

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na sednici održanoj **21.10.2021.** godine, donelo je **Odluku (broj 2015/1)** kojom je imenovana **Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije** pod naslovom: „*In silico* selekcija i *in vitro* ispitivanja prirodnih i sintetskih inhibitora rasta parazita *Leishmania* spp.“, kandidata **Mast. hem. Strahinje Stevanovića**, studenta doktorskih studija na Katedri za farmaceutsku hemiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, modul farmaceutska hemija.

Komisija u sastavu:

1. Dr Sanja Glišić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „Vinča“

2. Dr. Brankica Filipić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. Dr. Vladimir Dobričić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Mentori:

1. Dr Katarina Nikolić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. Dr Milan Senčanski, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „Vinča“

pročitala je završenu doktorsku disertaciju, pregledala kompletnu dokumentaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

1 PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija mast. hem. Strahinje Stevanovića pod nazivom „***In silico* selekcija i *in vitro* ispitivanja prirodnih i sintetskih inhibitora rasta parazita *Leishmania* spp.**“ napisana je na 86 strana standardnog formata (prored 1; font *Garamond* - 12). Doktorska disertacija sadrži ***Sažetak*** na srpskom i ***Abstract*** na engleskom jeziku, a sastoji se iz sledećih poglavlja: **1. *Uvod***, **2. *Ciljevi istraživanja***, **3. *Materijali i metode***, **4. *Rezultati i diskusija***, **5. *Zaključak***, **6. *Literatura***, **7. *Prilozi***.

Disertacija sadrži 30 slika, 28 tabela i 156 literaturnih navoda.

2 OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitana aktivnost 19 jedinjenja potencijalnih inhibitora rasta *Leishmania* spp., a koja pripadaju klasi flavonoida (10), 1,2,4-oksadiazola (1), indolizina (1), aldoksima (1), N-acilhidrazona (5) i hinaldina (1). Kandidati predloženi za *in vitro* ispitivanja su prethodno dobijeni na osnovu *in silico* metoda. Formirana su dva protokola za virtuelni skrining (VS), sastavljena od metodologija zasnovanih na strukturi liganda i receptora za dizajn inhibitora. Protokoli su formirani tako da se mogu primeniti za efikasnu i pouzdanu pretragu većeg broja jedinjenja.

Prvi VS protokol primenjen je za pretragu MetIDB baze (5.679 jedinjenja [1]) i arhive (200 jedinjenja) oksadiazola, indolizina, aldoksima i N-acilhidrazona, dobijenih postupkom automatizovane sinteze [2,3]. U prvom VS protokolu korišćen je trening skup zasnovan na strukturi liganda od 24 jedinjenja sa mikrobicidnim dejstvom na lajšmanije. Ta jedinjenja su i inhibitori arginaze lajšmanije i mogu se pronaći u ChEMBL bazi podataka pod oznakom ChEMBL3108635 [4]. Za trening skup su izračunate AQVN/EIIP vrednosti. Na osnovu tih vrednosti formiran je aktivan domen hemijskog prostora, koji obuhvata 87,5 % trening skupa, a nalazi se u intervalu AQVN i EIIP 3,13-3,58 i 0,09-

0,134, što je bio kriterijum na osnovu kojeg je pronađeno 200 flavonoida iz MetIDB baze i 39 kandidata iz arhive sintetisanih jedinjenja [5]. U ovom radu je opisan postupak pripreme jedinjenja kandidata, upotrebom automatizovane sinteze. Osamnaest jedinjenja iz trening skupa poseduju IC₅₀ na *L. amazonensis* arginaze, uzete za vrednosti promenljive (Y, zavisna) za razvoj 3D-QSAR modela [6]. Od ukupnog broja PLS promenljivih (X, nezavisne) koje čine formirani 3D-QSAR model, pronađeno je da 10 predstavljaju najznačajnije molekulske osobine koje karakterišu aktivnost inhibitora arginaze. Model je definisan sa promenljivama kako negativnog tako i pozitivnog doprinosa. Optimizovan 3D-QSAR model je korišćen za predikciju aktivnosti inhibitora. Model je validiran upotrebom permutacionog testa, kodiranjem IC₅₀ podataka (Y, zavisna) [7].

Za evaluaciju specifičnosti inhibitora zasnovanoj na strukturi receptora, korišćen je doking u humanu (Oznaka u *Protein Data Bank*, tj. PDB bazi podataka, 2aeb) i *L. amazonensis* (homologni 3D model po *L. mexicana*, PDB 4iu0) arginazu [8,9,10]. Razlike jačine u slobodnoj energiji interakcije kao test specifičnosti, kreću se u intervalu 0,3-0,8 kcal mol⁻¹, za *La*ARG u odnosu na *Hi*ARG. Rezultat je formiran kao prosek vrednosti dobijenih primenom četiri različita doking programa (GOLD [11], Glide XP [12], AutoDock 4 i AutoDock Vina [13, 14]). Identifikovane su sve grupe bočnih ostataka aminokiselina koje učestvuju u receptor-ligand interakciji. Grupa ASN, SER, THR se slaže sa promenljivama za hidrofilne probe. Grupa bočnih ostataka je HIS, VAL i ALA, a ona odgovara hidrofobnim, tj. aromatičnim probama, objašnjenih 3D-QSAR modelom. Rezultati su pokazali da 3D QSAR može da objasni receptor-ligand prepoznavanje i ima opštu saglasnost sa doking rezultatima.

Selektivnost jedinjenja ispitana je anti-target dokingom, upotrebom modela ciljnih mesta metaboličkog ciklusa domaćina (1m13 nuklearni ksenobiotični receptor PXR; 2a3r humana sulfotransferaza, SULT1A3; 1z10 (humani izozim 2A6 CYP 450 familije); 1og5 (humani izozim 2C9 CYP 450 familije); 1tqn (humani izozim TA4 CYP 450 familije). Svi kandidati daju negativan rezultat na PAINS (enlg. *Pan Assay Interfering Compounds* [13]) i podležu pravilu 5 Lipinskog. Dodatna karakterizacija ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam i toksičnost) osobina urađena je u ADMET Predictor programu [14]. Svi kandidati flavonoidi, na osnovu prosečnog ADMET rizika koji je > 7, pripadaju grupi od 10% WDI (engl., *World Drug Index*) [15]. Srednja vrednost ADMET rizika za kandidate oksadiazola, indolizina, aldoksima i N-acilhidrazona iznosi 3,37 a to spada u 90% WDI. Rezultati pokazuju da je potencijal kandidata po osobinama leka veći u odnosu na grupu flavonoida. To je opravdano budući da je flavonoid početna struktura za dizajn jedinjenja sa osobinama leka. Srednja vrednost ADMET rizika iznosi 2,26 za terapeutike u WDI bazi (preko 2000 jedinjenja) [15].

Potvrda *in silico* odabira kandidata na osnovu VS protokola, izvršena je za 6 jedinjenja 1,2,3-oksadiazola, indolizina, N-acilhidrazona i aldoksima. Zbog toga što postupak izolovanja i prečišćavanja

arginaza nije bio izvodljiv, odabrani kandidati su *in vitro* testirani merenjem inhibicije rasta *L. donovani* (ćelijskih linija LV9) u formi amastigota, slobodnih i inficiranih makrofaga. Najpotentniji inhibitori pokazuju blagu toksičnost sa vrednostima za CC_{50} (citotoksična koncentracija potrebna da se rast makrofaga inhibira za 50 %) u intervalu 4-16 μM (indeks selektivnosti, $SI > 2$). Pokazalo se da pored podataka o receptor-ligand prepoznavanju za arginazu (*L. mexicana*, PDB 4iu0), molekul kandidata **2** stvara elektrostatički potencijal preko hidrazina sa bočnim ostatkom GLU197 modela *L. amazonensis* arginaze. Postoji mogućnost da je ova interakcija važna za specifično prepoznavanje sa arginazom lajšmanije. Razlika energije interakcije za **2** sa *La*ARG u odnosu na *Hs*ARG iznosi 0,8 kcal mol⁻¹. Kandidat br. **2** (N'-[(5-bromo-2-tiofenil)methilen]tiofen-2-karbohidrazid) ima najbolju vrednost IC_{50} (2,18 μM). Prema skriningu zasnovanom na fentoipu, za **2** je izračunata IC_{50} vrednost koja je 20-puta veća od referentne vrednosti za Amfotericin B (kontrola, AmB). Rezultat *in vitro* testiranja pokazuje da je selektivnost kandidata **2** manja 25 puta od vrednosti za kontrolu. Rezultat SAR studije je pokazao da tiofen doprinosi povećanoj aktivnosti N-acilhidrazona, ali i pojavi citotoksičnosti u makrofagama.

Drugi VS protokol koji je rezultat ovog istraživanja, pripremljen je sa ciljem skrininga arhive od 550.000 jedinjenja sa većim brojem konformacija [16,17]. U protokolu su korišćena dva 3D farmakoforna modela [18], formirana na osnovu strukture HDQ derivata (nM IC_{50}), inhibitora alternativne NADH:ubihinon oksidoreduktaze (NDH-2) vrste *Plasmodium falciparum* [19]. Farmakoforni modeli se razlikuju po tipu jednog farmakofornog elementa i geometrijski se podudaraju. Skrining koji koristi farmakoforne modele je optimizovan upotrebom mamaca (DUD-e) [20]. Rezultat skrininga su jedinjenja (4.423) koja poseduju i donore i akceptore vodonične veze, na osnovu kojih su se racionalizovale interakcije inhibitora sa flavonom (FAD kofaktor) i aminokiselinskim ostacima u NDH-2 aktivnom mestu.

Seriya dokinga u homologni model *Leishmania infantum* NDH-2 i druge strukture izozima (*Sacharomyces cerevisiae* NDH-2, PDB 4g73/4g6g; *Staphylococcus aureus* NDH-2, PDB 4xdb) služila je za testiranje specifičnosti [11,21,22,23,24]. Doking je imao ulogu kao strukturno zasnovana metoda pretrage inhibitora u VS protokolu. Pronađen je interval vrednosti (GoldScore interval 60-90) na osnovu kojeg se dalje redukovao broj jedinjenja pretrage, od kojih je 23 prošlo PAINS filter [13].

Potvrda aktivnosti jedinjenja kandidata dobijena je *in vitro* testiranjima. Značajna mikrobicidna aktivnost na *Staphylococcus aureus* za predloženih 23 kandidata inicijalno nije pronađena, a testiranje je urađeno na rekombinantnoj *Sa*NDH-2. Objašnjenje ovakvih rezultata se pripisuje prirodi receptor-ligand interakcije i nedostatka podataka, poznatih ograničenja u modelu za skrining. Za jednog kandidata, br. **15** (N-[3-hloro-4-(4-hloronaftalen1-il)oksifenil]-6-metoksi-hinaldin-4-amin) dobijena je relativna aktivnost (RA 49 %, 20 μM , $Ki_{app} = 8,9 \pm 1,9 \mu\text{M}$) na *Sa*NDH-2. Potom je sprovedeno

ispitvanje aktivnosti kandidata **15** na ćelijske linije promastigota (0,03-0,05 μM) i amastigota (0,2-0,3 μM) vrste *Leishmania infantum*. Mehanizam aktivnosti je racionalizovan analizom doking rezultata. Kandidat **15** formira vodonične veze sa izoaloksazinskim prstenom (FAD) i SER324, nalik interakcijama FAD-UQ koje su u skladu sa mehanizmom oksidoredukcione reakcije. Dodatno, grupa hlornaftalen-1-il-oksifenil (**15**) je pozicionirana u okviru hidrofobnog domena, koji obuhvata delove skevence ALA397-LEU407 i GLY371-LEU385 (Uniprot oznaka za sekvencu: A4IDV2) pa je jedinjenje stabilizovano hidrofobnim interakcijama [21]. Dodatno, energije interakcija izmerene dokingom za ubikvinon i kandidata **15** sa NDH-2 su približne (razlika 3 GoldScore), pri čemu su doking poze u saglasnosti sa farmakofornim modelom. Iz toga proizilazi da je dobijeni VS protokol namenjen za pretragu jedinjenja i predviđanje aktivnosti na osnovu aktivne konformacije supstrata u aktivnom mestu NDH-2.

3 UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Lajšmanioza je klasifikovana u zanemarene tropske bolesti [25-27]. Zaraza se teško može kontrolisati, a lajšmanioza se može dijagnostikovati pri prvoj pojavi simptoma. Prva pojava simptoma se najčešće javlja u odmakloj fazi infekcije ili kod težih oblika oboljenja [28]. Na globalnom nivou od lajšmanioze umire do 30.000 ljudi godišnje [27].

Hemoterapija lajšmanioze se zasniva na upotrebi kombinovane terapije koja nosi sa sobom određene nedostatke. Pojava neželjenih efekata, invazivni putevi administracije leka, visoke cene lečenja, dugotrajne terapije i male efikasnosti, pojava rezistencije parazita na lek i toksičnost po ćelije domaćina su neki od tih nedostataka [28,29,30,31]. Mehanizam delovanja terapeutika na lajšmaniju koji su u širokoj primeni, kao što je natrijum stibogluconat, nije poznat. Prvenstveno za najteži – visceralni oblik lajšmanioze (VL), koristi se kombinovana terapija stibogluconata (ili zamena – meglumin antimonijat), pentamidina i amfotericina. U nekim zemljama (npr. u Velikoj Britaniji) dozvoljena je upotreba miltefozina, prvog jedinjenja registrovanog kao lek za lečenje VL [32]. Prvobitno, ovaj alkilfosfolipid se koristio kao antineoplastik. Mehanizam antiprotozoalnog dejstva nije sasvim definisan. Terapiju miltefozinom često prati niz neželjenih efekata, među kojima je i teratogeno dejstvo. Poznati mehanizmi dejstva terapeutika za lajšmaniozu, kao i potencijalni metabolički signalni putevi koji mogu učestvovati u mehanizmu su u vezi sa biosintezom sterola, transportom purina, aktivnošću na protein kinaze, proteinaze, biosintezom folata i topoizomerazom kao ciljnim mestom [33]. Međutim, izveštaji koji se odnose na rezistenciju različitih protozoa na ove terapeutike su sve češći, a povećanje doze značajno povećava rizik od pojave toksičnog dejstva u organizmu domaćina [34].

Prethodna istraživanja su pokazala veliki potencijal korišćenja prirodnih proizvoda kao agenasa u terapiji lajšmanioze [35, 33]. Prirodni proizvodi koji su do sada pokazali značajnu aktivnost na lajšmanije, pripadaju klasi alkaloida, derivata fenola i terpena. Izmerena IC_{50} vrednost za ovu klasu je u opsegu od 1 do 10 mg ml⁻¹ [36]. Poznato je da terpeni i druge oksidujuće vrste jedinjenja imaju širok spektar antimikrobnog dejstva, ali i nisku efikasnost [37]. Od derivata fenola, flavonoidi prirodnog porekla su nesumnjivo važna klasa inhibitora arginaze lajšmanija [38,39]. Ova vrsta jedinjenja pokazuje inhibitornu aktivnost na lajšmanije sa IC_{50} vrednostima u opsegu od 0,6 do 10,9 mg ml⁻¹. Poređenja radi, IC_{50} za miltefozin kao komercijalni terapeutik za lečenje lajšmanioze, iznosi 0,34 mg ml⁻¹. Od testiranih flavonoida, jedino je kvercetin pokazao *in vivo* aktivnost (15,3%). Analizom aktivnosti jedinjenja iz serije flavonoida na piruvat kinazi, proizilazi da klasa flavonoida ima potencijal za razvoja selektivne aktivnosti [40].

