen and A. Ganesan. *Computer-aided drug design of selective histone deacetylase inhibitors*, J Org Inorg Chem 2018, European Congress on Advanced Chemistry July 12-13 2018 Paris, France, Volume: 4 DOI: 10.21767/2472-1123-C2-005
7. **Dusan Ruzic**, Katarina Nikolic, Milos Petkovic, A. Ganesan, Danica Agbaba. *Rational drug design of histone deacetylase 6 inhibitors*, International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC), Ljubljana, Slovenia, 2-6. 2018
8. **D. Ruzic**, D. Agbaba, K. Nikolic. *Medicinska hemija inhibitora histon deacetilaze 6 – in silico pristup dizajnu lekova*, Arh.farm 2018;68: 380-381 (FHA-P3)

9. Katarina Nikolic, **Dusan Ruzic**, Milan Beljkas, Milos Petkovic, Sheraz Gul, Juan F. Santibanez and Tatjana Srdic-Rajic. *Is there a borderline between cytotoxic and antimetastatic effects of selective Histone deacetylase 6 inhibitors in solid malignancies?* 56th Cancerology week, Hotel Crowne plaza, November, 6 - 9. 2019, Belgrade, Serbia
10. **Ruzic, D.**, Petkovic, M., Gul, S., Santibanez, J.F., Srdic-Rajic, T., Nikolic, K. (2021). Novel 1-benzhydryl piperazine derivative inhibits the migration and invasiveness of breast cancer cells: Synthesis, molecular modelling and biological characterization. EACR 2021 Congress, Innovative Cancer Science: Better Outcomes Through Research, Virtual Congress, 9 – 12 June, 2021.
11. **Ruzic, D.**, Djokovic, N., Petkovic, M., Agbaba, D., Gul, S., Lahtela-Kakkonen, M., Ganesan, A., Santibanez, J.F., Srdic-Rajic, T., Nikolic, K. (2021). Rational design, synthesis and *in vitro* testing of selective HDAC6 and SIRT2 inhibitors, EFMC-ICMS International Symposium on Medicinal Chemistry, Virtual Event, Aug. 29-Sept.2,2021, T021(360).
12. **Ruzic, D.**, Petkovic, M., Bernhard, E., Gul, S., Santibanez, J.F., Srdic-Rajic, T., Nikolic, K. (2021). Synthesis, molecular modelling and biological characterization of novel antimigratory and anti-invasive 1-benzhydryl piperazine derivatives. EFMC-ICMS International Symposium on Medicinal Chemistry, Virtual Event, Aug. 29-Sept.2,2021, T033(372).

6. Zaključak – obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije

U okviru doktorske disertacije kandidata magistra farmacije Dušana B. Ružića prikazane su tri koordinisane studije: *in silico* racionalni dizajn selektivnih HDAC6 inhibitora, sinteza odabranih dizajniranih inhibitora, kao i *in vitro* (enzimska i ćelijska) biološka ispitivanja novodizajniranih jedinjenja na ćelijama kancera dojke (MDA-MB-231 i MCF-7).

U prvom delu doktorske disertacije kandidat Dušan Ružić je prikazao komparativne modele kvantitativnih odnosa trodimenzionalne strukture i aktivnosti (3D-QSAR) za inhibitore dve izoforme histon deacetilaza (HDAC1 i HDAC6). Skup jedinjenja korišćen za pripremu oba modela sadrži preko 80% zajedničkih inhibitora, zbog čega je bilo neophodno pripremiti bioaktivne konformacije inhibitora u studiji molekuskog dokinga na obe izoforme. Izdvajanjem konformacija inhibitora nakon molekuskog dokinga umesto geometrijskih optimizacija inhibitora, preciznije je definisan hemijski prostor inhibicije HDAC1, odnosno HDAC6 enzima. Analiza rezultata oba 3D-QSAR modela (interpretacije GRIND deskriptora) poslužila je za pretragu novih, heterocikličnih fragmenata iz dostupnih virtuelnih baza jedinjenja. Za sinteze su odabrane najisplativije heterociklične CAP grupe sa sličnim fizičko-hemijskim osobinama kao i poznati selektivni HDAC6 inhibitori.

U drugom delu doktorske disertacije je prikazana sinteza i strukturna analiza derivata 1-(difenilmetil)-piperazina i 5,5-difenilimidazolidin-2,4-diona. Pomenuti derivati nisu do sada poznati u naučnoj literaturi i sadrže nove hemijske skelete u okviru hemijskog prostora selektivnih HDAC6 inhibitora.

U trećem delu doktorske disertacije kandidat je prikazao *in vitro* enzimsko profilisanje sintetisanih jedinjenja, pri čemu su izdvojena dva nanomolarna selektivna HDAC6 inhibitora i jedan nanomolarni dualni HDAC6/8 inhibitor. U poređenju sa selektivnim HDAC6 inhibitorima u ovoj doktorskoj disertaciji, testiran je i neselektivni HDAC inhibitor, jedinjenje BDR-8 koji potentno inhibira četiri izoforme (HDAC1, HDAC3, HDAC6 i HDAC8) u nanomolarnim koncentracijama. Ispitivanjem uticaja sintetisanih HDAC inhibitora na indukciju apoptoze, promenu mitohondrijskog membranskog potencijala, zastoja u ćelijskom ciklusu, kao i na procese migracije i invazije ćelija kancera dojke, izdvojen je BDR-8 inhibitor kao obećavajući antikancerski hemioterapeutik. Poređenjem efekata BDR-8 inhibitora sa efektima dva nova, selektivna

HDAC6 inhibitora (BDR-6 i BDR-8), zaključeno je da BDR-8 ima najpotentniji antikancerski i antimetastatski profil.

7. Provera originalnosti doktorske disertacije

OCENA IZVEŠTAJA O PROVERI ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije:

„Racionalni dizajn, sinteza i in vitro ispitivanja selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6“, kandidata magistra farmacije Dušana Ružića, konstatujem da utvrđeno podudaranje teksta iznosi 5 %.

Ovaj stepen podudarnosti posledica je **citata, ličnih imena, bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, opštih mesta i podataka, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njegove disertacije**, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izjavljujem da izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije, te se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

Datum

17. 03. 2022. godine

Mentor

Prof. dr. Katarina Nikolić

Katedra za farmaceutsku hemiju

8. Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije

Na osnovu izloženog, Komisija zaključuje da je kandidat magistar farmacije Dušan Ružić uspešno realizovao postavljene ciljeve istraživanja i da rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju značajan naučni doprinos u oblasti Farmaceutske-medicinske hemije i strukturne analize.

Rezultati doktorske disertacije publikovani su u 2 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 1 radu u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), 6 usmenih saopštenja (M32) i 12 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u izvodu (M34).

Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju magistra farmacije Dušana Ružića i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom:

„Racionalni dizajn, sinteza i *in vitro* ispitivanja selektivnih inhibitora histon deacetilaze 6“,

Članovi Komisije

Dr sc. Olivera Čudina, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Miloš Petković, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Tatjana Srdić-Rajić, naučni savetnik,
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije