

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Milan J. Jovanović

**HEMINFORMATIČKA ANALIZA, DIZAJN I
ISPITIVANJE INHIBITORA LIPIDNIH I
PROTEIN KINAZA KAO POTENCIJALNO
NOVIH ANTINEOPLASTIKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Milan J. Jovanović

**HEMINFORMATIČKA ANALIZA, DIZAJN I
ISPITIVANJE INHIBITORA LIPIDNIH I
PROTEIN KINAZA KAO POTENCIJALNO
NOVIH ANTINEOPLASTIKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Milan J. Jovanović

**Cheminformatics analysis, design, and testing of
lipid and protein kinase inhibitors as potential new
antineoplastic agents**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2026

Mentori doktorske disertacije:

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

2. Dr sc. Milkica Crevar, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije:

1. Dr sc. Branka Ivković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. Dr sc. Mara Aleksić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

3. Dr sc. Slavica Oljačić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

4. Dr sc. Marija Popović Nikolić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

5. Dr sc. Branislav Stanković, viši naučni saradnik
Institut za nuklearne nauke „Vinča”,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorki, prof. dr Katarini Nikolić, na ukazanom poverenju, stručnoj podršci, dragocenim savetima i nesebičnoj pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije. Njena posvećenost, iskustvo i kontinuirano usmeravanje imali su izuzetan značaj u oblikovanju istraživačkog rada, tumačenju dobijenih rezultata i konačnom oblikovanju disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Milkici Crevar, na stručnoj pomoći, korisnim sugestijama, podršci i razumevanju tokom realizacije eksperimentalnog dela istraživanja. Njeni saveti i iskustvo značajno su doprineli kvalitetu ovog rada.

Veliku zahvalnost upućujem članovima Komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije: prof. dr Branki Ivković, prof. dr Mari Aleksić, prof. dr Slavici Oljačić, dr Mariji Popović Nikolić, višem naučnom saradniku, i dr Branislavu Stankoviću, višem naučnom saradniku, na pažljivom čitanju rukopisa, izdvojenom vremenu, korisnim komentarima i sugestijama koje su doprinele unapređenju kvaliteta ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se nastavnicima i saradnicima Katedre za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na podršci, kolegijalnosti i prijatnom radnom okruženju tokom doktorskih studija.

Na kraju, posebnu zahvalnost upućujem svojoj porodici i prijateljima na razumevanju, strpljenju i podršci tokom svih godina rada na doktorskoj disertaciji.

Heminformatička analiza, dizajn i ispitivanje inhibitora lipidnih i protein kinaza kao potencijalno novih antineoplastika

Sažetak

Kinazni inhibitori predstavljaju važnu grupu ciljanih antineoplastika, čiji razvoj zahteva optimizaciju aktivnosti, selektivnosti i farmakokinetičko-toksikološkog profila. U disertaciji su ispitivani kombinovanim eksperimentalnim i računarskim metodama.

Permeabilnost kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) ispitana je paralelnim testom permeabilnosti na veštačkim membranama za KMB (PAMPA-KMB) i opisana modelima kvantitativnog odnosa strukture i osobina (QSPR). Model zasnovan na potpornoj vektorskoj regresiji (QSPR-SVR) bio je najpouzdaniji ($R^2 = 0,839$; $Q^2 = 0,648$; $R^2_{\text{pred}} = 0,777$), a analiza deskriptora ukazala je na značaj topološkog rasporeda donora i akceptora vodoničnih veza, i određenih atomskih parova.

Erlotinib je, kao predstavnik kinaznih inhibitora, ispitan radi procene redoks ponašanja i potencijala za interakciju sa DNK. Redoks procesi bili su ireverzibilni, a sekundarna aromatična amino grupa izdvojena je kao najverovatnije elektroaktivno mesto najizraženijeg oksidacionog procesa. Primenom DNK-biosenzora određena je konstanta vezivanja $K = 8,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, dok su doking i molekulska dinamika ukazali na interkalaciju kao verovatniji način vezivanja.

Dizajnirani su potencijalno selektivni inhibitori α izoforme fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K α). Molekulska dinamika korišćena je za izbor reprezentativnih konformacija aktivnog mesta, ansambl doking za procenu vezivanja, a odabrane vezane konformacije za razvoj trodimenzionalnih modela kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (3D-QSAR). Modeli za PI3K izoforme pokazali su validacione parametre ($R^2 = 0,93\text{--}0,96$; $Q^2 = 0,77\text{--}0,88$; $R^2_{\text{pred}} = 0,71\text{--}0,75$). Na osnovu smernica dizajnirana su 23 jedinjenja, virtuelnim skriningom izdvojeno je osam aktivnih PI3K α inhibitora, a D4, D5, D23 i VS1 odabrani su za dalju optimizaciju.

Ključne reči: protein kinaze, selektivni PI3K α inhibitori, PAMPA-KMB, QSPR, 3D-QSAR, molekulski doking, molekulska dinamika, erlotinib, DNK-biosenzor, voltametrij

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska medicinska hemija

Cheminformatics analysis, design, and testing of lipid and protein kinase inhibitors as potential new antineoplastic agents

Abstract

Kinase inhibitors represent an important group of targeted antineoplastic agents, whose development requires the optimization of activity, selectivity, and pharmacokinetic-toxicological profile. In this dissertation, they were investigated using combined experimental and computational methods.

Permeability across the blood-brain barrier (BBB) was examined using the Parallel Artificial Membrane Permeability Assay for the BBB (PAMPA-BBB) and described by quantitative structure-property relationship (QSPR) models. The model based on support vector regression (QSPR-SVR) was the most reliable ($R^2 = 0.839$; $Q^2 = 0.648$; $R^2_{\text{pred}} = 0.777$), while descriptor analysis indicated the importance of the topological arrangement of hydrogen-bond donors and acceptors, as well as specific atomic pairs.

Erlotinib, as a representative kinase inhibitor, was examined to assess its redox behavior and potential for interaction with DNA. The redox processes were irreversible, while the secondary aromatic amino group was identified as the most probable electroactive site of the most pronounced oxidation process. Using a DNA-biosensor, a binding constant of $K = 8.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ was determined, whereas docking and molecular dynamics indicated intercalation as the more probable DNA-binding mode.

Potentially selective inhibitors of the α isoform of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K α) were designed. Molecular dynamics was used to select representative active-site conformations, ensemble docking to assess ligand binding, and selected bound conformations to develop three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) models. The models for PI3K isoforms showed good validation parameters ($R^2 = 0.93\text{--}0.96$; $Q^2 = 0.77\text{--}0.88$; $R^2_{\text{pred}} = 0.71\text{--}0.75$). Based on the obtained guidelines, 23 compounds were designed, while virtual screening identified eight active PI3K α inhibitors, and D4, D5, D23, and VS1 were selected for further optimization.

Keywords: protein kinases, selective PI3K α inhibitors, PAMPA-BBB, QSPR, 3D-QSAR, molecular docking, molecular dynamics, erlotinib, DNA biosensor, voltammetry

Research area: Pharmacy

Research field: Pharmaceutical medicinal chemistry

Spisak skraćenica

3D-QSAR – Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship (trodimenzionalni kvantitativni odnos strukture i aktivnosti)
AD – Applicability Domain (domen primenljivosti)
ADMET – Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija i toksičnost)
AKT/PKB – Protein Kinase B (protein-kinaza B)
ANN – Artificial Neural Networks (veštačke neuronske mreže)
ATP – adenozin-trifosfat
AUC – Area Under the Curve (površina ispod krive)
BCR–ABL – Breakpoint Cluster Region-Abelson (BCR–ABL fuziona tirozin-kinaza)
BRAF/B-Raf – B-Raf Serine/Threonine-Protein Kinase (B-Raf serin/treonin-protein-kinaza)
Bzo – benzoksazepinski klaster
CADD – Computer-Aided Drug Design (računarski potpomognut dizajn lekova)
CCC – Concordance Correlation Coefficient (koeficijent konkordantne korelacije)
CDK4/6 – Cyclin-Dependent Kinases 4/6 (ciklin-zavisne kinaze 4 i 6)
CLACC – Consistently Large Auto and Cross-Correlation
CNS – centralni nervni sistem
ct-DNK – Calf Thymus DNA (DNK iz timusa teleta)
CV – Cyclic Voltammetry (ciklična voltametrij); Cross-Validation (unakrsna validacija)
CYP – citohrom P450
DFG – Asp-Phe-Gly motiv
DFT – Density Functional Theory (teorija funkcionala gustine)
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
DPV – Differential Pulse Voltammetry (diferencijalno pulsna voltametrij)
DRY – GRID proba za hidrofobne interakcije
dsDNA – Double-Stranded DNA (dvolančana DNK)
EF – Enrichment Factor (faktor obogaćenja)
EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor (receptor epidermalnog faktora rasta)
ERK – Extracellular Signal-Regulated Kinases (kinaze regulisane ekstracelularnim signalima)
ERL – erlotinib
GA – Genetic Algorithm (genetski algoritam)
GCE – Glassy Carbon Electrode (elektroda od staklastog ugljenika)
GPCR – G-Protein-Coupled Receptor (G-protein spregnuti receptor)
GRIND – GRid-INdependent Descriptors (deskriptori nezavisni od poravnanja)
GRIND-2 – unapređena varijanta GRIND deskriptora
HBA – Hydrogen Bond Acceptor (akceptor vodonične veze)
HBD – Hydrogen Bond Donor (donor vodonične veze)
HER2 – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (receptor 2 humanog epidermalnog faktora rasta)
HPLC – High-Performance Liquid Chromatography (tečna hromatografija visokih performansi)
IC₅₀ – Half-Maximal Inhibitory Concentration (koncentracija koja dovodi do 50% inhibicije)
K_i – konstanta inhibicije
KMB – krvno-moždana barijera
LAP – lapatinib
LBDD – Ligand-Based Drug Design (dizajn lekova zasnovan na strukturi liganada)
LC-MS/MS – Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (tečna hromatografija spregnuta sa tandemskom masenom spektrometrijom)
LDA – Linear Discriminant Analysis (linearna diskriminantna analiza)
LMO – Leave-Many-Out unakrsna validacija
logP – logaritamska vrednost particionog koeficijenta
logPe – logaritamska vrednost efektivne permeabilnosti

LOO – Leave-One-Out unakrsna validacija
 MACC – Maximum Auto- and Cross-Correlation (maksimalna auto- i unakrsna korelacija)
 MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinases (mitogenom aktivirane protein-kinaze)
 MD – Molecular Dynamics (molekulska dinamika)
 MIF – Molecular Interaction Fields (molekulska interakciona polja)
 MLR – Multiple Linear Regression (višestruka linearna regresija)
 MLOGP – Moriguchi logP
 MM – Molecular Mechanics (molekulska mehanika)
 MM/GBSA – Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area
 MM/PBSA – Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area
 mTOR – Mechanistic Target of Rapamycin (mehanistička meta rapamicina)
 mTORC1 – Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 (kompleks 1 mehanističke mete rapamicina)
 mTORC2 – Mechanistic Target of Rapamycin Complex 2 (kompleks 2 mehanističke mete rapamicina)
 MW – Molecular Weight (molekulska masa)
 N1 – GRID proba (planarni amidski azot, donor vodonične veze)
 NPT – ansambl sa konstantnim brojem čestica, pritiskom i temperaturom
 NSCLC – Non-Small Cell Lung Cancer (nesitnoćelijski karcinom pluća)
 NVT – ansambl sa konstantnim brojem čestica, zapreminom i temperaturom
 O – GRID proba (sp^2 hibridizovani karbonilni kiseonik, akceptor vodonične veze)
 PAMPA – Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama)
 PAMPA-KMB – PAMPA model za procenu permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru
 PAMPA-SVR – PAMPA-QSPR model zasnovan na potpornoj vektorskoj regresiji
 PB – Poisson-Boltzmann
 PBC – Periodic Boundary Conditions (periodični granični uslovi)
 PBS – Phosphate-Buffered Saline (fosfatni pufer)
 P_e – efektivna permeabilnost
 P-gp – P-glikoprotein
 pH – negativni dekadni logaritam aktivnosti vodonikovih jona
 PH – Pleckstrin Homology domen
 PI3K – Phosphatidylinositol-3-Kinase (fosfatidilinozitol-3-kinaza)
 PI3K α – alfa izoforma fosfatidilinozitol-3-kinaze
 PI3K β – beta izoforma fosfatidilinozitol-3-kinaze
 PI3K γ – gama izoforma fosfatidilinozitol-3-kinaze
 PI3K δ – delta izoforma fosfatidilinozitol-3-kinaze
 PIKK – Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinases (protein-kinaze srodne fosfatidilinozitol-3-kinazama)
 PIP₂ – fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat
 PIP₃ – fosfatidilinozitol-3,4,5-trisfosfat
 PLS – Partial Least Squares (metoda parcijalnih najmanjih kvadrata)
 PM3 – Parameterized Model revision 3
 PME – Particle Mesh Ewald
 pK_i – negativni dekadni logaritam konstante inhibicije
 PTEN – Phosphatase and Tensin Homolog
 Q² – koeficijent prediktivne sposobnosti određen unakrsnom validacijom
 QSPR – Quantitative Structure-Property Relationship (kvantitativni odnos strukture i osobina)
 QSAR – Quantitative Structure-Activity Relationship (kvantitativni odnos strukture i aktivnosti)
 R² – koeficijent determinacije
 R²_{pred} – koeficijent determinacije za test set
 RAF – Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Kinases (RAF kinaze)

RAS – RAS GTPaze
RBF – Radial Basis Function (radijalna bazna funkcija)
RMSD – Root-Mean-Square Deviation (koren srednjeg kvadratnog odstupanja atomskih pozicija)
RMSF – Root-Mean-Square Fluctuation (koren srednje kvadratne fluktuacije atomskih pozicija)
RMSEE – Root Mean Square Error of Estimation (koren srednje kvadratne greške procene)
RMSEP – Root Mean Square Error of Prediction (koren srednje kvadratne greške predikcije)
ROC – Receiver Operating Characteristic kriva
ROCK – Rho-Associated Coiled-Coil-Containing Protein Kinases (Rho-asocirane protein-kinaze)
RTK – Receptor Tyrosine Kinases (receptorske tirozin-kinaze)
SBDD – Structure-Based Drug Design (dizajn lekova zasnovan na strukturi ciljnog mesta)
SBVS – Structure-Based Virtual Screening (virtuelni skrining zasnovan na strukturi ciljnog mesta)
SMKI – Small-Molecule Kinase Inhibitors (mali molekularni inhibitori kinaza)
Src – Sarcoma Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase (tirozin-protein-kinaza protoonkogeni sarkoma)
SVR – Support Vector Regression (potporna vektorska regresija)
SVM – Support Vector Machine (metoda potpornih vektora)
SWV – Square-Wave Voltammetry (voltametrijna pravougaonih talasa)
TBM – Template-Based Modeling (modelovanje zasnovano na šablonu)
Thz – tiazolni klaster
TIP – GRID proba za sterične interakcije
TIP3P – Transferable Intermolecular Potential with 3 Points model vode
TPSA – Topological Polar Surface Area (topološka polarna površina)
UV – ultravioletna detekcija
UV-VIS – ultravioletno-vidljiva spektroskopija
VdW – *van der Waals* interakcije
VEGFR – Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta)
VS – Virtual Screening (virtuelni skrining)
XED – eXtended Electron Distribution
zDOPE – Z-Score Normalized Discrete Optimized Protein Energy

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Maligni tumori	2
1.2. Protein kinaze.....	3
1.2.1. Struktura protein kinaza	3
1.2.2. Podela protein kinaza	7
1.2.3. Inhibitori protein kinaza.....	11
1.3. Lipidne kinaze	17
1.4. Fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K)	18
1.4.1. Struktura PI3K enzima.....	21
1.4.2. PI3K inhibitori	23
1.4.2.1. Tipovi PI3K inhibitora	25
1.4.2.2. PI3K α selektivni inhibitori.....	27
1.5. Dizajn kinaznih inhibitora računarskim metodama	29
1.6. Metode u dizajnu lekova bazirane na strukturi ciljnog mesta	30
1.6.1. Homologno modelovanje.....	32
1.6.2. Molekulski doking	34
1.6.3. Molekulska dinamika.....	37
1.6.3.1. Analiza trajektorije molekulske dinamike	39
1.6.3.2. Procena slobodne energije vezivanja MM/PBSA metodom	40
1.6.4. Strukturno bazirani virtuelni skrining	41
1.7. Metode u dizajnu lekova bazirane na strukturi liganada	42
1.7.1. QSAR i QSPR analize	43
1.7.1.1. Tipovi modela i primenjivani deskriptori	44
1.7.1.2. 3D-QSAR modeli zasnovani na poljima molekulskih interakcija.....	45
1.7.2. Metode mašinskog učenja u QSAR i QSPR analizi	47
1.7.2.1. Višestruka linearna regresija	47
1.7.2.2. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata	48
1.7.2.3. Veštačke neuronske mreže	49
1.7.2.4. Potporna vektorska regresija.....	51
1.7.3. Validacija.....	52
1.7.4. Domen primenljivosti	55
1.7.5. Strategije dizajniranja novih jedinjenja u okviru LBDD	56
1.7.5.1. Strukturne modifikacije i generisanje novih liganada u LBDD.....	56
1.7.5.2. <i>Scaffold hopping</i> kao strategija dizajniranja novih hemijskih klasa jedinjenja	57
1.8. Terapijski potencijal i izazovi kinaznih inhibitora u bolestima CNS-a	57

1.8.1.	<i>In vitro</i> metode za ispitivanje permeabilnosti kroz KMB.....	59
1.8.2.	Paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama	60
1.9.	Kinazni inhibitori i DNK - potencijalne interakcije i biološki značaj.....	62
1.9.1.	Tipovi interakcija liganada i molekula DNK.....	63
1.9.2.	Voltometrijsko ispitivanje interakcija kinaznih inhibitora sa DNK	64
1.9.2.1.	Voltometrijske tehnike	65
1.9.2.2.	DNK-biosenzor i ispitivanje konstante vezivanja za DNK	69
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	73
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	76
3.1.	Opšti podaci.....	77
3.1.1.	Standardi i hemikalije	77
3.1.2.	Oprema.....	78
3.1.3.	Računarski programi	78
3.2.	PAMPA-KMB ispitivanje i QSPR modelovanje permeabilnosti kinaznih inhibitora	79
3.2.1.	Izvođenje PAMPA testa.....	79
3.2.2.	Analiza rezultata PAMPA-KMB testa primenom HPLC metode	82
3.2.3.	Priprema seta podataka za PAMPA-KMB QSPR modelovanje	82
3.2.4.	Računanje molekulskih deskriptora.....	83
3.2.5.	QSPR modelovanje.....	83
3.2.6.	Validacija QSPR modela.....	84
3.2.7.	Domen primenljivosti	84
3.3.	Elektrohemijsko i računarsko ispitivanje erlotiniba i njegove interakcije sa DNK..	84
3.3.1.	Aparatura.....	84
3.3.2.	Reagensi i rastvori.....	85
3.3.3.	Priprema DNK-biosenzora.....	85
3.3.4.	Voltometrijska merenja	85
3.3.5.	Molekulski doking	86
3.3.6.	Molekulska dinamika.....	86
3.4.	Računarski dizajn i <i>in silico</i> karakterizacija potencijalno selektivnih PI3Kα inhibitora.....	87
3.4.1.	Priprema seta podataka i proteinskih struktura	87
3.4.2.	Homologno modelovanje.....	88
3.4.3.	Simulacije molekulske dinamike	88
3.4.4.	Ansambl doking	89
3.4.5.	3D-QSAR studija.....	89
3.4.6.	Validacija 3D-QSAR modela.....	90

3.4.7.	Domen primenljivosti	90
3.4.8.	Dizajn novih potencijalno selektivnih inhibitora PI3K α	90
3.4.9.	Strukturno zasnovan virtuelni skrining	91
3.4.10.	Linearna diskriminantna analiza – SBVS modelovanje	91
3.4.11.	Predikcija fizičko-hemijskih i ADMET karakteristika	92
3.4.12.	Procena permeabilnosti kroz KMB primenom PAMPA-SVR QSPR modela i dodatna strukturna analiza dizajniranih PI3K α inhibitora	92
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	93
4.1.	Rezultati i diskusija PAMPA-KMB QSPR studije	94
4.1.1.	Rezultati PAMPA testa	94
4.1.2.	QSPR modelovanje	97
4.1.3.	Interpretacija QSPR modela	99
4.1.4.	Usporedna analiza rezultata studije sa podacima iz literature	101
4.2.	Rezultati i diskusija elektrohemijske i računarske studije erlotiniba	102
4.2.1.	Ciklična voltametrijna erlotiniba na nemodifikovanoj GCE	102
4.2.2.	DPV i SWV analiza erlotiniba na nemodifikovanoj GCE	108
4.2.3.	Mehanistička analiza reakcija oksidacije i redukcije erlotiniba	110
4.2.4.	Elektrohemijsko ispitivanje interakcije erlotiniba sa DNK	112
4.2.5.	Računarsko modelovanje interakcije erlotiniba sa DNK	114
4.2.6.	Usporedna analiza rezultata studije sa podacima iz literature	117
4.3.	Rezultati i diskusija dizajna selektivnih PI3Kα inhibitora	118
4.3.1.	Homologno modelovanje	118
4.3.2.	Simulacije molekulske dinamike i molekularni doking	119
4.3.3.	Validacija 3D-QSAR studije i definisani domeni primenljivosti	126
4.3.4.	Analiza rezultata 3D-QSAR i molekularnog dokinga	128
4.3.4.1.	PI3K α 3D-QSAR model	129
4.3.4.2.	Studija molekularnog dokinga PI3K α izoforme	131
4.3.4.3.	Usporedna analiza rezultata PI3K α izoforme	132
4.3.4.4.	PI3K β 3D-QSAR model	132
4.3.4.5.	Studija molekularnog dokinga PI3K β izoforme	135
4.3.4.6.	Usporedna analiza rezultata PI3K β izoforme	136
4.3.4.7.	PI3K γ 3D-QSAR model	136
4.3.4.8.	Studija molekularnog dokinga PI3K γ izoforme	139
4.3.4.9.	Usporedna analiza rezultata PI3K γ izoforme	139
4.3.4.10.	PI3K δ 3D-QSAR model	139
4.3.4.11.	Studija molekularnog dokinga PI3K δ izoforme	142
4.3.4.12.	Usporedna analiza rezultata PI3K δ izoforme	143

4.3.5.	Uporedna analiza 3D-QSAR i doking studija sa definisanjem strukturnih determinanti i smernica za dizajn selektivnih PI3K α inhibitora	143
4.3.6.	Dizajn novih selektivnih PI3K α inhibitora	144
4.3.7.	Strukturno zasnovani virtuelni skrining.....	152
4.3.8.	Ispitivanje hemijskog prostora pokrivenog ispitivanim jedinjenjima.....	156
4.3.9.	<i>In silico</i> ADMET profilisanje seta podataka, dizajniranih i VS jedinjenja.....	157
4.3.10.	Procena permeabilnosti kroz KMB primenom PAMPA-SVR QSPR modela i dodatna strukturna analiza dizajniranih PI3K α inhibitora	160
4.3.11.	Uporedna analiza rezultata studije sa podacima iz literature.....	163
5.	ZAKLJUČAK	165
6.	LITERATURA.....	169
7.	PRILOZI	212

1. UVOD

1.1. Maligni tumori

Maligni tumori predstavljaju veliku i heterogenu grupu oboljenja koje karakterišu nekontrolisano umnožavanje abnormalnih ćelija, invazija u okolna tkiva i mogućnost širenja u udaljene organe [1–3]. Prema najnovijim globalnim procenama, u 2022. godini zabeleženo je približno 20 miliona novih slučajeva malignih tumora i 9,7 miliona smrtnih ishoda, zbog čega ova oboljenja predstavljaju jedan od vodećih uzroka smrti u svetu [1,2]. Etiološki, maligni tumor je genetska bolest koja primarno nastaje usled promena u genima koji kontrolišu način na koji ćelije rastu, dele i preživljavaju. Ove promene mogu nastati usled grešaka tokom deobe ćelija, usled izlaganja faktorima iz životne sredine koji oštećuju DNK, ili mogu biti nasledne [3].

Pored genetskih promena, u nastanku i progresiji malignih tumora značajnu ulogu imaju i epigenetske promene, odnosno promene u regulaciji ekspresije gena koje utiču na fenotip, a ne podrazumevaju promenu primarne sekvence DNK. Ovi procesi primarno uključuju promene u metilaciji DNK, modifikacije histona, remodelovanje hromatina i regulaciju posredovanu nekodirajućim RNK molekulima [4,5]. Epigenetski poremećaji mogu delovati zajedno sa genetskim promenama i doprineti izmenjenoj ekspresiji gena uključenih u ćelijski rast, diferencijaciju i progresiju tumora [4,6].

Posledice pomenutih genetskih i epigenetskih promena primarno se ispoljavaju kroz poremećaj strogo kontrolisanih mehanizama koji u normalnim uslovima kontrolišu napredovanje kroz ćelijski ciklus i ćelijsku deobu. Zbog toga je za razumevanje nastanka i progresije malignih tumora značajno razumeti osnovne faze ćelijskog ciklusa. Kod normalne ćelije, ćelijski ciklus obuhvata interfazu, koja je podeljena na G1 fazu (rast ćelije i priprema za sintezu DNK), S fazu (replikacija DNK), G2 fazu (priprema za mitozu), nakon koje sledi M faza (mitoza i ćelijska deoba) [7]. Poremećaj regulacije ćelijskog ciklusa povezan je sa nenormalnim rastom i umnožavanjem ćelija u malignom tumoru [3,7].

Iako maligni tumori dele brojna zajednička biološka obeležja, među njima postoje značajne razlike u pogledu učestalosti, molekulskih karakteristika i kliničkog ponašanja. Među njima, prema svom epidemiološkom značaju, posebno mesto zauzima karcinom dojke, koji je u 2022. godini bio najčešći maligni tumor kod žena u svetu, sa oko 2,3 miliona novoobolelih i približno 670 000 smrtnih ishoda [1,8]. Karcinom dojke nastaje u tkivu dojke, najčešće u mlečnim kanalima ili malim režnjima, a za njegovu klasifikaciju i planiranje terapije od posebnog značaja su biomarkeri kao što su estrogenski receptor (engl. *estrogen receptor*, ER), progesteronski receptor (engl. *progesterone receptor*, PR) i receptor 2 humanog epidermalnog faktora rasta (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) [9,10].

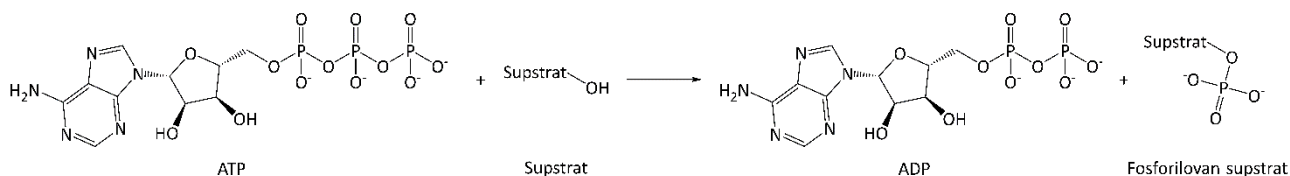
Jedna od najvažnijih karakteristika progresije malignih tumora jeste sposobnost metastaziranja, odnosno proces u kojem se neoplastične ćelije odvajaju od primarnog tumora, šire krvnim ili limfnim putem i formiraju sekundarne tumore u drugim tkivima i organima. Iako metastatski tumori zadržavaju osnovne osobine primarnog tumora, metastaza ne predstavlja novi tip malignog tumora, već širenje već postojeće maligne bolesti, njihovo prisustvo definiše uznapredovalu fazu bolesti čije kliničke manifestacije zavise od veličine i lokalizacije sekundarnih lezija [11].

Savremeno lečenje maligniteta zasniva se na istovremenoj primeni lokalnih i sistemskih terapijskih pristupa. Lokalni oblici terapije obuhvataju hirurgiju i radioterapiju, dok sistemska terapija može uključiti citotoksičnu hemioterapiju, hormonsku terapiju, ciljanu terapiju i imunoterapiju. Izbor optimalne terapijske strategije predstavlja ishod personalizovanog pristupa koji zavisi od tipa tumora, kliničkog stadijuma bolesti, mesta eventualnog širenja i opšteg stanja pacijenta [2,12].

1.2. Protein kinaze

Razvoj i progresija mnogih tipova malignih tumora je u korelaciji sa poremećajem ćelijske signalizacije posredovane velikim brojem kinaza. Ovi enzimi imaju važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, rasta, diferencijacije, preživljavanja i migracije ćelija, pa promene koje dovode do njihove aberantne aktivnosti značajno doprinose nastanku i progresiji malignih bolesti [13,14]. U zavisnosti od specifične uloge posmatrane kinaze u regulaciji ćelijskog ciklusa, dominantni efekti njenih inhibitora se mogu razlikovati; za pojedine grupe inhibitora je u literaturi opisan zastoj u G1 fazi, dok su za druge navedeni poremećaji S faze i G2/M kontrolne tačke, kao i blokada mitoze [15–17]. Napredak u razumevanju molekulskih mehanizama ćelijske signalizacije, zajedno sa razvojem savremenih strukturnih i bioinformatičkih tehnika, omogućio je identifikaciju kinaza kao jedne od najvažnijih grupa farmakoloških ciljeva u onkologiji [13,18].

Kinaze predstavljaju veliku grupu enzima koji katalizuju transfer fosfatne grupe sa adenzin trifosfata (ATP) na odgovarajući supstrat (Slika 1.1). Iako sve kinaze u osnovi katalizuju istu reakciju prenosa fosfatne grupe, ovi enzimi pokazuju visok stepen raznolikosti u pogledu specifičnosti prema supstratu, trodimenzionalnoj strukturi i biološkim putevima u kojima učestvuju. Prema prirodi supstrata mogu se grupisati u više velikih grupa kao što su **proteinske, lipidne i ugljeno-hidratne kinaze** [19]. Pored ovih glavnih kategorija, prisutne su i brojne metaboličke kinaze, kao što su nukleotidne, nukleozidne, vitamin- i druge koenzimske kinaze koje deluju na male molekule i metaboličke intermedijere [5,6]. Ovakva klasifikacija ukazuje da kinaze nisu ograničene samo na enzime uključene u ćelijsku signalizaciju, već da, kao specifične fosfotransferaze, učestvuju u primarnom metabolizmu, biosintezi koenzima i energetsom balansu ćelije.



Slika 1.1. Hemijski prikaz reakcije katalizovane kinazama.

Protein kinaze su enzimi koji katalizuju fosforilaciju specifičnih proteina i imaju ključnu ulogu u regulaciji brojnih ćelijskih procesa i signalnih puteva [7]. Većina protein kinaza u svom aktiviranom obliku podstiče proliferaciju, preživljavanje i migraciju ćelija, zbog čega su često povezane sa karcinogenezom i metastazama različitih tipova malignih tumora [4,8,9]. Međutim, zbog njihovih raznovrsnih fizioloških uloga u vitalnim organima i sistemima (poput centralnog nervnog sistema, bubrega i miokarda), pored uloge u razvoju malignih tumora, poremećaji u fosforilacionim procesima mogu biti povezani i sa brojnim drugim oboljenjima, uključujući dijabetes tipa II, kardiovaskularne bolesti, Alchajmerovu bolest i druga neurodegenerativna stanja [10].

1.2.1. Struktura protein kinaza

Protein kinaze poseduju karakterističnu domensku strukturnu organizaciju u kojoj **katalitički**, odnosno **kinazni domen** ima centralnu ulogu u fosforilaciji proteina, dok dodatni **regulatorni domeni** doprinose kontroli aktivnosti i specifičnosti enzima. Ovakva strukturna organizacija omogućava kinazama da integrišu signale iz više izvora, prepoznaju specifične supstrate, pravilno se lokalizuju u ćeliji i precizno regulišu svoju katalitičku aktivnost [11,12]. *Knighton* i saradnici su 1991. godine odredili kristalnu strukturu ciklični adenzin monofosfat (cAMP)-zavisne protein kinaze i po prvi put detaljno opisali njenu arhitekturu. Ovaj strukturni model postao je osnova za razumevanje građe i organizacije svih do danas poznatih protein kinaza [13].

Katalitički domen protein-kinaza je visoko konzerviran i poseduje tipičnu arhitekturu sastavljenu od dva režnja (engl. *bilobal structure*) – **N-režanj** (engl. *N-lobe*) i **C-režanj** (engl. *C-lobe*). Između ovih poddomena je formirana pukotina koja predstavlja aktivno mesto, unutar kojeg dolazi do vezivanja ATP-a i fosforilacije supstrata. Ova dva režnja povezuje **zglobni** (engl. *hinge*) **region** – kratak strukturni segment koji omogućava adeninskom prstenu ATP-a da ostvari vodonične veze sa proteinom. Ovakva prostorna organizacija je ključna za pravilno pozicioniranje supstrata i katalizu transfera fosfatne grupe [11,14,15].

N-režanj je kompaktniji i građen od pet antiparalelnih β -lanaca ($\beta 1$ – $\beta 5$) i jednog α -heliksa (αC). Između $\beta 1$ i $\beta 2$ lanca nalazi se **glicinom bogata petlja** (*GxGxxG* motiv, **P-petlja**), koja učestvuje u stabilizaciji γ -fosfatne grupe molekula ATP-a i njenom pravilnom pozicioniranju u odnosu na katalitičko mesto [16–19]. Ključni regulatorni element N-režnja je **αC -heliks**, čiji položaj određuje da li je kinaza u aktivnom ili neaktivnom stanju. αC -heliks može zauzimati dve glavne konformacije:

- **αC -unutar** (engl. *αC -in*) konformaciju – karakteristična za aktivno stanje, u kojoj je αC -heliks usmeren ka katalitičkom centru (unutrašnjosti džepa), pri čemu konzervirana glutaminska kiselina formira jonski most sa bočnim lancem lizina iz $\beta 3$ lanca.
- **αC -van** (engl. *αC -out*) konformaciju – tipičnu za neaktivno stanje, u kojoj se αC -heliks udaljava od aktivnog mesta [20,21].

C-režanj je većeg obima i građu pretežno čine α -heliksi (αD – αI) i četiri kratka β -lanca ($\beta 6$ – $\beta 9$). Ovaj poddomen je odgovoran za prepoznavanje proteinskog supstrata i direktno učestvuje u katalitičkom procesu [17,18,22,23]. C-režanj sadrži više visoko konzerviranih katalitičkih sekvenci, uključujući **HRD motiv** (*His-Arg-Asp*) u **katalitičkoj petlji**, pri čemu konzervirana asparaginska kiselina deluje kao katalitička baza tokom transfera fosfatne grupe [24].

Aktivacioni segment predstavlja jedan od ključnih regulatornih delova katalitičkog domena proteinskih kinaza i obuhvata region od **DFG motiva** (*Asp-Phe-Gly*) na N-terminalnom kraju do **APE motiva** (*Ala-Pro-Glu*) na C-terminalnom kraju. Unutar ovog segmenta nalazi se **aktivaciona petlja**, duga približno 20–30 aminokiselina, koja ima centralnu regulatornu ulogu, jer njena fosforilacija dovodi do konformacionih promena koje omogućavaju „otvaranje“ aktivnog mesta i vezivanje proteinskog supstrata [25]. Početni DFG motiv ima ključnu ulogu u koordinativnom vezivanju Mg^{2+} jona koji je bitan za vezivanje ATP-a i stabilizaciji aktivne konformacije enzima. DFG motiv može zauzeti više konformacija:

- **DFG-unutar** (engl. *DFG-in*) konformacije – sastoji se od šest konformacionih klastera, od kojih je jedan karakterističan za aktivno stanje kinaze, u kojoj je ostatak aspartata okrenut ka unutrašnjosti katalitičkog mesta i koordinira Mg^{2+} jon, dok je bočni lanac fenilalanina upakovan uz ili ispod **C-heliksa**; preostalih pet klastera konformacija odražavaju različita neaktivna stanja kinaze.
- **DFG-van** (engl. *DFG-out*) konformaciju – karakterističnu za neaktivno stanje, u kojoj se fenilalanin rotira ka ATP-vezivnom džepu, dok se aspartat udaljava iz pozicije neophodne za koordinaciju Mg^{2+} jona.
- **DFG-među** (engl. *DFG-inter*) konformaciju – intermedijerna orijentacija u kojoj fenilalanin zauzima položaj van džepa αC -heliksa, ali ne u potpunosti ka DFG-van konformaciji odnosno okrenut je uspravno ka β -pločama deleći aktivno mesto na dva dela [21,25].

U blizini C-terminalnog kraja aktivacionog segmenta nalazi se **P+1 petlja**, strukturni element koji formira džep u koji se smešta aminokiselinski ostatak supstrata, neposredno nakon fosforilacionog (P) mesta [26,27]. Položaj ovog mesta supstrata stabilizovan je upravo P+1 petljom, koja prihvata bočni lanac susedne (P+1) aminokiseline. Fosforilacija specifičnih serinskih, treoninskih ili

tirozinskih ostataka u okviru aktivacione petlje dovodi do konformacionih promena koje omogućavaju vezivanje supstrata.

P+1 petlja je za α F heliks vezana preko **APE motiva** (Ala-Pro-Glu), koji se nalazi na samom C-terminalnom kraju aktivacionog segmenta. APE motiv je stabilizovan sonim mostom koji glutaminska kiselina gradi sa argininom iz C-režnja [25].

Bitan strukturni element C-režnja predstavlja α F-heliks, visoko konzervirana i stabilna struktura smeštena u središtu katalitičkog domena. Na α F-heliks su usidreni glavni katalitički i regulatorni motivi, uključujući katalitičku petlju, aktivacioni segment i hidrofobne sklopove koji povezuju N- i C-režanj. Aktivna konformacija protein kinaza određena je organizacijom dve hidrofobne strukture: **regulatorne R-strukturne ose** (engl. *R-spine*) i **katalitičke C-strukturne ose** (engl. *C-spine*) [28–30]. **R-strukturna osa** je dinamična struktura sastavljena od hidrofobnih aminokiselinskih ostataka koji potiču od oba režnja kinaze (obuhvatajući elemente α C-heliksa, β 4-lanca, HRD motiva i aktivacione petlje). U aktivnom stanju ovi ostaci se poravnavaju u kontinuirani hidrofobni stub, čime stabilizuju položaj α C-heliksa u aktivnoj („ α C-unutar“) konformaciji i uređenu geometriju aktivacione petlje u kojoj DFG-motiv zauzima aktivnu („DFG-unutar“) orijentaciju. Poravnanje R-strukturne ose predstavlja ključni strukturni događaj koji određuje prelazak kinaze iz aktivnog u neaktivno stanje i obrnuto. Nasuprot tome, **C-strukturna osa** je stabilna hidrofobna osovina koja se kompletira vezivanjem adeninskog dela ATP-a. Time se približavaju N- i C-režanj i stabilizuje katalitičko jezgro kinaze, uključujući i aktivnu geometriju u kojoj su α C-heliks i DFG-motiv pravilno orijentisani za katalizu.

Kada su R- i C-strukturne ose pravilno formirane, N- i C-režanj se orijentišu tako da definišu katalitičku pukotinu. U toj pukotini nalazi se ATP-vezivno mesto koje obuhvata više strukturno i funkcionalno različitih regiona. Ova pukotina je sa gornje strane definisana β -pločama oba režnja, dok bočne zidove formiraju C-heliks i početni deo aktivacione petlje, čime se ATP-vezivno mesto prostorno integriše sa elementima neophodnim za aktivaciju kinaze [46]. Regioni koji čine ATP-vezivno mesto su:

1. Zglobni region (engl. *hinge region*)

Drugi naziv je i adeninski region, s obzirom da adeninski prsten ostvaruje ključne vodonične veze sa glavnim lancem enzima. N-1 prstena kao donor i vodonik iz N-6 amino grupe adenina kao akceptor interaguju sa N-H i karbonilnim grupama okosnice zglobnog regiona. Ove vodonične veze predstavljaju strukturnu osnovu za vezivanje većine ATP-kompetitivnih inhibitora kinaza, jer veliki broj njih imitira adeninski prsten ATP-a i zadržava jednu ili obe interakcije [47,48].

2. Region za smeštaj riboze (engl. *sugar pocket*)

Ovaj region se nalazi u prostoru gde se vezuje ribozni deo ATP-a. U većini kinaza pokazuje hidrofilni karakter, obezbeđujući stabilizaciju hidroksilnih grupa šećera putem mreže vodoničnih veza, mada kod nekih kinaza, može sadržati hidrofobniji aminokiselinski ostatak [49].

3. Hidrofobni džep (džep selektivnosti)

Ovaj džep se nalazi neposredno pored zglobnog regiona i prirodno ostaje slobodan prilikom vezivanja ATP-a. Upravo zato predstavlja ključnu oblast za dizajn selektivnih inhibitora kinaza, koji svojim bočnim supstituentima mogu da prodru u ovaj prostor [48,50].

4. Hidrofobni kanal

Ovaj kanal predstavlja produžetak ATP-vezivnog mesta koji je otvoren ka rastvoru i ne učestvuje u vezivanju ATP-a. Međutim, mnogi inhibitori koriste ovaj region kako bi povećali afinitet vezivanja produženjem molekula u ovaj deo prostora [34].

5. Region za vezivanje fosfatnih grupa

U ovom delu se vezuje trifosfatni deo ATP-a. Trifosfatna grupa se stabilizuje unutar džepa dejstvom karakteristične P-petlje i nizom baznih aminokiselinskih ostataka, dok konzervirani aspartat iz DFG-motiva ima ključnu ulogu u deprotonaciji hidroksilne grupe supstrata tokom katalitičkog procesa [32,35,36].

Aktivna konformacija protein kinaza je određena pravilnim poravnanjem R- i C-strukturnih osa, stabilizacijom α C-heliksa u α C-unutar položaju i DFG-motiva u DFG-unutar orijentaciji. U ovom stanju dolazi do formiranja jonskog mosta između glutaminske kiseline iz α C-heliksa i konzerviranog lizina iz β 3-lanca, čime se omogućava pravilno pozicioniranje α - i β -fosfata ATP-a [32,53]. Aktivaciona petlja je otvorena i formira supstratni žljeb, dok asparaginska kiselina iz DFG-motiva koordinira Mg^{2+} jon i stabilizuje γ -fosfat ATP-a tokom katalize [27,54]. Glicinom bogata P-petlja dodatno stabilizuje trifosfatni deo ATP-a. Nasuprot tome, neaktivna stanja kinaza obuhvataju više različitih konformacija, najčešće karakterisanih zatvaranjem aktivacione petlje i prekidanjem *Glu-Lys* jonskog para usled pomeranja α C-heliksa u α C-van položaj [38]. U tipičnoj neaktivnoj DFG-van konformaciji, fenilalanin iz DFG-motiva rotira ka hidrofobnom džepu i zauzima prostor ATP-vezivnog mesta, dok se asparaginska kiselina udaljava iz pozicije potrebne za koordinaciju Mg^{2+} jona, čime se sprečava vezivanje ATP-a [41]. Ove strukturne reorganizacije predstavljaju osnovu funkcionalne regulacije kinaza i određuju selektivnost inhibitora koji stabilizuju određene konformacije katalitičkog domena [55,56].

R-strukturna osa proteinskih kinaza izgrađena je od niza visoko konzerviranih hidrofobnih aminokiselinskih ostataka, označenih kao RS (engl. *regulatory spine*) rezidue, koje su raspoređene u oba režnja katalitičkog domena. Njihovo pravilno prostorno poravnanje predstavlja strukturni znak aktivne konformacije kinaze i obezbeđuje formiranje lokalnog hidrofobnog jezgra koje funkcionalno povezuje N- i C-režanj enzima [57]. Pored uloge u stabilizaciji aktivnog stanja, pojedine RS rezidue – naročito RS2 iz C-režnja i RS3 iz N-režnja – imaju dodatni strukturni značaj jer njihovi bočni lanci učestvuju u definisanju specifičnih hidrofobnih šupljina unutar katalitičkog domena [57,58]. U aktivnoj konformaciji kinaze, RS2 i RS3 su integralni deo hidrofobnog jezgra R-regulatorne ose i u potpunosti popunjavaju ove šupljine, čime one ostaju strukturno zatvorene i nedostupne za vezivanje liganada. U određenim neaktivnim konformacijama, međutim, dolazi do pomeranja RS2 ili RS3 rezidua iz hidrofobnog jezgra R-regulatorne ose, što rezultuje oslobađanjem ovih prostora i formiranjem tzv. RS2 i RS3 džepova. Ovi džepovi predstavljaju konformaciono indukovane hidrofobne šupljine koje funkcionalno proširuju ATP-vezivno mesto i stvaraju dodatne mogućnosti za selektivno vezivanje inhibitora. RS3 džep se formira kao posledica pomeranja α C-heliksa u α C-van položaj, pri čemu RS3 napušta svoju poziciju u R-strukturnoj osi, dok se RS2 džep otvara u DFG-van i DFG-među konformacijama usled rotacije fenilalanina iz DFG motiva i njegovog udaljavanja iz hidrofobnog jezgra [57].

Posebnu ulogu u stabilizaciji ovog lokalnog hidrofobnog sistema ima aminokiselinski ostatak koji kontroliše pristup hidrofobnom džepu, tzv. *gatekeeper* rezidua, smeštena na kraju β 5-lanca, u neposrednoj blizini RS3 džepa. Gatekeeper rezidua predstavlja deo hidrofobnog omotača odnosno tzv. *shell* strukture koja okružuje N-režanj u okviru R-stuba i doprinosi stabilnosti RS3 rezidue i položaja α C-heliksa [58,59]. Njena veličina i hidrofobnost utiču na ravnotežu između aktivnih i

neaktivnih konformacija kinaze, kao i na pristupačnost RS2 i RS3 džepova, čime *gatekeeper* rezidua ima ključnu ulogu u modulaciji selektivnosti vezivanja inhibitora [60].

Detaljno poznavanje arhitekture ATP-vezivnog mesta, kao i prostorne i konformacione dinamike okolnih hidrofobnih džepova, predstavlja osnov za racionalni dizajn selektivnih kinaznih inhibitora koji ciljaju specifična konformaciona stanja katalitičkog domena i omogućavaju finu modulaciju kinazne aktivnosti.

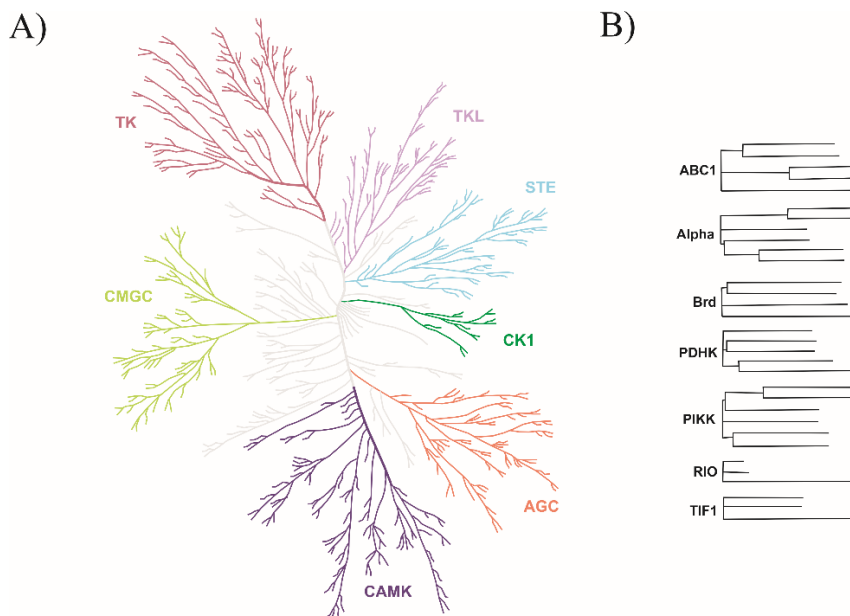
1.2.2. Podela protein kinaza

Humane protein kinaze se, prema supstratnoj specifičnosti, mogu podeliti u dve glavne grupe: **serin/treonin-kinaze**, koje fosforilišu serinske i treoninske ostatke, i **tirozin-kinaze**, koje katalizuju fosforilaciju tirozinskih ostataka [37]. Osnovne razlike između tirozin- i serin/treonin-kinaza odnose se na arhitekturu mesta vezivanja supstrata. Pošto je bočni lanac tirozina za približno 4 Å veći od bočnih lanaca serina i treonina, tirozin-kinaze poseduju proširen i produžen deo peptidnog vezujućeg mesta, dok serin/treonin-kinaze imaju kompaktniji i geometrijski ograničen džep prilagođen manjim bočnim lancima serina i treonina [38].

S obzirom na to da su hidroksilne grupe serinskog i treoninskog ostatka vezane za β -ugljenikov atom, njihova fosforilacija se odvija sličnim katalitičkim mehanizmom. Kod **serin/treonin-kinaza**, fosforilabilni serinski ili treoninski ostatak supstrata ostvaruje interakcije sa polipeptidnom okosnicom (engl. *backbone*) enzima u blizini C-terminalnog dela aktivacionog segmenta. Bazni ostaci na N-terminalnom delu supstrata ostvaruju dodatne elektrostatičke interakcije sa kiselim ostacima u C-režnju kinaze. Supstrat se stabilizuje i precizno orijentiše koordinisanim delovanjem serina iz P-petlje, lizina iz katalitičke petlje i treonina iz P+1 petlje, što omogućava pravilno pozicioniranje hidroksilne grupe serina ili treonina u odnosu na γ -fosfatnu grupu ATP-a i efikasan prenos fosfatne grupe [25,53,61].

Kod **tirozin-kinaza**, tirozinski ostatak u P+1 petlji ne stabilizuje se pretežno interakcijama sa polipeptidnom okosnicom, već dominantno putem bočnih lanaca aminokiselina enzima. Neposredno nakon DFG motiva nalazi se region koji sadrži tri fosforilaciona mesta za tirozin. Supstrat se orijentiše tako da jedan tirozinski ostatak zauzima P-mesto, dok se naredni nalazi u P+1 poziciji. Bočni lanac prolina u P+1 petlji formira rigidnu hidrofobnu površinu na koju naleže aromatični prsten tirozina, čime se obezbeđuje pravilno pozicioniranje supstrata. Aromatični prsten tirozina dodatno se stabilizuje interakcijama sa konzerviranim baznim i aromatičnim ostacima u katalitičkoj petlji [25,53,61,63].

Protein kinaze se takođe, na osnovu primarne sekvence i očuvanih strukturnih karakteristika kinaznog domena, mogu podeliti na **eukariotske (ePK)** i **atiptične (aPK)** protein kinaze (Slika 1.2) [64–66].



Slika 1.2. Šematski prikaz kinoma (celokupnog skupa protein kinaza koje su kodirane genomom):
A) ePK i B) aPK. Prilagođeno na osnovu prikaza Cell Signaling Technology, Inc.
(www.cellsignal.com).

ePK karakterišu visoko konzervirani strukturni motivi, uključujući $GxGxxG$ motiv u P-petlji, katalitički HRD motiv i DFG motiv na početku aktivacione petlje, kao i pravilno organizovani hidrofobni elementi R- i C-strukturnih osa koji stabilizuju aktivnu konformaciju [32,44]. Na osnovu filogenetskih odnosa, ePK se klasifikuju u devet glavnih grupa, koje se dalje dele na veći broj familija [66,67]:

1. TK – tirozin kinaze (engl. *Tyrosine Kinases*)

Tirozin-kinaze predstavljaju najveću i klinički najznačajniju grupu protein-kinaza, a obuhvataju receptorske tirozin-kinaze (RTK) i nereceptorske tirozin-kinaze. Ovi enzimi imaju ključnu ulogu u regulaciji ćelijske proliferacije, diferencijacije i angiogeneze.

Među najvažnijim receptorskim tirozin-kinazama izdvajaju se receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR), receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2, ErbB2), receptori fibroblastnog faktora rasta (engl. *Fibroblast Growth Factor Receptor*, FGFR1–4), receptori faktora rasta derivata trombocita (engl. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*, PDGFR), receptori vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*, VEGFR1–3), insulinski receptor (IR), kao i receptor za insulinu sličan faktor rasta 1 (IGF1R) [65,68].

U grupu nereceptorskih tirozin-kinaza spadaju Abelsonova protoonkogeni tirozin-protein kinaza (ABL1), naročito u svom fuzionom obliku BCR–ABL (engl. *breakpoint cluster region*, BCR), zatim tirozin-protein kinaza protoonkogeni sarkoma (engl. *Sarcoma proto-oncogene tyrosine-protein kinase*, Src), kao i ostali članovi Src-kinaza. Takođe, značajni predstavnici ove grupe su anaplastična limfomska kinaza (ALK) i Janus kinaze (JAK1–3), uključujući i tirozin-kinazu 2 (TYK2) [65].

2. TKL – kinaze slične tirozin kinazama (engl. *Tyrosine-Kinase-Like kinases*)

TKL kinaze strukturno podsećaju na tirozin-kinaze, ali dominantno fosforilišu serinske i treoninske ostatke. Najvažniji predstavnici ove grupe su kinaze „ubrzanog fibrosarkoma“ (engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma kinases*, RAF), uključujući A-RAF, B-RAF i C-RAF, koje imaju centralnu ulogu u signalnoj kaskadi mitogenom aktivirane protein-kinaze (MAPK). U ovu grupu spadaju i kinaze mešovite linije (engl. *Mixed Lineage Kinases*, MLK), uključujući MAP3K9–13, kao i receptor-interagujuće protein-kinaze (RIPK) [65,69].

3. STE – MAPK modulišuće kinaze (engl. *homologs of yeast Sterile 7, Sterile 11 and Sterile 20 kinases*)

STE kinaze obuhvataju STE11-, STE7- i STE20-homologne kinaze, koje formiraju hijerarhijski organizovane MAPK kaskade. Ove kaskade uključuju MAP kinaza kinaza kinaze (MAP3K), MAP kinaza kinaze (MAP2K), kao što su MAPK/ERK kinaze 1 i 2 (MEK1/2), kao i MAP kinaza kinaza kinaza kinaze (MAP4K). Pored njih, u ovu grupu spadaju p21-aktivirane kinaze (PAK) i STE20-slične kinaze sisara (MST), koje učestvuju u regulaciji rasta, polariteta i odgovora na ćelijski stres [70,71].

4. CK1 – kazein kinaze 1 (engl. *Casein Kinase 1 family*)

CK1 kinaze predstavljaju evolutivno konzerviranu porodicu konstitutivno aktivnih serin/treonin kinaza. Najznačajniji članovi su kazein-kinaza 1 delta (CK1δ) i kazein-kinaza 1 epsilon (CK1ε), koje učestvuju u regulaciji Wnt signalizacije (signalni put nazvan prema genima wingless kod *Drosophila melanogaster* i int-1 kod sisara, značajan za regulaciju proliferacije, diferencijacije i sudbine ćelija) cirkadijalnog ritma i organizacije citoskeleta [72,73].

5. AGC – PKA/PKG/PKC familija

AGC familija protein-kinaza, nazvana prema protein-kinazi A (PKA), protein-kinazi G (PKG) i protein-kinazi C (PKC), obuhvata kinaze regulisane cikličnim nukleotidima i lipidnim glasnicima. U ovu grupu spadaju i protein-kinaza B (AKT/PKB), ribozomalna S6 kinaza (RSK) i kinaza ribozomalnog proteina S6 (S6K). Takođe, značajni članovi AGC familije su Rho-asocirane protein-kinaze (ROCK1 i ROCK2), koje imaju važnu ulogu u regulaciji citoskeletne dinamike [74].

6. CAMK – Ca²⁺/kalmodulin-zavisne kinaze

CAMK kinaze, čiji je naziv izveden iz engleskih pojmova *calmodulin* (CaM) i *kinase* (K), obuhvataju CaMK tipa I (CaMKI), CaMK tipa II (CaMKII) i CaMK tipa IV (CaMKIV), koje učestvuju u regulaciji neurotransmisije, kontrakcije mišića i ćelijskog metabolizma. U ovu funkcionalnu grupu često se svrstava i AMP-aktivirana protein-kinaza (AMPK), kao i kontrolne kinaze ćelijskog ciklusa 1 i 2 (CHK1/CHK2) [75].

7. CMGC – CDK/MAPK/GSK3/CLK familije

CMGC grupa kinaza uključuje ciklin-zavisne kinaze (CDK1–9), mitogenom aktivirane protein-kinaze (MAPK), među kojima su ekstracelularnim signalima regulisane kinaze (ERK), c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) i p38 MAP kinaze, kao i glikogen-sintaza kinaza 3 (GSK-3) i CDC-slične kinaze (CLK). Ovi enzimi imaju ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, transkripcije i odgovora na stres [65,76].

8. RGC – receptorske gvanilat-ciklaze

RGC kinaze čine receptor natriuretičkog peptida 1 (NPR1, gvanilat-ciklaza A) i receptor natriuretičkog peptida 2 (NPR2, gvanilat-ciklaza B). Iako poseduju domen homologan katalitičkom domenu eukariotskih protein-kinaza, ovi receptori funkcionišu kao gvanilat-ciklaze [77].

9. Ostale ePK kinaze

Ostale eukariotske protein-kinaze obuhvataju raznoliku grupu enzima koji poseduju karakterističan nabor (engl. *protein fold*) eukariotskih protein-kinaza, ali se ne mogu svrstati u prethodno definisane glavne grupe. U ovu kategoriju spadaju Aurora kinaze (Aurora kinases), polo-slične kinaze (PLK1–4, Polo-like kinases), kao i WEE1 kinaza (WEE1, engl. *G2 checkpoint kinase*) i NIMA-srodne kinaze (NEK kinaze, engl. *Never In Mitosis A (NIMA)-related kinases*). Ove kinaze imaju značajnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, mitoze i organizacije citoskeleta [78].

Nasuprot ePK, aPK pokazuju veoma nisku sekvencijsku sličnost, ali uprkos tome uglavnom zadržavaju strukturu sačinjenu od dva reznja. Konzervirani glicini često nedostaju u P-petlji, a umesto HRD, motiva, zamenom položaja histidina i arginina imaju formiran DRH motiv [79]. Ove razlike odražavaju evolutivno razdvajanje ePK i aPK i povezane su sa razlikama u njihovoj regulaciji, kao i u načinu vezivanja ATP-a i inhibitora. U grupu aPK spadaju [80]:

1. Alfa kinaze

Alfa kinaze primarno fosforilišu serinske/treoninske ostatke na α -heliksu. Uključene su u translaciju proteina, homeostazu Mg^{2+} jona, intracelularni transport, kao i migraciju, adheziju i proliferaciju ćelija. Humani genom kodira više alfa kinaza među kojima su eEF2K (eukariotska kinaza elongacionog faktora 2 kod *Caenorhabditis elegans*), alfa-kinaza 1 (limfocitna alfa-kinaza, LAK ili ALPK1), alfa-kinaza 2 (srčana alfa-kinaza, HAK ili ALPK2) i alfa-kinaza 3 (mišićna alfa-kinaza, MAK ili ALPK3), prvobitno nazvane prema tkivu u kome su identifikovane [81].

2. PIKK kinaze (protein-kinaze srodne fosfatidilinozitol-3-kinazama)

PIKK kinaze učestvuju u regulaciji odgovora na oštećenje DNK, signalnih puteva zavisnih od dostupnosti nutrijenata, kao i u procesu kontrole kvaliteta mRNK, uključujući razgradnju transkriptata sa prevremenim stop-kodonima (engl. *nonsense-mediated mRNA decay*, NMD). U ovu porodicu kinaza spadaju ATM (ataksija-telangiektazija mutirana kinaza), ATR (ATM-i Rad3-srodna kinaza), DNA-PKcs (katalitička podjedinica DNK-zavisne protein-kinaze), mTOR (mehanistička meta rapamicina, engl. *mechanistic target of rapamycin*, ranije *mammalian target of rapamycin*) i SMG1 (engl. *suppressor with morphogenetic effect on genitalia 1*) [82]. Poseban značaj u ćelijskoj signalizaciji ima mTOR, serin/treonin protein-kinaza koja deluje u okviru dva strukturno i funkcionalno različita kompleksa: mTORC1 (engl. *mechanistic target of rapamycin complex 1*) i mTORC2 (engl. *mechanistic target of rapamycin complex 2*). Kompleks mTORC1 integriše signale povezane sa dostupnošću nutrijenata, energetske statusom, faktorima rasta i stresom, i reguliše sintezu proteina, rast ćelije, metabolizam i autofagiju. Nasuprot tome, mTORC2 učestvuje u regulaciji preživljavanja ćelija, organizacije aktinskog citoskeleta, metabolizma i proliferacije, između ostalog preko fosforilacije članova AGC porodice kinaza, uključujući AKT [83,84].

3. PDK (PHDK) kinaze (piruvat-dehidrogenaza kinaze)

Kinaza piruvat-dehidrogenaze (PDK) reguliše aktivnost mitohondrijskog kompleksa piruvat-dehidrogenaze, čime povezuje glikolizu sa ciklusom trikarboksilnih kiselina i produkcijom ATP-a. PDK pripadaju serin/treonin kinazama i postoje četiri izoforme (PDK1-4) [85].

4. RIO kinaze (*engl. right open reading frame kinases*)

RIO kinaze su atipične protein-kinaze čija je primarna uloga biogeneza ribozoma, uz dodatne regulatorne funkcije u ćeliji. Naziv RIO potiče iz rane genske anotacije u kvascu (*Saccharomyces cerevisiae*) i označava tzv „*right open reading frame*“, odnosno otvoreni okvir čitanja (dela gena koji kodira protein) definisan na osnovu relativnog položaja u genomu. Ovoj grupi pripadaju tri izoforme ovog enzima (RIO1-3) [86].

5. BRD kinaze – bromodomen-sadržavajuće kinaze (*engl. bromodomain-containing kinases*)

Kinaze koje sadrže bromodomen (BRD) učestvuju u formiranju transkripcionih regulatornih kompleksa tako što prepoznaju acetil-lizinske oznake na histonima. Ovi kompleksi zatim regulišu ekspresiju određenih proteina i dovode do specifičnih promena u ćelijskom fenotipu. U humanom organizmu postoje BRD2-4 kao i BRDT [87].

6. ABC1 kinaze (kinaze koje sadrže ABC1 (*engl. the absence of bc1 complex*) domen);

ABC1 familija, poznata i kao ADCK (*engl. AarF domain-containing kinases*) familija, obuhvata grupu atipičnih protein-kinaza koje su primarno uključene u mitohondrijalnu funkciju i biosintezu koenzima Q (ubihinona). U humanom organizmu identifikovano je pet članova ABC1 familije: ADCK1, ADCK2, ADCK3 (COQ8A), ADCK4 (COQ8B) i ADCK5 [88,89].

7. TIF1 kinaze – kinaze transkripcionog posredničkog faktora 1 (*engl. transcriptional intermediary factor 1 kinases*)

TIF1 familija obuhvata hromatin-vezane regulatore transkripcije iz TRIM porodice, koji putem PHD-bromodomena prepoznaju histonske modifikacije i učestvuju u odgovoru na oštećenje DNK, remodelovanju hromatina i regulaciji ćelijskog ciklusa. Kod čoveka ovu familiju čine TRIM24 (TIF1 α), TRIM28 (TIF1 β /KAP1), TRIM33 (TIF1 γ) i TRIM66 (TIF1 δ), a njihov poremećaj regulacije je povezan sa razvojem različitih karcinoma [90].

8. Ostale aPK kinaze

U grupu aPK dodatno spadaju FASTK kinaze (Fas-aktivisana serin/treonin kinaza), BCR kinaze (protein vezan sa Abl u hroničnoj mijelogenoj leukemiji), TAF kinaze (faktor povezan sa TATA-vezivnim proteinom) i A6 kinaze (dva humana gena, A6 i A6r) [80].

Strukturna raznolikost i konzerviranost katalitičkog domena protein kinaza omogućavaju preciznu regulaciju fosforilacionih signalnih puteva. Međutim, poremećaji u regulaciji njihove aktivnosti dovode do patološke aktivacije različitih kaskada i razvoja brojnih oboljenja. Razumevanje strukturnih i funkcionalnih osobina protein kinaza zato predstavlja osnovu za racionalni dizajn i selektivno dejstvo njihovih inhibitora.

1.2.3. Inhibitori protein kinaza

Kinaze su intenzivno istraživana ciljna mesta u okviru antineoplastika, kao i drugih farmakoterapijskih grupa. Patološki izmenjena aktivnost protein kinaza, nastala usled mutacija,

pojačane ekspresije ili genetskih promena, predstavlja jedan od osnovnih mehanizama uključenih u nastanak i progresiju tumora. Zbog svoje centralne uloge u regulaciji ćelijskog ciklusa, proliferacije, angiogeneze, migracije i apoptoze, protein kinaze su postale važne terapijske mete u savremenoj onkologiji [18].

Iz tog razloga razvijen je veliki broj **malih molekulskih inhibitora kinaza** (engl. *small-molecule kinase inhibitors*, **SMKI**) koji deluju vezivanjem u ATP-vezujućem džepu, alosternim modifikovanjem konformacije katalitičkog domena ili kovalentnim vezivanjem za specifične aminokiseline u aktivnom mestu enzima [91]. SMKI omogućavaju selektivnu inhibiciju patološki aktiviranih signalnih puteva, kao što su MAPK i PI3K/AKT/mTOR signalni putevi, kao i druge receptor-tirozin-kinazne signalizacije posredovane EGFR i VEGFR, i citokinska JAK/STAT signalizacija, čime se postiže supresija tumorskog rasta i angiogeneze uz relativno selektivan efekat na maligne ćelije [92–94]. Pored malih molekula, veće strukture kao što su **monoklonska antitela** (engl. *monoclonal antibodies*, **mAbs**), **nanotela** (engl. *nanobodies*) i **peptidi** se takođe razvijaju u ove svrhe [13].

U novembru 2025. godine je Uprava za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) Sjedinjenih Američkih Država odobrila stoti po redu SMKI za kliničku upotrebu [95], dok se više od 400 oralnih kinaznih inhibitora nalazi u različitim fazama kliničkih ispitivanja, što ovu grupu lekova čini jednom od najbrže rastućih kategorija ciljane terapije u onkologiji [18].

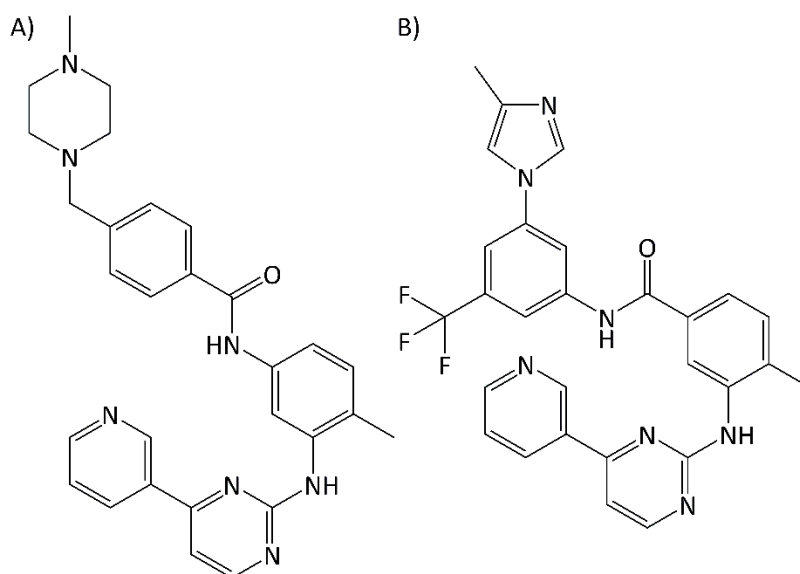
SMKI se prema načinu vezivanja za kinazni domen klasifikuju u šest osnovnih tipova [57,96]. Prve tri klase obuhvataju ATP-kompetitivne inhibitore. Inhibitori tipa I, vezuju se za aktivnu DFG-unutar, α C-unutar konformaciju enzima, dok tip I $\frac{1}{2}$ se vezuje za inaktivnu DFG-unutar, α C-van konformaciju. Kako je aktivno ATP mesto visoko konzervirano među različitim protein kinazama, ovi ATP-kompetitivni inhibitori pokazuju nizak stepen selektivnosti, što može dovesti do van-ciljnih (engl. *off-target*) neželjenih efekata. Tip II inhibitora se vezuje za DFG-van (α C-unutar ili α C-van) konformaciju kinaze u nefosforilisanom ATP katalitičkom mestu [97,98]. Tip I $\frac{1}{2}$ inhibitori produbljuju svoje vezivanje zauzimanjem otvorenog RS3 džepa, dok tip II inhibitori koriste otvoreni RS2 džep, stabilizujući DFG-van stanje i time postižu selektivnost za određene kinaze [57].

Inhibitori tipa I, I $\frac{1}{2}$ i II mogu se dodatno podeliti na podtipove A i B. Inhibitori podtipa A vezuju se u prednjem žljebu, zadnjem žljebu, kao i u blizini *gatekeeper* rezidue, dok inhibitori podtipa B ne prodiru u zadnji žljeb [96].

Inhibitori tipa III i IV su alosterni inhibitori koji se vezuju izvan ATP-vezujućeg mesta. Inhibitori tipa III se vezuju za alosterno mesto u blizini ATP-vezujućeg, dok se inhibitori tipa IV vezuju za džep udaljen od ATP-vezujućeg mesta. Inhibitori koji istovremeno premošćuju dva regiona protein kinaze (bivalentni inhibitori) se označavaju kao tip V, dok inhibitori koji formiraju ireverzibilnu kovalentnu vezu sa reaktivnom aminokiselinom iz katalitičkog mesta, najčešće cisteinskim ostatkom, predstavljaju tip VI inhibitora [96,99,100].

Imatinib (N-(4-metil-3-{[4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il]amino}fenil)-4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]benzami) (Slika 1.3A) je 2001. godine odobren kao prvi inhibitor BCR-ABL tirozin kinaze koji predstavlja derivat 2-fenilaminopirimidina i pripada tipu II inhibitora. Imatinib obuhvata indikacije kao što su *Philadelphia* hromozom-pozitivna hronična mijeloidna leukemija, relapsna ili refraktorna *Philadelphia* hromozom-pozitivna akutna limfoblastna leukemija kod odraslih, gastrointestinalni stromalni tumori i mijelodisplastične/mijeloproliferativne bolesti [101]. **Nilotinib** (Slika 1.3B) je potentniji BCR-ABL inhibitor tipa II od imatiniba, takođe sa 2-fenilaminopirimidinskom farmakoforom. Međutim, njegova primena povezana je sa važnim bezbednosnim ograničenjima, uključujući rizik od produženja QT intervala, klinički značajne

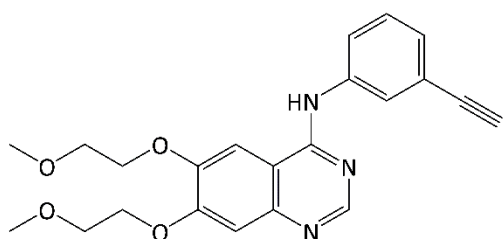
interakcije sa hranom i interakcije sa jakim inhibitorima CYP3A4, budući da se nilotinib primarno metaboliše preko ovog izoenzima, pa njegova inhibicija može povećati izloženost nilotinibu [102].



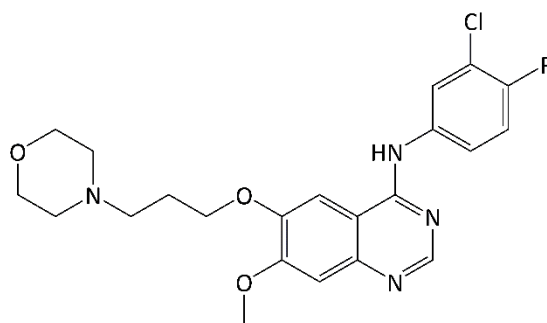
Slika 1.3. Strukturne formule A) imatiniba i B) nilotiniba.

Erlotinib (N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoksietoksi)hinazolin-4-amin), **gefitinib** (N-(3-hloro-4-fluorofenil)-7-metoksi-6-[3-(morfolin-4-il)propoksi]hinazolin-4-amin), **lapatinib** (N-{3-hloro-4-[(3-fluorofenil)metoksi]fenil}-6-(5-[(2-metansulfoniletil)amino]metil}furan-2-il)hinazolin-4-amin) i **afatinib** ((2E)-N-{4-[(3-hloro-4-fluorofenil)amino]-7-[(3S)-oksolan-3-iloksi]hinazolin-6-il}-4-(dimetilamino)but-2-enamid) (Slika 1.4) su inhibitori koji ciljaju EGFR/HER kinazu, pri čemu su prva tri reverzibilni inhibitori prve generacije - erlotinib istovremeno pripada tipu I i tipu I $\frac{1}{2}$ B inhibitora, gefitinib pripada tipu I inhibitora, lapatinib pripada tipu I $\frac{1}{2}$ A, dok je afatinib ireverzibilni inhibitor druge generacije - pripada tipu VI inhibitora [103]. Svi su derivati 4-anilinochinazolina. Erlotinib se koristi za lečenje nesitnoćelijskog karcinoma pluća (engl. *Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) povezanog sa EGFR mutacijama [104], dok je afatinib pored te indikacije odobren i za metastatski skvamosni NSCLC nakon progresije posle hemioterapije zasnovane na platini. Afatinib je elektrofilni agens koji kovalentno i ireverzibilno vezuje EGFR, produžava ukupno preživljavanje i može da odloži pojavu rezistentnih mutacija kod malignih tumora [105]. Gefitinib se koristi za NSCLC koji ne reaguje na druge terapije [106]. Lapatinib je dvostruki EGFR/HER2 inhibitor, koji se u kombinaciji sa kapecitabinom (prolek 5-fluorouracila, inhibitor timidilat-sintaze) koristi za HER2+ karcinom dojke [107]. I lapatinib i erlotinib mogu generisati CYP-posredovane hepatotoksične metabolite – elektrofilna hinoniminska i fenolna jedinjenja [106,108].

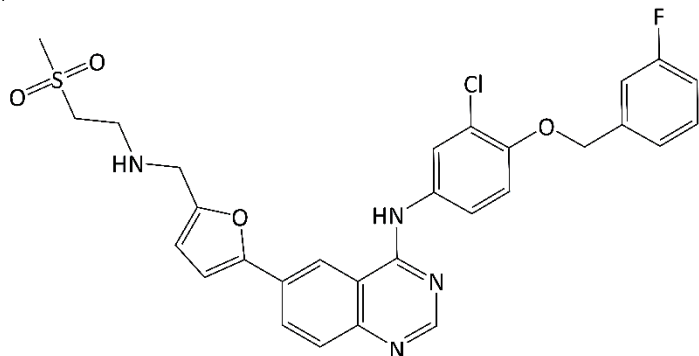
A)



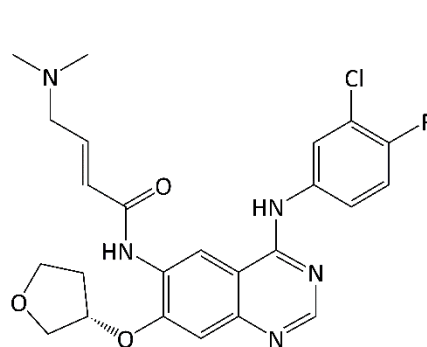
B)



C)



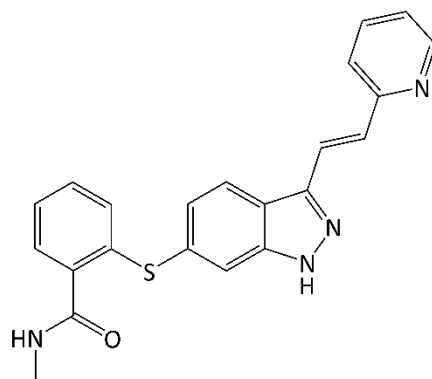
D)



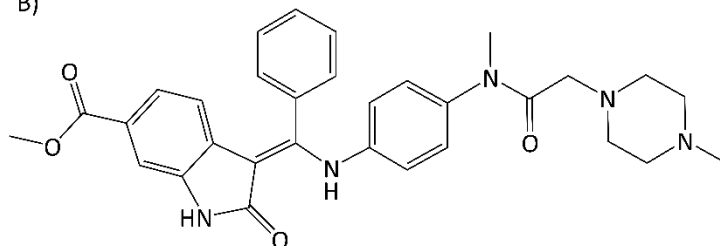
Slika 1.4. Strukturne formule A) erlotiniba, B) gefitiniba, C) lapatiniba i D) afatiniba.

Aksitinib (N-metil-2-({3-[(E)-2-(piridin-2-il)etenil]-1H-indazol-6-il}sulfanil)benzamid) i **nintedanib** (metil (3Z)-3-[(4-[N-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)acetamido]fenil]amino)(fenil)metiliden]-2-okso-2,3-dihidro-1H-indol-6-karboksilat) (Slika 1.5) su tip I inhibitori VEGFR kinaza. Aksitinib je derivat indazola i selektivni VEGFR inhibitor druge generacije za lečenje uznapredovalog karcinoma bubrega [109]. Nintedanib je indolinonski derivat koji pored VEGFR cilja i FGFR i PDGFR, pa se smatra trostrukim angiokinaznim inhibitorom ključnih puteva angiogeneze [110]. Aktivno se koristi protiv NSCLC i idiopatske plućne fibroze [111,112]. Atomi azota i kiseonika indolinonske grupe nintedaniba formiraju vodonične veze u zglobnom regionu ATP-vezujućeg mesta, što doprinosi njegovom vezivanju za srodne receptorske tirozin-kinaze uključene u angiogenezu [110,113].

A)

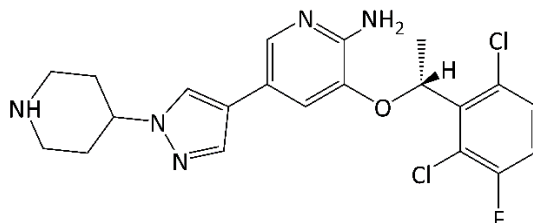


B)



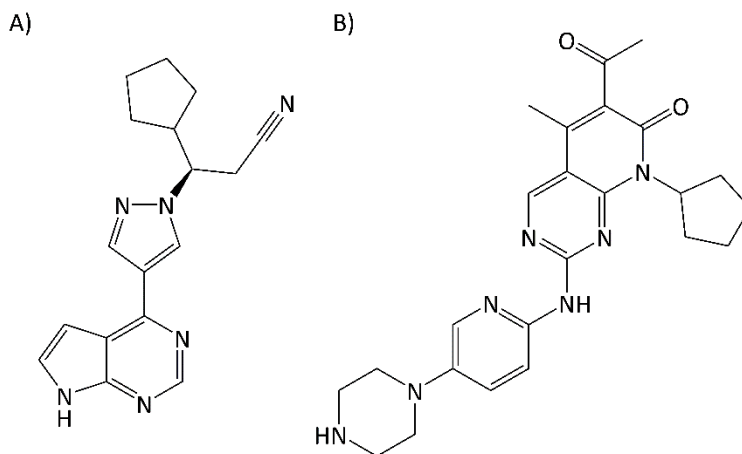
Slika 1.5. Strukturne formjule A) aksitiniba i B) nintedaniba.

Krizotinib (3-[(1R)-1-(2,6-dihloro-3-fluorofenil)etoksi]-5-[1-(piperidin-4-il)-1H-pirazol-4-il]piridin-2-amin) (Slika 1.6) je tip I inhibitor anaplastične limfomske kinaze (ALK). To je derivat aminopiridina koji se koristi u terapiji ALK-pozitivnog NSCLC. Njegova aminopiridinska osnova formira vodonične veze sa aminokiselinama u zglobnom regionu, dok metil grupa ulazi u hidrofobni džep ALK [114]. Budući da krizotinib slabo prolazi kroz krvno-moždanu barijeru, njegova aktivnost u kontroli moždanih metastaza kod ALK-pozitivnog NSCLC je ograničena [115].



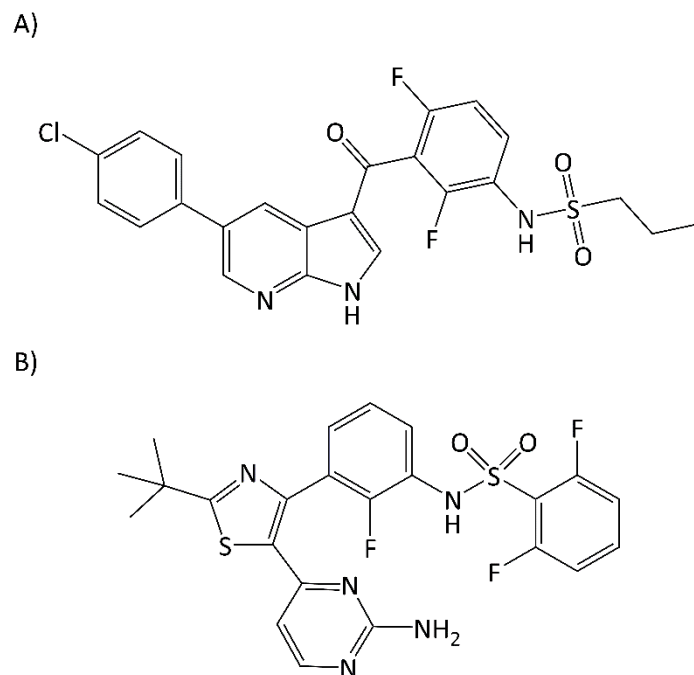
Slika 1.6. Strukturna formula krizotiniba

Ruksolitinib ((3R)-3-ciklopentil-3-(4-{7H-pirololo[2,3-d]pirimidin-4-il}-1H-pirazol-1-il)propanenitril) (Slika 1.7A), tip I inhibitor JAK1/JAK2 kinaza, je derivat pirazola sa pirolopirimidinskom jedinicom. Odobren je za lečenje mijeloproliferativnih neoplazmi, uključujući mijelofibrozu i policitemiju veru. **Palbociklib** (6-acetil-8-ciklopentil-5-metil-2-{[5-(piperazin-1-il)piridin-2-il]amino}-7H,8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on) (Slika 1.7B) je inhibitor CDK4/6 kinaza, derivat piperazin-piridopirimidina. Više farmakofora (piperazinski kraj, N8 ciklopentilni prsten piridopirimidina i C5 metil/C6 acetil grupa) povećavaju njegov afinitet vezivanja za CDK4/6 kinaze. Koristi se u kombinaciji sa endokrinom terapijom za lečenje HR-pozitivnog, HER2-negativnog uznapredovalog ili metastatskog karcinoma dojke [103].



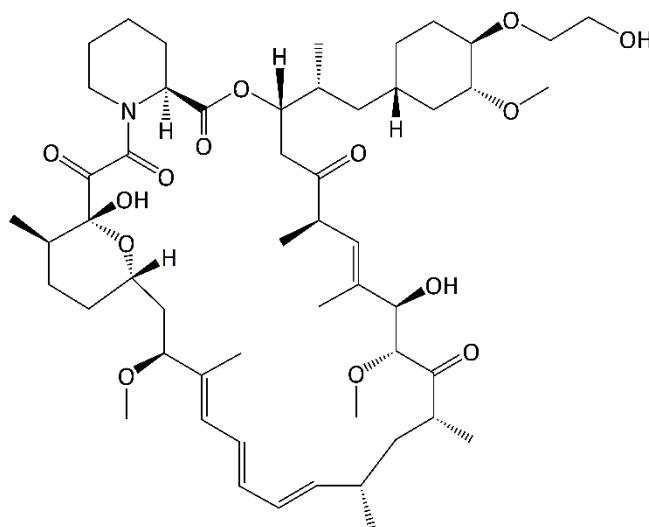
Slika 1.7. Strukturne formule A) ruksolitiniba i B) palbocikliba.

Vemurafenib (N-{3-[5-(4-hlorofenil)-1H-pirololo[2,3-b]piridin-3-karbonil]-2,4-difluorofenil}propan-1-sulfonamid) i **dabrafenib** (N-{3-[5-(2-aminopirimidin-4-il)-2-tert-butil-1,3-tiazol-4-il]-2-fluorofenil}-2,6-difluorobenzen-1-sulfonamid) (Slika 1.8) su tip I $\frac{1}{2}$ inhibitori BRAF serin/treonin kinaze. Oba inhibitora sadrže halogenovane aromatične kao i sulfonamidnu grupu. Koriste se za terapiju uznapredovalog melanoma sa onkogenom mutacijom BRAF V600E [116,117]. Ove mutacije su najčešće kod melanoma, karcinoma štitaste žlezde i pojedinih karcinoma pluća, i predstavljaju biomarker za upotrebu vemurafeniba ili dabrafeniba.



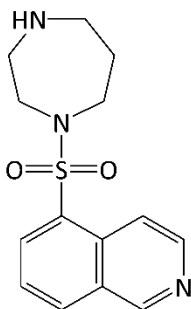
Slika 1.8. Strukturne formule A) vemurafeniba i B) dabrafeniba.

Everolimus ((1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-dihidroksi-12-[(2R)-1-[(1S,3R,4R)-4-(2-hidroksietoksi)-3-metoksicikloheksil]propan-2-il]-19,30-dimetoksi-15,17,21,23,29,35-heksametil-11,36-dioksa-4-azatriciklo[30.3.1.0^{4,9}]heksatriakonta-16,24,26,28-tetraen-2,3,10,14,20-penton) (Slika 1.9) je alosterni inhibitor mTORC1 kompleksa iz grupe rapaloga, odnosno analoga rapamicina (sirolimusa) i pripada tipu III inhibitora. Predstavlja 40-O-(2-hidroksietil) derivat makrocikličnog laktona rapamicina, sa poboljšanim farmakokinetičkim osobinama. Mehanizam delovanja zasniva se na vezivanju za intracelularni protein FKBP12, pri čemu nastali kompleks inhibira mTORC1 signalizaciju. Hiperaktivacija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta povezana je sa razvojem i progresijom različitih tumora, uključujući neuroendokrine tumore, karcinom bubrega i hormonski receptor-pozitivni karcinom dojke. Everolimus takođe poseduje imunosupresivna svojstva i odobren je i za sprečavanje odbacivanja transplantata [118,119].



Slika 1.9. Strukturna formula everolimusa.

Fasudil (5-(1,4-diazepan-1-sulfonyl)izohinolin) (Slika 1.10) je tip I inhibitor ROCK kinaze, iz grupe izohinolinsulfonamida sa 1,4-diazepanskom grupom. U Evropskoj uniji je u januaru 2022. dobio status „*orphan*“ leka (lek namenjen lečenju retkih bolesti, za koje često ne postoji odgovarajuća terapijska alternativa) za lečenje amiotrofične lateralne skleroze, ali još nije odobren. Povećana aktivnost ROCK signalizacije dovodi se u vezu sa neuroinflamacijom i neurodegenerativnim procesima [120,121]. U literaturi su opisane inhalacione/liposomalne formulacije fasudila za plućnu arterijsku hipertenziju, sa ciljem produženog i pretežno pulmonalnog vazodilatatornog efekta [122].



Slika 1.10. Strukturna formula fasudila.

1.3. Lipidne kinaze

Lipidne kinaze predstavljaju heterogenu, ali funkcionalno povezanu grupu enzima koji katalizuju fosforilaciju različitih hidrofobnih lipidnih molekula. Za razliku od protein kinaza, čiji su supstrati rastvorljivi proteini, lipidne kinaze uglavnom deluju na supstrate lokalizovane u biološkim membranama, što zahteva specifične strukturne karakteristike katalitičkog domena, kao i preciznu regulaciju subćelijske lokalizacije i dostupnosti supstrata. Fosforilacijom lipida generišu se bioaktivni lipidni medijatori koji učestvuju u regulaciji brojnih signalnih puteva, uključujući kontrolu proliferacije, diferencijacije, migracije, preživljavanja ćelija i inflamatornih procesa [123,124].