Seriya jedinjenja dobijena sintezom, koja sadrže strukturni motiv oksadiazola, pokazala su značajnu aktivnost kao antikinoplastidi, a posebno kao agensi u terapiji lajšmanioze (za vrste koje uzrokuju visceralni tip oboljenja) [41,42]. Aktivnost je do sada ispitana u vezi sa CYP51, esencijalnim enzimom za biosintezu sterola. Dodatno, za jedinjenja 1,2,4-oksadiazola su ustanovljeni protokoli konvencionalne i nekonvencionalne sinteze [43,44,45]. Identifikacijom antiprotozoalne aktivnosti kamptotecina i njegovih analoga, navela su na ispitivanja bioaktivnosti jedinjenja na bazi indolizina [46]. Iako su i za ovu klasu jedinjenja ustanovljene metode sinteze [47], potrebna su dodatna istraživanja koja bi ih okarakterisala na osnovu ciljnog mesta dejstva, prvenstveno radi postizanja selektivnosti i specifičnosti.

Kandidati, odabrani za *in vitro* testiranja mikrobicidne aktivnosti, a koja su dobijena uz pomoć 3D-QSAR modela, su derivati oksadiazola, indolizina, N-acilhidrazona i aldoksima. Derivati su pripremljeni automatizovanom sintezom, a njihova aktivnost potvrđena *in vitro* na ćelijskim linijama *Leishmania donovani*.

Protozoe familije Tripanozomatidae su karakteristične po metabolizmu zavisnom od tiola. U takvom metabolizmu tripanotion reduktaza učestvuju u antioksidativnim procesima umesto glutation i tioredoksin reduktaza, pristutnih u metabolizmu domaćina (sisara) [48,49]. Važni metaboliti za biosintezu tiol tripanotiona su poliamini (PA). PA imaju presudnu ulogu za rast i preživljavanje parazita [50]. Arginaza (ARG) je metaloenzim, esencijalan za proliferaciju *Leishmania* spp. Genskim uklanjanjem arginaze, lajšmanija postaje oksotrofna za PA [51]. Poznate su dve klase inhibitora arginaze [52]. Prva klasa je definisana prisustvom strukturnog bazisa 2-aminoimidazola, pri čemu prilikom receptor-ligand interakcije ne dolazi do izmeštanja hidroksida, već se ponaša kao mimetik arginina i sprečava hidrolizu supstrata. Druga klasa inhibitora može izmestiti hidroksid uz direktnu koordinaciju jona mangana i stabilizaciju prelaznog stanja receptor-ligand interakcije. Trenutno nije identifikovan inhibitor koji pokazuje selektivnost prema izoenzimima arginaze [53].

U ovoj disertaciji je opisan postupak dizajna inhibitora arginaze kao ciljnog mesta. Skринing flavonoida, kao prirodnih proizvoda, je odabran radi potencijalno manjeg rizika od citotoksičnosti u domaćinu. Za jedinjenje (-)-Epikatehin galat (kandidat **13**, CAS1257-08-5) iz grupe flavonoida, izračunata je značajna vrednost za energiju interakcije sa *Leishmania amazonensis* arginazom. Za neke od dobijenih kandidata, postojala je mogućnost potvrde aktivnosti *in vitro*.

U grupu enzima koja je esencijalna za rast i razvoj lajšmanija ubraja se enzim NADH alternativna dehidrogenaza (ili NADH:ubikvinon oksidoreduktaza). Postoje dva tipa NADH

dehidrogenaze, tip 1 koji je prisutan u mitohondrijama ćelija sisara i tip 2, tj. alternativna NADH dehidrogenaza (NDH-2) [54,55]. NDH-2 katalizuje biohemijsku reakciju oksidoredukcije u kojoj učestvuju NADH i ubikvinon. Alternativna NDH-2 je prisutna prvenstveno u mikroorganizmima [50-53]. Zbog toga, predstavlja potencijalno ciljno mesto za razvoj inhibitora [54]. Predložena su dva mehanizma NADH:ubikvinon oksidoredukcije [56,57,58].

Trenutno postoji potreba za novim mikrobicidnim agensima, kao i da mehanizam njihovog dejstva bude jasno definisan uz smanjen rizik od neželjenog dejstva. Enzim respiratornog lanca NDH-2, se čini esencijalnim za proliferaciju patogena, te je odabran za ciljno mesto razvoja inhibitora rasta lajšmanije. U jednoj od studija opisanih u ovoj disertaciji cilj je bio identifikovati kandidate sa potencijalnom aktivnosti na NDH-2. Na osnovu dostupnih strukturnih informacija formirali smo model za *L*NDH-2 upotrebom homolognog modelovanja. Po tom modelu, izvršili smo doking potencijalnih kandidata. Potvrdu o aktivnosti i specifičnosti smo dobili na osnovu *in vitro* testiranja na ćelijskoj liniji *Leishmania infantum* i kulturi *Staphylococcus aureus*. Eksperimenti *in vitro* su sprovedeni na ćelijskim linijama parazita u formi amastigot i promastigot vrste *Leishmania infantum*.

Pokazalo se da za hidroksi-2-dodecil-4-(1H) hinolon (u daljem tekstu, HDQ) postoji dualna aktivnost na ciljna mesta NDH-2 i citohrom bc1 iz organizma *Plasmodium falciparum* [18]. Za jedinjenja derivate hinolona, izmerena je inhibitorna aktivnost u koncentracijama od 4,2 do 71 mg ml⁻¹ na multirezistentan *Plasmodium falciparum*. Iako HDQ nema osobine leka, struktura ovog jedinjenja je poslužila kao osnova za formiranje 3D farmakofornih modela inhibitora NDH-2 lajšmanija.

Doking u homologne modele *L*NDH-2 i *S*NDH-2 služio je kao metoda zasnovana na strukturi receptora sa ciljem odabira aktivnih kandidata i za testiranje specifičnosti na osnovu poređenja receptor-ligand energije interakcije. Rezultati specifičnosti su potvrđeni *in vitro* testiranjima na ćelijskoj kulturi *Staphylococcus aureus*. Za jednog kandidata – supstituisanog 6-Metoksi-kvinaldina zabeležena je aktivnost u nanomolarnoj koncentraciji.

CITIRANA LITERATURA:

- [1] Mihaleva, V.V.; te Beek T.A.; van Zimmeren, F.; Moco, S.; Laatikainen, R.; Niemitz, M.; Korhonen, S.P.; van Driel, M.A.; Vervoort, J. MetIDB: a publicly accessible database of predicted and experimental ¹H NMR spectra of flavonoids. *Anal Chem.* **2013**, 85(18), 8700-7
- [2] Glisic, S.; Sencanski, M.; Perovic, M.; Stevanovic, S.; García-Sosa A.T. Arginase Flavonoid Anti-Leishmanial in Silico Inhibitors Flagged against Anti-Targets. *Molecules* **2016**, 21, 589.
- [3] Davies, M.; Nowotka, M.; Papadatos, G.; Dedman, N.; Gaulton, A.; Atkinson, F.; Bellis, L.; Overington, J.P. ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43(W1), W612-20.
- [4] Stevanovic, S.; Sencanski, M.; Danel, M.; Menendez, C.; Belguedj, R.; Bouraiou, A.; Nikolic K.; Cojean, S.; Loiseau, P. M.; Glisic, S.; Baltas, M. and García-Sosa, A.T. Synthesis, *In Silico*, and *In Vitro* Evaluation of Anti-Leishmanial Activity of Oxadiazoles and Indolizine Containing Compounds Flagged against Anti-Target. *Molecules* **2015**, 24, 1282.
- [5] Pentacle, Verzija 1.0.7, Molecular Discovery Ltd., Perugia, Italy; **2009**.
- [6] Rücker, C.; Rücker, G. and Meringer, M. γ -Randomization and Its Variants in QSPR/QSAR. *J Chem Inf Model* **2007** 47 (6), 2345-2357.
- [5] RCSB PDB Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 2000 28, 235-242.
- [6] PDB ID 2aeb Di Costanzo, L.; Sabio, G.; Mora, A; Rodriguez, P.C.; Ochoa, A.C.; Centeno, F.; Christianson, D.W. Crystal structure of human arginase I at 1.29 Å resolution and exploration of inhibition in the immune response. *Proc Natl Acad Sci* **2005** 102, 13058-13063.
- [7] PDB ID 4iwo D'Antonio, E. L.; Ullman, B.; Roberts, S.C.; Dixit, U.G.; Wilson, M.E.; Hai, Y.; Christianson, D.W. Crystal structure of arginase from *Leishmania mexicana* and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections. *Arch. Biochem. Biophys.* **2013** 535(2), 163-76.
- [8] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 727–748.
- [9] Virtual Screening Workflow; Schrödinger, LLC: New York, NY, USA, **2018**.
- [10] Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1639–1662.
- [11] Trott, O.; Olson, A.J. Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 455–461.
- [12] Jonathan, B.; Baell, J.; Nissink, W. M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017—Utility and Limitations. *ACH Chem Bio.* **2018** 13 (1), 36-44.
- [13] AP10.0, SimulationsPlus LLC, Lancaster, CA Olasupo, S.B.; Uzairu, A.; Adamu, G.S. et al. Computational Modeling and Pharmacokinetics/ADMET Study of Some Arylpiperazine Derivatives as Novel Antipsychotic Agents Targeting Depression. *Chem. Afr.* **2020**, 3, 979–988.
- [14] World Drug Index 2007/04; Thomson Reuters; (Dostupna na: http://thomsonreuters.com/products_services/science/science_products/a-z/world_drug_index)
- [15] Glisic, S.; Sencanski, M.; Perovic, M.; Stevanovic S. and García-Sosa A.T. Arginase Flavonoid Anti-Leishmanial *in Silico* Inhibitors Flagged against Anti-Targets. *Molecules* **2016**, 21, 589.