U lipidne kinaze spadaju sledeće glavne enzimске klase:

- Fosfatidilinozitol-kinaze (engl. *phosphatidylinositol kinases*, PIK)

PIK katalizuju fosforilaciju fosfatidilinozitola (PI) i njegovih fosforilisanih derivata, čime se generišu fosfoinozitidi koji imaju centralnu ulogu u intracelularnoj signalizaciji i membranskom transportu [123]. Ovi enzimi čine najdetaljnije proučenu podgrupu lipidnih kinaza i mogu se uopšteno podeliti u tri glavna tipa enzima: fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K), fosfatidilinozitol-4-kinaze (PI4K) i fosfatidilinozitol-fosfat kinaze (PIP kinaze), koje obuhvataju PIP5K i PIP4K porodice. Oni katalizuju fosforilaciju različitih hidroksilnih grupa inozitolnog prstena i time stvaraju strukturno i funkcionalno raznovrsne fosfoinozitide, ključne za regulaciju različitih ćelijskih signalnih puteva;

- Sfingozin-kinaze (engl. *sphingosine kinases*, SPHK)

SPHK fosforilišu sfingozin do sfingozin-1-fosfata (S1P), bioaktivnog lipida koji reguliše proliferaciju, migraciju i preživljavanje ćelija, naročito u kontekstu imunoloških i inflamatornih odgovora [125]. Dve izoforme sfingozin-kinaze, SPHK1 i SPHK2, sintetišu S1P fosforilacijom sfingozina. SPHK1 je pretežno citoplazmatska, dok je SPHK2 lokalizovana u jedru, endoplazmatičnom retikulumu i mitohondrijama, gde signalni put SPHK2/S1P reguliše transkripciju, održavanje telomera i mitohondrijalnu respiraciju. Zbog ovih funkcija, SPHK2 se ispituje u terapiji karcinoma, moždanog udara i neurodegenerativnih poremećaja [126].

- Ceramid-kinaze (engl. *ceramide kinases*, CERK)

CERK katalizuju konverziju ceramida u ceramid-1-fosfat (C1P). CERK i C1P su povezani sa aktivacijom proinflamatornih signalnih puteva i time utiču na razvoj i održavanje različitih hroničnih inflamatornih bolesti [127];

- Acilglicerol-kinaze (engl. *acylglycerol kinases*, AGK)

AGK fosforilišu monoacilglicerole (MAG) i diacilglicerole (DAG), pri čemu nastaju lizofosfatidna kiselina (LPA) i fosfatidna kiselina (PA), lipidi sa značajnom ulogom u signalizaciji, metabolizmu i regulaciji razvoja T-ćelija [124,128]. Kod sisara je identifikovano deset različitih izoformi diacilglicerol-kinaza (engl. *diacylglycerol kinases*, DGK): DGK α , DGK β , DGK γ , DGK δ , DGK ϵ , DGK ζ , DGK η , DGK θ , DGK ι i DGK κ , koje su na osnovu sličnosti u primarnoj aminokiselinskoj sekvenci grupisane u pet podtipova.

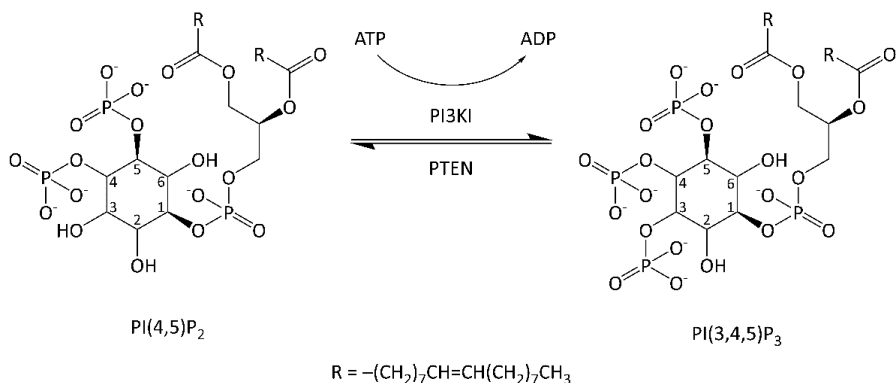
Lipidne kinaze ne deluju samo kao metabolički enzimi, već imaju centralnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji, jer njihovi produkti služe kao sekundarni glasnici ili platforme za regrutaciju signalnih proteina sa specifičnim lipid-vezujućim domenima. Na taj način, lipidna fosforilacija predstavlja ključni regulator prostorne i vremenske organizacije signalnih puteva u ćeliji [123,124].

1.4. Fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K)

PI3K predstavljaju lipidne kinaze koje regulišu mnoge ćelijske procese poput proliferacije, ćelijskog metabolizma, pokretljivosti, apoptoze i drugih. Ovaj enzim katalizuje reakciju fosforilacije inozitolnih fosfolipida na poziciji 3 inozitola kao odgovor na ekstraćelijski stimulus, pri čemu nastaje fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfat (PIP₃) (Slika 1.11) [129–131].

Kod sisara je identifikovano osam PI3K enzima, koji se na osnovu strukture i supstratne specifičnosti dele u tri klase: klasu I, koju čine PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ ; klasu II, koja obuhvata PI3K-C2 α , PI3K-C2 β i PI3K-C2 γ ; i klasu III, koju predstavlja VPS34 [123].

PI3K enzimi klase I se dalje dele na podklase IA i IB na osnovu mehanizama regulacije [129]. Klasa IA PI3K čini grupu heterodimera sačinjenu od katalitičke subjedinice p110 i regulatorne subjedinice p85. Postoje tri katalitičke izoforme (p110 α , p110 β i p110 δ), koje kodiraju geni PIK3CA, PIK3CB i PIK3CD, a one se mogu udružiti sa različitim regulatornim varijantama: p85 α (i njene kraće forme p55 α i p50 α , koje kodira gen PIK3R1), p85 β (PIK3R2) i p55 γ (PIK3R3). Sve ove regulatorne jedinice se zajedno nazivaju p85-tip subjedinica. Klasa IB PI3K je građena drugačije – sastoji se od katalitičke subjedinice p110 γ (kodirane genom PIK3CG) i regulatornih izoformi p101 (gen PIK3R5) ili p87/p84 (poznata i kao p87PIKAP, gen PIK3R6).



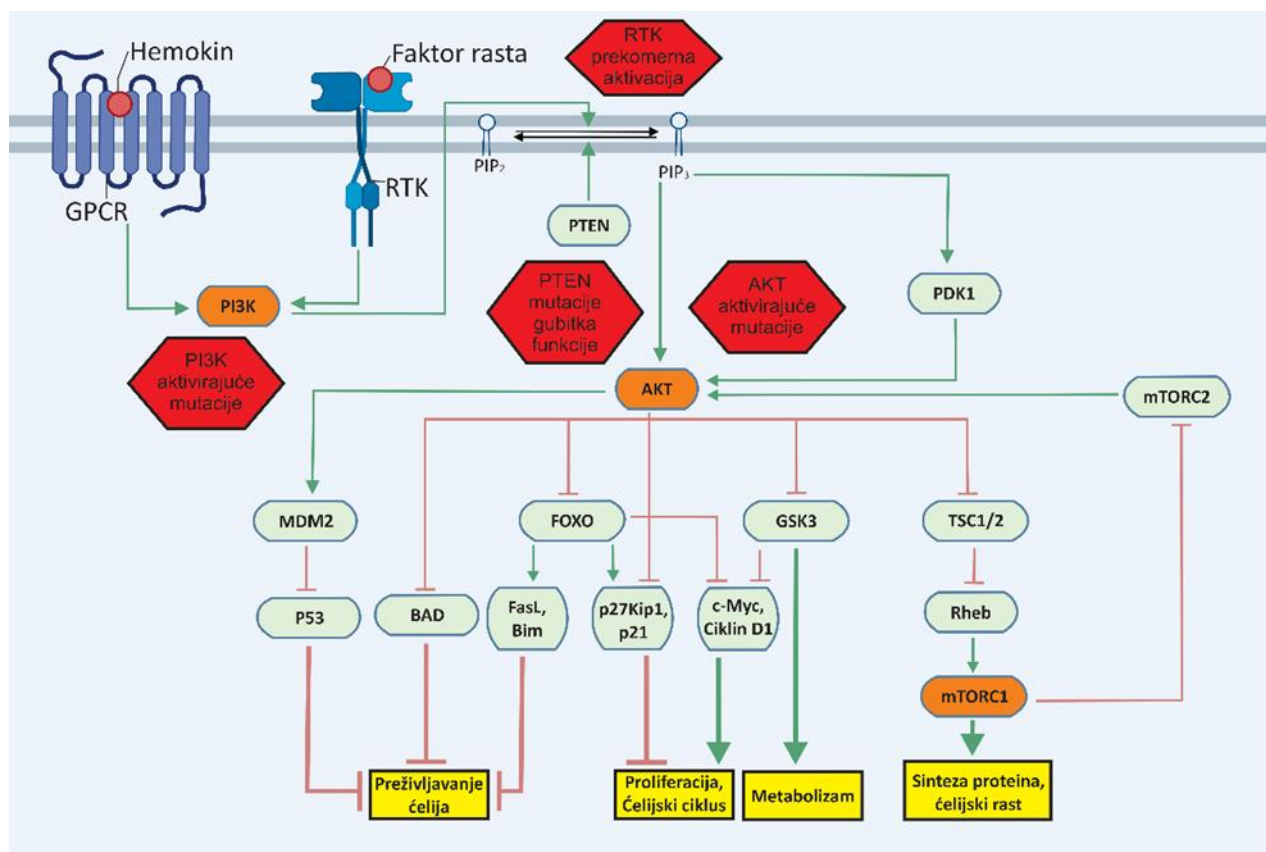
Slika 1.11. Hemijski prikaz reakcije katalizovane klasom I PI3K enzima.

Katalitičke izoforme PI3K klase I (p110 α , p110 β , p110 δ i p110 γ) dele visoko konzerviranu domensku organizaciju i proizvode isti lipidni sekundarni glasnik, ali imaju funkcionalno različite uloge u fiziološkoj i patološkoj signalizaciji [129]. Studije na genetski modificovanim modelima miševa su pokazale da su p110 α i p110 β esencijalni tokom embrionalnog razvoja, ali sa različitim biološkim funkcijama: p110 α ima ključnu ulogu u rastu i preživljavanju ćelija, dok p110 β poseduje i značajnu kinazno-nezavisnu funkciju [132,133]. Nasuprot tome, izoforme p110 δ i p110 γ , čija je ekspresija uglavnom ograničena na leukocite, imaju dominantne uloge u regulaciji imunskog odgovora, uključujući signalizaciju u limfocitima, neutrofilima i mastocitima [134,135].

Aktivacija PI3K izoformi klase I zavisi od specifičnih ushodnih signala: izoforme PI3K α i PI3K δ primarno se aktiviraju putem receptora tirozin-kinaze (RTK) i RAS GTP-aza [136–138], dok se PI3K γ primarno aktivira od strane G-protein spregnutih receptora (GPCR) putem G $\beta\gamma$ podjedinica, uz dodatnu modulaciju aktivnosti interakcijom sa RAS GTP-azama [139–141]. Izoforma PI3K β poseduje jedinstvenu sposobnost integracije signala iz RTK i GPCR puteva (preko G $\beta\gamma$ podjedinica), uz dodatnu regulaciju putem RHO GTPaza RAC1/CDC42 [142–144]. Ove aktivatore direktno pokreću transmembranske strukture poput RTK (nakon vezivanja faktora rasta kao što su insulin ili EGF) i GPCR (putem hemokina i hormona), dok su GTPaze (RAS/RHO) regulisane preko PIP₃-zavisnih gvanin-nukleotidnih faktora razmene (GEF-ova) i proteina koji aktiviraju GTPaze (GAP-ova) [145–147].

Gubitak funkcije PTEN-a (engl. *phosphatase and tensin homolog*, gen homologa fosfataze i tenzina), kao centralnog negativnog regulatora PI3K signalizacije, dovodi do akumulacije PIP₃ i pojačane aktivnosti PI3K nezavisno od primarnog ushodnog aktivatora [148,149]. U tom kontekstu, p110 β je najčešće dominantna izoforma u PTEN-deficitnim tumorima, verovatno zbog svoje bazalne aktivnosti i sposobnosti integracije GPCR i RHO GTPaza signalizacije [150,151]. Pokazano je da u zavisnosti od tkivnog konteksta i prisustva dodatnih onkogenih događaja, uključujući aktivaciju RTK-ova ili RAS-a, p110 α može značajno doprineti PI3K signalizaciji nakon gubitka PTEN-a [152,153].

PI3K enzim je ključna komponenta PI3K/AKT/mTOR signalnog puta (Slika 1.12). Kod svih izoformi PI3K klase I, u odsustvu aktivacionih signala, regulatorna subjedinica je u interakciji sa katalitičkom subjedinicom i inhibira njenu kinaznu aktivnost. Nakon aktivacije receptora dolazi do konformacionih promena koje omogućavaju aktivaciju katalitičke subjedinice. Aktivirana katalitička subjedinica se potom vezuje za ćelijsku membranu i katalizuje fosforilaciju PIP₂ u PIP₃. PIP₃ funkcioniše kao sekundarni glasnik tako što stvara mesta vezivanja za proteine koji sadrže plekstrin-homologi (engl. *pleckstrin homology*, PH) domen. Aktivacija ovih proteina zavisi od njihove translokacije iz citosola ka unutrašnjoj strani ćelijske membrane. Najpoznatiji i najviše proučavani PH-domen protein u PI3K signalnom putu je serin/treonin-kinaza AKT (protein kinaza B, PKB). AKT predstavlja centralni signalni čvor PI3K signalnog puta i deluje na niz nishodnih efekatora uključenih u regulaciju rasta, proliferacije, metabolizma i preživljavanja ćelije. Jedna od njegovih ključnih meta je TSC2 (engl. *tuberous sclerosis complex protein 2*), komponenta TSC1/2 kompleksa, čijom inaktivacijom dolazi do oslobađanja aktivnosti RHEB (engl. *Ras homolog enriched in brain*) i posredne aktivacije mTORC1, što rezultuje pojačanom sintezom proteina i rastom ćelije. Pored aktivacije mTORC1, AKT inhibira GSK3 (engl. *glycogen synthase kinase-3*) i FOXO (engl. *forkhead box O*) transkripcione faktore, čime utiče na ćelijski metabolizam, proliferaciju i smanjenje ekspresije proapoptotskih gena. AKT takođe doprinosi progresiji ćelijskog ciklusa inhibicijom p21 i p27, kao i povećanom preživljavanju ćelije kroz antiapoptotske efekte posredovane proteinom BAD (engl. *Bcl-2-associated agonist of cell death*). AKT dodatno doprinosi preživljavanju ćelije aktivacijom MDM2 (engl. *mouse double minute 2 homolog*), čime se pospešuje degradacija tumorsupresorskog proteina p53 i inhibira apoptotski odgovor [154].



Slika 1.12. Šematski prikaz PI3K signalizacije i njene uloge u razvoju malignih tumora; zelene linije označavaju aktivacione efekte, dok narandžaste linije označavaju inhibitorne efekte. Prilagođeno na osnovu referenci [129,154,155].

Proučavanjem genetskih promena u tumorskim ćelijama je pokazano da je PI3K signalni put jedan od najčešće izmenjenih puteva u humanim tumorima. Od katalitičkih izoformi PI3K klase I, PIK3CA gen, koji kodira p110 α subjedinicu, najčešće je mutiran u humanim malignim tumorima, dok su mutacije gena koji kodiraju druge katalitičke izoforme znatno ređe. Pored mutacija, u različitim tumorima zabeležene su i druge promene PI3K puta, uključujući povećanje broja kopija, odnosno amplifikaciju PIK3CA gena i povećanu ekspresiju pojedinih PI3K izoformi. Takođe, PTEN je jedan od najčešće izmenjenih tumor-supresorskih gena, a njegov gubitak funkcije dovodi do pojačane aktivnosti PI3K/AKT/mTOR signalnog puta [129,156]. Najučestaliji tipovi malignih tumora kod kojih su prijavljene mutacije i/ili amplifikacija PIK3CA gena prikazani su u Tabeli 1.1.

Tabela 1.1. Prikaz procentualne učestalosti promena PIK3CA gena u najčešćim tipovima malignih tumora. Prilagođeno na osnovu reference [129].

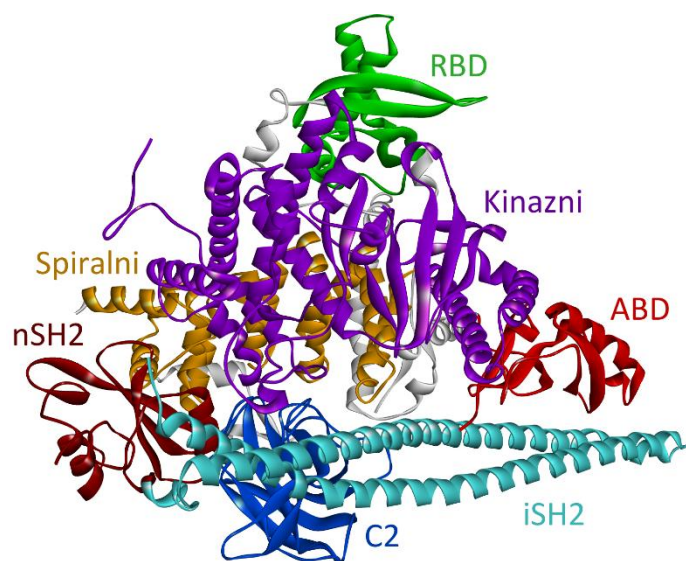
Tip malignog tumora	Učestalost mutacije PIK3CA	Učestalost povećanja broja kopija / amplifikacije PIK3CA
Endometrijum	Do 53,0%	10,3%
Dojka	Do 35,5%	Do 13,4%
Jajnik	33,0%	Do 39,8%
Kolorektalni	Do 30,6%	—
Bešika	Do 20,0%	—
Pluća	Do 20,0%	Do 69,6%
Grlić materice	13,6%	Do 76,4%

Tip malignog tumora	Učestalost mutacije PIK3CA	Učestalost povećanja broja kopija / amplifikacije PIK3CA
Glioblastom	Do 11,0%	Do 12,2%
Glava i vrat	—	Do 100%
Limfom	—	Do 68,2%
Želudac	—	36,4%
Štitasta žlezda	—	30,0%
Prostata	—	28,1%

Pošto aktivacija ovog signalnog puta dovodi do povećane enzimске aktivnosti, ushodne regulacije signalne kaskade i onkogenske transformacije ćelija, a mutacije PIK3CA gena se u velikoj meri mogu naći u mnogim tipovima solidnog tumora, ciljano dejstvo na PI3K enzim se pokazalo kao dobra strategija za pronalaženje novih lekova u terapiji malignog tumora [129,156,157].