- [16] Hawkins, P. C. D.; Skillman, A. G.; Warren, G. L.; Ellingson, B. A.; Stahl M. T. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database *J. of Chem. Inf.* **2010**, 50 (4), 572-584.
- [17] Wober, G.; Langer, T. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, 45, 160–169.
- [18] Biagini, G.A.; Fisher, N.; Shone, A.E.; Mubarak, M.A.; Srivastava, A.; Hill, A.; Antoine, T.; Warman, A.J.; Davies, J.; Pidathala, C.; et al. Generation of quinolone antimalarials targeting the *Plasmodium falciparum* mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109, 8298–8303.
- [19] Mysinger, M.; Carchia, M.; Irwin, J.; Shoichet, B. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 6582–6594.
- [20] The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45:D158–D169.
- [21] PDB 4g73, 4g6g; Feng, Y.; Li, W.; Li, J.; Wang, J.; Ge, J.; Xu, D.; Liu, Y.; Wu, K.; Zeng, Q.; Wu, J.W.; et al. Structural insight into type-II mitochondrial NADH dehydrogenases. *Nature* **2012**, 491, 478–482.
- [22] PDB 4xdb Sena, F.V.; Batista, A.P.; Catarino, T.; Brito, J.A.; Archer, M.; Viertler, M.; Madl, T.; Cabrita, E.J.; Pereira, M.M. Type-II NADH:quinone oxidoreductase from *Staphylococcus aureus* has two distinct binding sites and is rate limited by quinone reduction. *Mol. Microbiol.* **2015**, 98, 272–288.
- [23] PDB 5jwa; Yang, Y.; Yu, Y.; Li, X.; Li, J.; Wu, Y.; Yu, J.; Ge, J.; Huang, Z.; Jiang, L.; Rao, Y.; et al. Target Elucidation by Cocrystal Structures of NADH-Ubiquinone Oxidoreductase of *Plasmodium falciparum* (PfNDH-2) with Small Molecule to Eliminate Drug-Resistant Malaria. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 1994–2005.
- [25] Centar za kontrolu trovanja i prevenciju: „Parasites: Leishmaniasis”. Dostupno na: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis> (podaci preuzeti prvi put u februaru 2016.).
- [26] Gradoni, L. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: Operational and research challenges. *Euro Surveill.* **2013**, 18, 20539.
- [27] WHO. Leishmaniasis: Fact Sheet N ° 375. 2014. Dostupna na: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (podaci preuzeti u februaru 2016.).
- [28] Machado-Silva, A.; Guimarães, P.P.; Tavares, C.A.; Sinisterra, R.D. New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: A patent landscape. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2015**, 25, 247–260.
- [29] Ritter, J.; Flower R., Henderson G. Loke Y. K., MacEwan, D. Rang, H. P.; Antiprotozoal drugs: other protozoal infections and drugs used to treat them Editor(i): Boggild, A.K.; Rang & Dale's Pharmacology 9th Edition *Elsevier* **2018**, 707, 9.
- [30] Ponte-Sucré, A.; Gamarro, F.; Dujardin, J.C.; Barrett, M.P.; López-Vélez, R.; García-Hernández, R.; Pountain, A.W.; Mwenechanya, R.; Papadopolou, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, 14, e0006052.
- [31] Rahman, R.; Goyal, V.; Haque, R.; Jamil, K.; Faiz, A.; Samad, R.; Ellis, S.; Balasegaram, M.; Boer, M.D.; Rijal, S.; et al. Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, 11, e0005635.
- [32] Croft, S.L., Engel J. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **2006** 100/1 , S4-8.

- [33] Hussain, H.; Al-Harrasi, A.; Al-Rawahi, A.; Green, I.R.; Gibbons, S. Fruitful decade for antileishmanial compounds from 2002 to late 2011. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10369–10428.
- [34] Scotti, L.; Ishiki, H.; Mendonça Júnior, F.J.; Da Silva, M.S.; Scotti, M.T. In-silico analyses of natural products on leishmania enzyme targets. *Mini Rev. Med. Chem.* **2015**, *15*, 253–269.
- [35] Rogers, M.; Kropf, P.; Choi, B.S.; Dillon, R.; Podinovskaia, M.; Bates, P.; Müller, I. Proteophosphoglycans regurgitated by Leishmania-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000555
- [36] Williams, C.; Espinosa, O.A.; Montenegro, H.; Cubilla, L.; Capson, T.L.; Ortega-Barría, E.; Romero, L.I. Hydrosoluble formazan XTT: Its application to natural products drug discovery for Leishmania. *J. Microbiol. Methods* **2003**, *55*, 813–816.
- [37] Fabricant, D.S.; Farnsworth, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 69–75.
- [38] Manjolin, L.C.; dos Reis, M.B.; Maquiaveli Cdo, C.; Santos-Filho, O.A.; da Silva, E.R. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2253–2262.
- [39] Cruz Ede, M.; da Silva, E.R.; Maquiaveli Cdo, C.; Alves, E.S.; Lucon, J.F., Jr.; dos Reis, M.B.; de Toledo, C.E.; Cruz, F.G.; Vannier-Santos, M.A. Leishmanicidal activity of Cecropia pachystachya flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. *Phytochemistry* **2013**, *89*, 71–77.
- [40] Scotti, L.; Ishiki, H.; Mendonça Júnior, F.J.; Da Silva, M.S.; Scotti, M.T. In-silico analyses of natural products on leishmania enzyme targets. *Mini Rev. Med. Chem.* **2015**, *15*, 253–269.
- [41] Lepesheva, G.I.; Hargrove, T.Y.; Rachakonda, G.; Wawrzak, Z.; Pomel, S.; Cojean, S.; Nde, P.N.; Nes, W.D.; Locuson, C.W.; Calcutt, M.W.; et al. VFV as a New Effective CYP51 Structure-Derived Drug Candidate for Chagas Disease and Visceral Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **2015**, *212*, 1439–1448.
- [42] Cottrell, D.M.; Capers, J.; Salem, M.M.; DeLuca-Fradley, K.; Croft, S.L.; Werbovets, K.A. Antikinetoplastid activity of 3-aryl-5-thiocyanatomethyl-1,2,4-oxadiazoles. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2815–2824.
- [43] Sreekanth Thota, S.; Rodrigues, D.A.; Murteira Pinheiro, P.S.; Lima, L.M.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. N-Acylhydrazones as drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 2797–2806.
- [44] Andrade, M.M.; Barros, M.T. Fast synthesis of N-acylhydrazones employing a microwave assisted neat protocol. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 245–247.
- [45] Oliveira, P.F.M.; Guidetti, B.; Chamayou, A.; André-Barrès, C.; Madacki, J.; Korduláková, J.; Mori, G.; Orena, B.S.; Chiarelli, L.R.; Pasca, M.R.; et al. Mechanochemical synthesis and biological C. evaluation of novel isoniazid derivatives with potent antitubercular activity. *Molecules* **2017**, *22*, 1457.
- [46] Sharma, V.; Kumar, V. Indolizine: A biologically active moiety. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 3593–3606
- [47] Jaisankar, P.; Pal, B.; Manna, R.K.; Pradhan, P.K.; Medda, S.; Basu, M.K.; Giri, V.S. Synthesis of antileishmanial(5R)-(-)-5-carbomethoxy-3-formyl-5, 6-dihydroindolo-[2, 3-a]-indolizine. *ARKIVOC* **2003** *9*, 150–157.
- [48] Morris, S. M. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol.* **2009** *157*(6), 922–930.
- [49] Colotti, G.; Ilari, A. Polyamine metabolism in Leishmania: From arginine to trypanothione. *Amino Acids* **2011**, *40*, 269–285.

- [50] PDB: 4iuo D'Antonio, E.L.; Ullman, B.; Roberts, S.C.; Dixit, U.G.; Wilson, M.E.; Hai, Y.; Christianson, D.W. Crystal structure of arginase from *Leishmania mexicana* and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections. *Arch. Biochem. Biophys.* **2013** 535(2), 163-76.
- [51] David, E.A. Structure and Function of Arginases, *J. Nutr.* **2004** 134(10), 2760S–2764S.
- [52] Reguera, R.M.; Balaña-Fouce, R.; Showalter, M.; Hickerson, S.; Beverley, S.M. Leishmania major lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, 165, 48–56.
- [53] da Silva, E.R.; Castilho, T.M.; Pioker, F.C.; Tomich de Paula Silva, C.H.; Floeter-Winter, L.M. Genomicorganisation and transcription characterisation of the gene encoding Leishmania (*Leishmania*) amazonensis arginase and its protein structure prediction. *Int. J. Parasitol.* **2002**, 32, 727–737.
- [54] Biagini, G.A.; Fisher, N.; Shone, A.E.; Mubarak, M.A.; Srivastava, A.; Hill, A.; Antoine, T.; Warman, A.J.; Davies, J.; Pidathala, C.; et al. Generation of quinolone antimalarials targeting the Plasmodium falciparum itochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109, 8298–8303.
- [55] Tatsushi Mogi, Kazunobu Matsushita, Yoshiro Murase, Kenji Kawahara, Hideto Miyoshi, Hideaki Ui, Kazuro Shiomi, Satoshi Ōmura, Kiyoshi Kita, Identification of new inhibitors for alternative NADH dehydrogenase (NDH-II), *FEMS Microbiol Lett.* **2009** 291(2), 157–161,
- [56] Iwata, M.; Lee, Y.; Yamashita, T.; Yagi, T.; Iwata, S.; Cameron, A.D.; Maher, M.J. The structure of the yeast NADH dehydrogenase (Ndi1) reveals overlapping binding sites for water- and lipid-soluble substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109, 15247–15252.
- [57] PDB 5jwa; Yang, Y.; Yu, Y.; Li, X.; Li, J.; Wu, Y.; Yu, J.; Ge, J.; Huang, Z.; Jiang, L.; Rao, Y. et al. Target Elucidation by Cocrystal Structures of NADH-Ubiquinone Oxidoreductase of Plasmodium falciparum (PfNDH-2) with Small Molecule to Eliminate Drug-Resistant Malaria. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 1994–2005.
- [58] Yang, Y.; Yamashita, T.; Nakamaru-Ogiso, E.; Hashimoto, T.; Murai, M.; Igarashi, J.; Miyoshi, H.; Mori, N.; Matsuno-Yagi, A.; Yagi, T. et al. Reaction mechanism of single Subunit NADH-ubiquinone oxidoreductase (Ndi1) from *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for ternary complex mechanism. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 9287–9297.

4 OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Spisak radova objavljenih u međunarodnim časopisima:

1. **Stevanovic S.**; Sencanski M.; Danel M.; Menendez C.; Belguedj R.; Bouraiou A.; Nikolic K.; Cojean S.; Loiseau P. M.; Glisic S.; Baltas M. and García-Sosa A. T. Synthesis, *in silico*, and *in vitro* evaluation of anti-leishmanial activity of oxadiazoles and indolizine containing compounds flagged against anti-targets. *Molecules* 2019, 24: 2182 **(2019, Chemistry/Multidisciplinary 70/177, IF 3.267, M22)**
2. **Stevanovic S.**; Perdih A.; Senčanski M.; Glišić S.; Duarte M; Tomás A. M.; Filipa V. Sena F. V.; Sousa F. M.; Pereira M. M. and Solmajer T. *In silico* discovery of a substituted 6-methoxy-quinalidine with leishmanicidal activity in leishmania infantum. *Molecules* 2018, 23: 772; **(2018, Chemistry/Multidisciplinary 67/172, IF 3.060, M22)**
3. Glisic, S.; Sencanski, M. Perovic, V.; **Stevanovic S.**; Garcia-Sosa, A.T. Arginase flavonoid anti-leishmanial *in silico* inhibitors flagged against anti-targets. *Molecules*, 2016, 21(5): 589. **(2015, Chemistry, Organic 24/59, IF: 2.465, M22)**