1.4.1. Struktura PI3K enzima

Sve katalitičke subjedinice p110 klase I PI3K sadrže pet domena: **adapter-vezujući domen (ABD)**, **Ras-vezujući domen (RBD)**, **C2 domen**, **spiralni domen** i **kinazni domen**. Među njima, **RBD**, **C2**, **spiralni** i **kinazni domen** pokazuju visoku homologiju između izoformi. Regulatorna subjedinica p85 sastoji se od pet domena: **SH3 domena** (engl. *Src homology-3*), **GAP domena** (GTPaza-aktivirajući protein) i dva **SH2 domena** (**N-terminalni nSH2** i **C-terminalni cSH2**), razdvojena **inter-SH2 domenom (iSH2)** (Slika 1.13) [129,131].



Slika 1.13. Trodimenzionalna struktura PI3K α enzima - p110 subjedinica: ABD, RBD, C2, spiralni i kinazni domen; p85 subjedinica: nSH2 i iSH2 domen.

ABD domen, smešten na N-terminalnom kraju, učestvuje u interakciji sa regulatornom subjedinicom p85 [158,159]. On i **RBD domen** (aminokiseline 190–291 u PI3K α izoformi) predstavljaju male globularne domene sa α/β -sendvič topologijom. Ova dva domena povezuje dugačak spojni region sastavljen od četiri α -heliksa (aminokiseline 109–189). **C2 domen** (aminokiseline 330–480 u PI3K α izoformi) ima strukturu β -sendviča formiranog od dve četvorostruke antiparalelne β -ploče. Spojni region između RBD i C2 domena čini dugačak spiralni segment sa kraćim heliksom na N-terminalnom kraju (aminokiseline 292–329 u PI3K α izoformi). C2 domen je najmanje konzerviran među PI3K izoformama. **Spiralni domen** (aminokiseline 525–696 u PI3K α izoformi) u potpunosti

je građen od α -heliksa. Smatra se da predstavlja jezgro enzima na koje se oslanjaju svi ostali domeni. **Kinazni domen** (aminokiseline 697–1068 u PI3K α izoformi) sadrži katalitičko mesto enzima i građen je od dva režnja, karakteristična za proteinske i lipidne kinaze. Manji, N-terminalni režanj obuhvata aminokiseline 697–851 u PI3K α izoformi, dok veći, C-terminalni režanj obuhvata aminokiseline 852–1068 u PI3K α izoformi. Aminokiseline ovog domena su izrazito konzervirane, naročito one u blizini vezivnog džepa, koji se nalazi između N- i C-terminalnog režnja. Petlje koje potiču iz C2 i kinaznog domena čine glavne strukture odgovorne za kontakt sa membranom tokom aktivacije [158].

ATP-vezujuće mesto PI3K nalazi se na spoju dva režnja kinaznog domena i sadrži pet ključnih elemenata: **zglobni region**, **afinitetni džep**, **džep specifičnosti**, **hidrofobni region II (ribozni džep)** i **P-petlju** [131,160].

1. Zglobni region

Aminokiselinski ostaci koji oblažu ATP-vezujuće mesto čine **zglobni region** i mahom su konzervirani između izoformi klase I PI3K enzima, poput *Ile800*, *Tyr836*, *Phe930* i *Met922* u PI3K α izoformi, a takođe i aminokiseline koje se nalaze na udaljenosti pogodnoj za formiranje vodoničnih veza sa adeninskim prstenom, *Val850*, *Val851* i *Glu849* u PI3K α izoformi. Prisustvo strukturnog fragmenta koji se vezuje za zglobni region predstavlja ključnu karakteristiku kinaznih inhibitora. On imitira adeninski prsten ATP-a i omogućava usidranje inhibitora u vezivno mesto građenjem vodoničnih veza sa bočnim lancima valina (*Val850* i *Val851* u PI3K α izoformi). Ova interakcija je prisutna kod svih do sada opisanih PI3K inhibitora. Za razliku od ovih konzerviranih aminokiselina, aminokiseline u neposrednom okruženju nisu konzervirane, što otvara mogućnost za dizajniranje inhibitora koji ostvaruju specifičnu interakciju sa zglobnim regionom u cilju povećanja selektivnosti [160].

2. Afinitetni džep

Afinitetni džep predstavlja deo vezivnog mesta koji nije dostupan ATP-u. U PI3K α izoformi ga okružuju aminokiseline *Ser806*, *Lys833*, *Asp841*, *Tyr867* i *Ala885*, koje su konzervirane među izoformama. Produžavanje inhibitora do ovog džepa povećava njegovu potentnost, a može doprineti i podešavanju selektivnosti, iako su aminokiseline konzervirane [131,160].

3. Džep specifičnosti

Džep specifičnosti je hidrofobni džep koji se kod nekih izoformi otvara vezivanjem određenih tipova inhibitora, ali je kod izoforme PI3K α blokiran mrežom vodoničnih veza koja ograničava pokretljivost P-petlje, čineći ga nedostupnim za PI3K α inhibitore.

4. Hidrofobni region II i P-petlja

Hidrofobni region II (džep za vezivanje riboze) je jedan od dva segmenta aktivnog mesta gde aminokiseline nisu konzervirane među izoformama. On obuhvata osam ostataka koji se nalaze C-terminalno od zglobnog regiona (aminokiseline 852–860 u α -izoformi). Specifične interakcije inhibitora sa ovim regionom pokazale su se kao ključne za razvoj selektivnih inhibitora. Drugi segment je **P-petlja** (aminokiseline 768–781 u α -izoformi), koja učestvuje u vezivanju fosfatnih grupa ATP-a. Iako pokazuje manju varijabilnost od hidrofobnog regiona, ovaj deo se može iskoristiti za podešavanje selektivnosti putem specifičnih interakcija [160].

Aktivno mesto PI3K čine i fleksibilne strukturne petlje koje imaju važnu ulogu u regulaciji katalitičke aktivnosti i vezivanja inhibitora. **Aktivaciona petlja**, koja pokazuje blagu raznolikost u sekvencama između izoformi, neuređena je u dostupnim kristalnim strukturama PI3K α (aminokiseline 940–950). Smatra se da ova petlja ima prvenstveno strukturnu i regulatornu ulogu, jer utiče na dostupnost ATP-vezujućeg mesta i formiranje poddžepova, a samim tim i na ostvarivanje interakcija koje doprinose izoformnoj selektivnosti inhibitora [158,161]. Heliks α K12, koji sadrži dve mutacije povezane sa karcinomom, nalazi se u neposrednoj blizini aktivacione petlje i nSH2 domena p85 α . Ovi strukturni odnosi ukazuju na to da p85 α reguliše aktivnost p110 α putem konformacione promene aktivacione petlje posredovane heliksom α K12.

Nasuprot tome, **katalitička petlja** (aminokiseline 912–920 u PI3K α izoformi) ima direktnu ulogu u katalizi i sadrži konzervirane ostatke neophodne za prenos fosfatne grupe sa ATP-a na PIP₂. Iako ima sličnu konformaciju u strukturama p110 α i p110 γ , jedan aminokiselinski ostatak je specifičan: Ser919 u p110 α zamenjen je aspartatom u svim ostalim PI3K izoformama (Asp923 u p110 β , Asp950 u p110 γ i Asp897 u p110 δ), što može doprineti razlikama u supstratnoj specifičnosti i katalitičkoj efikasnosti [158].

U okviru ovog regiona nalazi se i konzerviran **DFG-motiv**, koji u p110 α subjediniči čine Asp933, Phe934 i Gly935, smešten u okviru kratke petlje katalitičkog domena. Kod protein kinaza, konformacione promene DFG-petlje predstavljaju osnovu za razvoj konformaciono selektivnih inhibitora. Međutim, dosadašnja strukturna i biohemijska istraživanja pokazuju da DFG-petlja PI3K izoformi p110 α i p110 γ ne menja konformaciju pri vezivanju supstrata ili inhibitora, i da se svi do sada opisani PI3K inhibitori vezuju za aktivnu (DFG-unutar) konformaciju. Zbog toga još uvek nije definisano da li se ovaj segment može efikasno iskoristiti u dizajnu PI3K inhibitora selektivnih za određenu izoformu [159,162].

1.4.2. PI3K inhibitori

Razvoj PI3K inhibitora predstavlja važnu oblast u savremenoj ciljanoj terapiji, usmeren ka farmakološkoj modulaciji signalnih puteva čija je regulacija često poremećena u malignim bolestima. [129]. Ovi inhibitori razvijeni su sa ciljem suzbijanja pojačane signalizacije koja doprinosi nekontrolisanom ćelijskom rastu, produženom preživljavanju ćelija i narušavanju ćelijske homeostaze [156]. Na ćelijskom nivou, specifični PI3K inhibitori najčešće ispoljavaju pretežno citostatsko dejstvo, koje se manifestuje zaustavljanjem ćelijskog ciklusa na prelasku G1/S, usled inhibicije PI3K/AKT-zavisne regulacije ćelijske proliferacije. Izraženiji citotoksični efekti nisu tipični samo za specifičnu PI3K inhibiciju, već se mogu javiti u zavisnosti od strukture inhibitora, dodatnih *off-target* mehanizama ili kombinovanih terapijskih pristupa [163,164].

Veliki broj potencijalnih lekova iz grupe PI3K inhibitora trenutno se nalazi u različitim fazama kliničkih ispitivanja, dok su pojedini već registrovani za primenu u lečenju malignih oboljenja, naročito određenih hematoloških maligniteta, kod kojih PI3K signalizacija ima istaknutu ulogu u održavanju patološkog fenotipa ćelija [130,156]. Pored toga, PI3K inhibitori se ispituju i u širem onkološkom kontekstu, uključujući pojedine solidne tumore, kao i u drugim patološkim stanjima u kojima je PI3K signalni put hronično aktiviran [130]. Njihovo uvođenje u kliničku praksu doprinelo je validaciji PI3K enzima kao terapijske mete, ali je istovremeno ukazalo na složenost postizanja optimalnog balansa između terapijske efikasnosti i očuvanja fizioloških funkcija ovog signalnog sistema [156,165].

Zbog svoje centralne uloge u regulaciji ćelijskog rasta, metabolizma i homeostaze, inhibicija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta često je praćena različitim neželjenim efektima koji uključuju hiperglikemiju, hiperlipidemiju, supresiju koštane srži, pneumonitis, stomatitis i hepatotoksičnost [166]. Razlike u neželjenim dejstvima su posledica različitih fizioloških funkcija pojedinih PI3K

izoformi u različitim tkivima. Inhibicija PI3K α izoforme, koja ima ključnu ulogu regulaciji homeostaze glukoze posredovane insulinom, često dovodi do hiperglikemije usled smanjenog perifernog iskorišćavanja glukoze i kompenzatornog porasta nivoa insulina, što dodatno može aktivirati kompenzatorne signalne puteve [167]. Nasuprot tome, poremećaji metabolizma lipida, naročito hiperlipidemija, najčešće se dovode u vezu sa inhibicijom mTOR-a, koji ima centralnu ulogu u regulaciji lipogeneze i energetskog balansa. Pored metaboličkih efekata, inhibicija PI3K signalnog puta utiče i na imunski sistem, što se može manifestovati klinički uočenim neželjenim efektima. Kožne reakcije, poput osipa, česta su pojava pojedinih PI3K inhibitora, ali su ređe izražene kod inhibitora koji deluju na PI3K β izoformu.

Inhibitori sa većim stepenom selektivnosti prema pojedinačnim komponentama PI3K/AKT/mTOR signalnog puta uglavnom pokazuju uži i predvidljiviji profil toksičnosti. Suprotno tome, inhibicija više izoformi ili više tačaka signalnih puteva istovremeno dovodi do akumulacije neželjenih efekata i značajno ograničava terapijski interval, što predstavlja jedan od ključnih izazova u kliničkoj primeni ovih lekova [166–168].

Terapija zasnovana na inhibiciji PI3K enzima često je ograničena pojavom primarne (intrinzične) i stečene rezistencije. Intrinzična rezistencija predstavlja odsustvo značajnog terapijskog odgovora već na početku lečenja, najčešće zbog prethodno postojećih funkcionalnih karakteristika tumora, zavisnosti tumorskih ćelija od alternativnih signalnih puteva, slabije zavisnosti tumorskih ćelija od signalnih puteva ciljane PI3K izoforme i aktivacije signalnih puteva, kao što je RAS/RAF/MEK/ERK put. Paralelni signalni putevi mogu ograničiti efikasnost PI3K inhibitora, naročito u tumorima u kojima su istovremeno aktivirani PI3K i MAPK signalizacija. Pored toga, povećana ekspresija i aktivacija receptorskih tirozin-kinaza (RTK), kao što su HER3, IGF1R, IR ili EGFR, može dovesti do održavanja ili reaktivacije PI3K signalizacije. Snažna aktivacija PI3K signalnog puta nishodno od HER2, posredstvom HER3, u ERBB2-amplifikovanim karcinomima dojke dodatno ukazuje na značaj RTK-zavisne PI3K signalizacije u modulaciji terapijskog odgovora. Takođe, u slučaju selektivne inhibicije PI3K α , ograničen terapijski odgovor može biti povezan sa signalizacijom preko drugih PI3K izoformi, naročito PI3K β u tumorima sa gubitkom PTEN-a, pri čemu ovaj odnos zavisi od tumorskog i molekulskog konteksta [129,169].

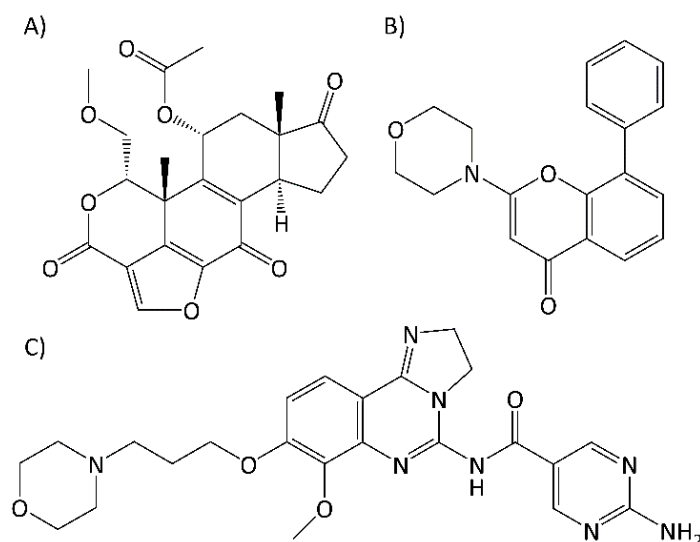
Stečena rezistencija se razvija nakon početnog perioda dobrog odgovora na terapiju, ali se vremenom ispoljava ponovnim rastom tumora i gubitkom terapijske efikasnosti. Ovaj proces može uključivati reaktivaciju nishodnih komponenti PI3K/AKT/mTOR signalnog puta, uključujući održavanje mTORC1 aktivnosti, kao i progresivne transkripcione i metaboličke adaptacije tumorskih ćelija. U hormonski receptor-pozitivnom karcinomu dojke značajne su ukrštene interakcije između PI3K-AKT-mTOR signalnog puta, estrogenskog receptora (ER) i regulatora ćelijskog ciklusa, uključujući ciklin D1-CDK4/6-Rb osu, što doprinosi endokrinnoj rezistenciji i predstavlja osnovu za kombinovane terapijske pristupe. U prekliničkim modelima karcinoma glave i vrata, aktivacija ciklin D1-CDK4/6 kompleksa povezana je sa stečenom rezistencijom na PI3K α inhibiciju, dok kombinovana inhibicija PI3K i CDK4/6 može doprineti prevazilaženju i stečene i inherentne rezistencije [129,169–171].

U cilju prevazilaženja intrinzične i stečene rezistencije na PI3K inhibitore, savremeni terapijski pristupi zasnivaju se na kombinovanim strategijama koje omogućavaju istovremenu blokadu više ključnih tačaka u signalnim putevima. Vertikalna inhibicija PI3K signalnog puta, ostvarena kombinacijom PI3K inhibitora sa mTORC1 inhibitorima ili dualnim PI3K/mTOR inhibitorima, može sprečiti adaptivnu reaktivaciju nishodne signalizacije. Kod tumora sa izraženom aktivacijom paralelnih signalnih puteva, poput RTK-MAPK signalizacije, dodatna inhibicija ovih puteva može sprečiti zaobilazanje PI3K zavisnosti. Kod stečene rezistencije na PI3K α inhibiciju centralnu ulogu ima aktivacija ciklin D1-CDK4/6-Rb ose, zbog čega kombinacija PI3K i CDK4/6 inhibitora predstavlja efikasnu strategiju za blokadu proliferacije. U ER-pozitivnim tumorima, adaptivna reaktivacija estrogenskog receptora opravdava primenu trojne terapije koja uključuje PI3K inhibitor,

endokrinu terapiju i CDK4/6 inhibitor, čime se istovremeno cilja signalizacija rasta, hormonska regulacija i kontrola ćelijskog ciklusa. Međutim, uprkos izazovima povezanim sa razvojem rezistencije, inhibicija PI3K signalnog puta i dalje se smatra obećavajućom terapijskom strategijom, što potvrđuju brojna preklinička i klinička ispitivanja [129,169–171].