Radovi saopšteni na međunarodnim naučnim skupovima:

1. **Stevanovic S.**; Perdih A.; Glisic, S.; Solmajer, T. Design of novel NADH dehydrogenase inhibitors as antileishmanial agents. Presented at the 3 rd COST 1307 Action Conference, Madrid, Spain, Oct. 24-26, 2016. **(M33)**
2. **Stevanovic. S.**; Glisic, S.; Sencanski, M.; Mori, M.; Botta M. Study of leishamnia type II NDH2 dehydrogenase inhibition mechanism using molecular dynamics (MD). Poster presented at the 2 nd training school, COST 1307 Action, Siena, Italy, May 19-21, 2017. **(M34)**
3. **Stevanovic S.** Discovery of the phenolic monoterpene carvacrol binding sites in the nicotinic acetylcholine receptors (ion gated channels) within parasitic nematode. COST Action CM1307, Joint COST Action CM1307 2nd Conference / WG2 and WG3 Meetings. **(M34)**

5 ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorsku disertaciju čine dva dela sa eksperimentalnim radom, koji obuhvataju *in silico* i *in vitro* metodologiju.

U prvom delu rada, razvijena su dva protokola za virtualni skrining u vezi sa ciljanim mestima dejstva, esencijalnim i specifičnim enzimima za preživljavanje parazita. Protokoli su fomirani na osnovu modela zasnovanih na strukturi liganda i receptora, koji pokazuju saglasnost u rezultatima predviđanja.

U drugom delu rada izvršeno je *in vitro* testiranje na par vrsta lajšmanija (*Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*) i jednom bakterijskom (*Staphylococcus aureus*), radi ispitivanja aktivnosti i specifičnosti jedinjenja, predloženih za kandidate.

Rezultati primene VS protokola su 19 potencijalnih kandidata, hemijske klase flavonoida, oksadiazola, indolizina, aldoksima, N-acilhidrazona i hinaldina. Za jedinjenja koja se dobijaju metodama automatizovane sinteze, dat je opis postupka pripreme.

Iz grupe flavonoida izdvaja se (-)-Epikatehin galat (CAS1257-08-5) koji se pokazao kao potencijalni inhibitor rasta na osnovu VS protokola koje ima za ciljno mesto enzim *L. amazonensis* arginazu. Kao prirodni proizvodi, za ovo jedinjenje se očekuje da pokaže manje toksično dejstvo na ćelije domaćina i zbog toga ima potencijal za razvoj selektivnog terapeutika. Mehanizam dejstva, koji je u vezi inhibicijom arginaze, predstavlja osnovu za razvoj specifičnog inhibitora. Kao dodatni rezultat, utvrđeno je da se sistematizovanom pretragom pronalaze pouzdani kandidati, a ono što ostaje je da se inhibitorna aktivnost jedinjenja potvrdi *in vitro*.

Iz grupe N-acilhidrazona izdvaja se N'-[(5-bromo-2-tiofenil)methilen]tiofen-2-karbohidrazid sa najboljim odnosom inhibitornog potencijalna i citotoksičnosti na osnovu *in vitro* merenja (SI 2,2). I za ovo jedinjenje postoji mogućnost razvoja ciljnog inhibitora arginaze lajšmanija.

Iz grupe kandidata dobijenih na osnovu modela derivata hinolona, izdvaja se derivat 6-metoksi-hinaldina (N-[3-hloro-4-(4-hloronaftalen-1-il)oksifenil]-6-metoksi-hinaldin-4-amin) i ova struktura ima potencijalno širok spektar mikrobicidnog dejstva. Navedene su smernice za optimizaciju strukture jedinjenja i povećanja selektivnosti. Ono što bi karakterisalo terapeutike, reznvijene na osnovu strukture hinolona je mehanizam dejstva kao inhibitora alternativne NADH dehidrogenaze.

Dobijeni rezultati imaju potencijal kao osnova za razvoj efikasnih, specifičnih i selektivnih terapeutika u lečenju oboljenja lajšmanioze. Uz sve navedeno, opšti rezultat ove doktorske disertacije se ogleda u ispunjenju svih postavljenih zadataka sa ciljem *in silico* selekcije i *in vitro* ispitivanja inhibitora rasta *Leishmania* spp.

Predlog Komisije

Na osnovu izloženog, Komisija zaključuje da je kandidat mast. hem. Strahinja Stevanović 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 3 rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), 1 saopštenje na međunarodnom naučnom skupu štampano u celini (M33) i 2 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampana u izvodu (M34).

Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju mast. hem. Strahinje Stevanovića 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:

„*In silico* selekcija i *in vitro* ispitivanja prirodnih i sintetskih inhibitora rasta parazita *Leishmania* spp.”

Članovi Komisije:

1. _____

Dr sc. Sanja Glišić, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „Vinča“

2. _____

Dr. sc. Brankica Filipić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. _____

Dr. sc. Vladimir Dobričić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Mentori:

Dr sc. Katarina Nikolić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr sc. Milan Senćanski, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke „Vinča“

U Beogradu, 5. novembar 2021.