1.4.2.1. Tipovi PI3K inhibitora

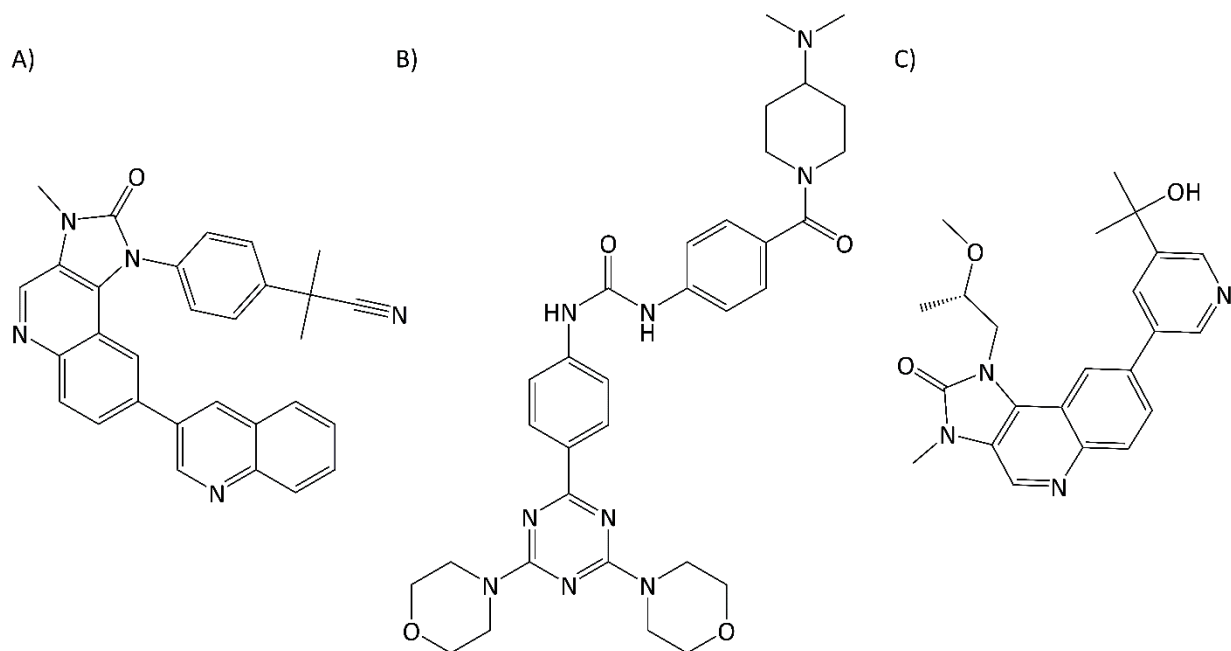
Prvi razvijani inhibitori koji deluju na p110 α subjedinicu bili su **neselektivni PI3K inhibitori (pan-PI3K inhibitori)**. Oni u određenoj meri inhibiraju katalitičku aktivnost sve četiri izoforme PI3K klase I. **Vortmanin ((1R,3R,5S,9R,18S)-18-(metoksimetil)-1,5-dimetil-6,11,16-triokso-13,17-dioksapentaciklo[10.6.1.0²,¹⁰.0⁵,⁹.0¹⁵,¹⁹]nonadeka-2(10),12(19),14-trien-3-il acetat)** (Slika 1.14A) i **LY294002 (2-(morfolin-4-il)-8-fenil-4H-hromen-4-on)** (Slika 1.14B) pripadaju prvoj generaciji snažnih PI3K inhibitora sa širim spektrom dejstva. Njihova ograničena primena posledica je neselektivnosti prema pojedinačnim PI3K izoformama, delovanja na veći broj tkiva i povećanog rizika od toksičnih efekata. **Kopanlisib (BAY-80-6946; 2-amino-N-{7-metoksi-8-[3-(morfolin-4-il)propoksi]-2H,3H-imidazo[1,2-c]hinazolin-5-il}pirimidin-5-karboksamid)** (Slika 1.14C) je predstavljao klinički značajan primer pan-PI3K inhibitora, ranije odobrenog za terapiju relapsnog folikularnog limfoma, pri čemu su među čestim neželjenim efektima opisani hiperglikemija i mučnina. Međutim, odobrenje je kasnije dobrovoljno povučeno, jer obavezna postmarketinška studija nije potvrdila očekivanu kliničku korist [130,172,173].



Slika 1.14. Sturkturane formule A) vormtanina, B) LY294002 i C) kopanlisiba.

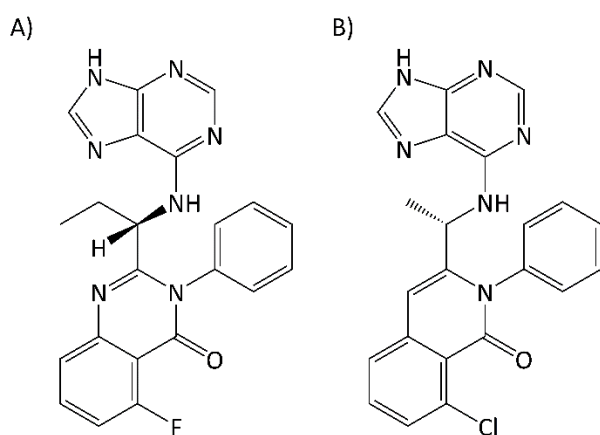
Drugu grupu predstavljaju **dualni pan-PI3K/mTOR inhibitori**. Razvoj ove grupe inhibitora zasniva se na strukturnoj sličnosti katalitičkih domena p110 subjedinica PI3K i mTOR-a, što omogućava dizajn ATP-kompetitivnih molekula sposobnih da istovremeno inhibiraju obe kinaze [174]. Za razliku od rapaloga, koji pretežno inhibiraju mTORC1, dualni PI3K/mTOR inhibitori ciljaju sve katalitičke izoforme PI3K klase I, kao i mTOR u okviru kompleksa mTORC1 i mTORC2. Time se postiže potpunija blokada PI3K/AKT/mTOR signalnog puta i može se ograničiti povratna aktivacija signalizacije koja se javlja pri izolovanoj inhibiciji mTORC1. Ipak, zbog istovremenog delovanja na više ključnih komponenti signalnog puta, ova grupa inhibitora može biti povezana sa izraženijom toksičnošću i užom terapijskom širinom [175,176]. Primeri dualnih PI3K/mTOR inhibitora uključuju **daktolisib (NVP-BEZ235; 2-metil-2-{4-[3-metil-2-okso-8-(hinolin-3-il)-1H,2H,3H-imidazo[4,5-c]hinolin-1-il]fenil}propanenitril)**, **gedatolisib (PF-05212384/PKI-587; 1-{4-[4,6-bis(morfolin-4-il)-1,3,5-triazin-2-il]fenil}-3-{4-[4-(dimetilamino)piperidin-1-karbonil]fenil}urea)**, i **samotolisib (LY3023414; 8-[5-(2-hidroksipropan-2-il)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoksipropil]-3-metil-**

1H,2H,3H-imidazo[4,5-c]hinolin-2-on (Slika 1.15) [177–179]. Među njima je gedatolisib najdalje odmakao u kliničkim ispitivanjima i trenutno je u fazi III ispitivanja kod HR+/HER2–uznapredovalog karcinoma dojke [180].



Slika 1.15. Strukturne formule A) daktolisiba, B) gedatolisiba i C) samotolisiba.

Treća vrsta inhibitora su **PI3K inhibitori selektivni za određenu izoformu enzima** [130,156,172,181,182]. Za razliku od pan-PI3K inhibitora, kod selektivnih inhibitora se očekuje manje *off-target* efekata. Osim toga, pored inhibicije određene izoforme PI3K enzima, manja je mogućnost pojave neželjenih efekata koji su posledica inhibicije ostalih PI3K izoformi. Na primer **idelalisib (GS-1101; 5-fluoro-3-fenil-2-[(1S)-1-[(9H-purin-6-il)amino]propil]-3,4-dihidrohinaolin-4-on)** – PI3K δ inhibitor i **duvelisib (IPI-145; 8-hloro-2-fenil-3-[(1S)-1-[(9H-purin-6-il)amino]etil]-1,2-dihidroizohinolin-1-on)** – dualni PI3K δ i PI3K γ inhibitor (Slika 1.16), su registrovani lekovi koji se u terapiji relapsne ili refraktorne hronične limfocitne leukemije. PI3K δ izoforma ima veliku ulogu u malignitetima B limfocita, a pokazalo se da dualna inhibicija PI3K γ i PI3K δ izoforme efikasnije suzbija tumorogenezu.



Slika 1.16. Strukturne formule A) idelalisiba i B) duvelisiba.

Međutim, među izoformno selektivnim pristupima posebno se izdvaja selektivna inhibicija PI3K α , budući da je p110 α izoforma često direktno uključena u onkogenu signalizaciju solidnih tumora, naročito u prisustvu aktivirajućih PIK3CA mutacija.

1.4.2.2. PI3K α selektivni inhibitori

Selektivna inhibicija PI3K α izoforme predstavlja važnu terapijsku prednost u odnosu na neselektivne (pan-PI3K) inhibitore, jer omogućava ciljano suzbijanje signalizacije u tumorima sa aktivirajućim mutacijama u PIK3CA genu, uz smanjenje toksičnih efekata. Usmeravanje terapije ka PI3K α omogućava efikasnije inhibiranje patološke signalizacije u tumorima zavisnim od ove izoforme, dok se istovremeno pošteduju druge PI3K izoforme, posebno PI3K δ i PI3K γ , koje imaju ključnu ulogu u imunskom sistemu. Time se smanjuje učestalost neželjenih efekata poput imunosupresije i inflamatornih poremećaja, što poboljšava terapijski indeks i podnošljivost lečenja, naročito u dugotrajnoj terapiji i u kombinaciji sa drugim hormonskim ili ciljano delujućim lekovima [129,156]. Dodatno, PI3K α predstavlja jedinu izoformu klase IA čija je aktivnost neophodna za angiogeni razvoj krvnih sudova, kao glavna izoforma uključena u VEGF-zavisnu migraciju endotelних ćelija i formiranje novih krvnih sudova, te njena selektivna inhibicija može istovremeno ograničiti rast tumora i formiranje tumorske vaskulature [183].

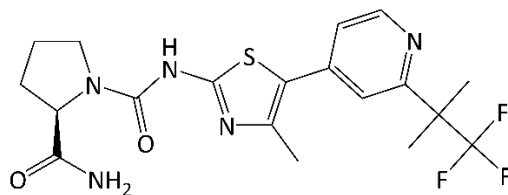
Selektivna inhibicija PI3K α zasniva se na malim strukturnim razlikama u ATP-vezivnom mestu, pri čemu se ključne nekonzervirane aminokiselinske razlike grupišu u dva regiona: hidrofobni region II i P-petlja [160,184,185]. Za razliku od visoko konzerviranog zglobnog regiona i afinitetnog džepa, ovi regioni sadrže α -specifične aminokiselinske ostatke koji omogućavaju ostvarivanje izoformske selektivnosti bez negativnog uticaja na potentnost inhibitora.

Hidrofobni region II obuhvata aminokiseline C-terminalno od zglobnog regiona i predstavlja jednu od najznačajnijih determinanti selektivnosti. Interakcije sa ostacima kao što su α Gln859, α Ser854 i α His855 mogu doprineti selektivnom vezivanju inhibitora u odnosu na ostale izoforme [185]. P-petlja utiče, kako na direktne interakcije sa inhibitorima, tako i na konformacionu plastičnost ovog segmenta. Razlike u aminokiselinskom sastavu, uključujući α Ser773, α Arg770 i α Trp780, mogu doprineti negativnoj selekciji prema PI3K β i PI3K δ [185,186].

Za razliku od PI3K β i PI3K δ , kod PI3K α otvaranje džepa selektivnosti zahteva izraženije konformacione promene, usled stabilizujuće mreže vodoničnih veza koja ograničava konformacionu plastičnost P-petlje i stabilizuje položaj α Trp780 [186]. Ovakva strukturna ograničenja smanjuju energetska dostupnost ovog džepa i objašnjavaju zašto inhibitori propelerskog oblika (*engl. propeller-shaped*), koji ostvaruju interakcije u otvorenom džepu selektivnosti, najčešće pokazuju niži afinitet i selektivnost prema PI3K α u poređenju sa PI3K β i PI3K δ . Zbog toga se selektivnost prema PI3K α češće postiže optimizacijom lokalnih interakcija u hidrofobnom regionu II i P-petlji, dok modifikacije u afinitetnom džepu pretežno doprinose povećanju potentnosti, a ređe izoformskoj selektivnosti [160,185,186].

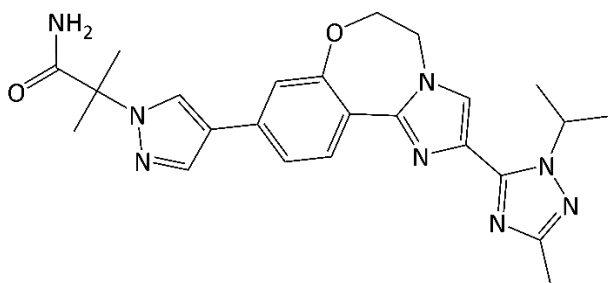
Prvi FDA-odobreni lek koji deluje kao selektivni inhibitor PI3K α izoforme je **alpelisib (BYL719; (2S)-N¹-(4-metil-5-[2-(1,1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-il)piridin-4-il]-1,3-tiazol-2-il)pirolidin-1,2-dikarboksamid)** (Slika 1.17), koji predstavlja tiazolni derivat [187]. Alpelisib pokazuje izraženu selektivnost prema PI3K α , pri čemu je približno 50 puta selektivniji u odnosu na PI3K γ , 63 puta u odnosu na PI3K δ i 260 puta u odnosu na PI3K β . Alpelisib je odobren 2019. godine za primenu u kombinaciji sa fulvestrantom, selektivnim agensom za degradaciju estrogenih receptora (*engl. Selective Estrogen Receptor Degraders, SERD*), kod pacijenata sa HR+/HER2– uznapredovalim ili metastatskim karcinomom dojke sa PIK3CA mutacijama. Godine 2022. je odobren za lečenje pacijenata sa PIK3CA-povezanim spektrom sindroma prekomernog rasta (*engl. PI3K-related overgrowth spectrum, PROS*), kod kojih je indikovana sistemska terapija, pri čemu se primenjuje kao

monoterapija. Alpelisib može izazvati hiperglikemiju kao neželjeno dejstvo usled inhibicije PI3K α , ali u poređenju sa pan-PI3K inhibitorima ima povoljniji bezbednosni profil. Neželjeni efekti poput hiperglikemije, osipa i dijareje obično se mogu kontrolisati uz adekvatno praćenje [130,172,187,188].



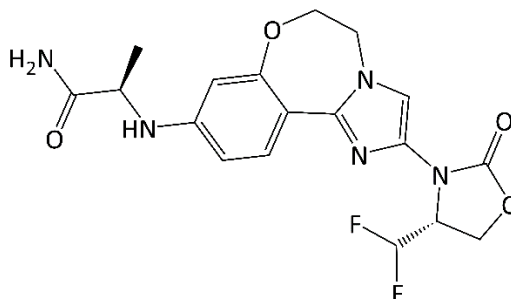
Slika 1.17. Strukturna formula alpelisiba

Taselisib (GDC-0032; 2-metil-2-(4-{4-[3-metil-1-(propan-2-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il]-9-oksa-3,6-diazatriciklo[8.4.0.0^{2,6}]tetradeka-1(14),2,4,10,12-pentaen-12-il}-1H-pirazol-1-il)propanamid) (Slika 1.18), derivat benzoksazepina, predstavlja inhibitor sa smanjenom aktivnošću prema PI3K β izoformi (engl. *β -sparing*), dok pokazuje aktivnost prema PI3K α , PI3K γ i PI3K δ izoformama. Međutim, zbog umerene efikasnosti i izražene toksičnosti, klinička ispitivanja su obustavljena [189].



Slika 1.18. Strukturna formula taselisiba.

Inavolisib (GDC-0077; (2S)-2-({4-[(4S)-4-(difluorometil)-2-okso-1,3-oksazolidin-3-il]-9-oksa-3,6-diazatriciklo[8.4.0.0^{2,6}]tetradeka-1(14),2,4,10,12-pentaen-12-il}amino)propanamid) (Slika 1.19), takođe derivat benzoksazepina, predstavlja noviju generaciju PI3K α inhibitora sa povećanom selektivnošću prema PI3K α i sposobnošću indukovane degradacije mutiranog p110 α proteina. Odobren je 2024. godine u kombinaciji sa palbociklibom (CDK4/6 inhibitor) i fulvestrantom (SERD) za lečenje odraslih pacijenata sa endokrino-rezistentnim, PIK3CA-mutiranim, ER-pozitivnim, HER2-negativnim, lokalno uznapredovalim ili metastatskim karcinomom dojke [190]. Ovaj inhibitor pokazuje povećanu selektivnost prema PI3K α u poređenju sa ranijim benzoksazepinskim derivatima, kao i dejstvo na mutiranim oblicima. Neželjene reakcije uključuju osip, suhu kožu, smanjen apetit i infekcije urinarnog trakta, ali su generalno blaže nego kod alpelisiba [191].



Slika 1.19. Strukturna formula inavolisiba.

Pored ovih klinički najznačajnijih primera, noviji pravac razvoja obuhvata mutant-selektivne PI3K α inhibitore, kao što su RLY-2608, STX-478 i LOXO-783, koji su dizajnirani da selektivnije ciljaju onkogene PIK3CA mutante uz potencijalno manji uticaj na fiziološku funkciju nemutirane PI3K α izoforme [192–194].

Uprkos napretku selektivnih inhibitora PI3K α , postojeća terapija je ograničena različitim stepenom selektivnosti i neželjenim efektima. Neželjeni efekti, poput gastrointestinalnih smetnji usled inhibicije PI3K δ [191] ili hiperglikemije i hiperinsulinemije kao *on-target* efekata, predstavljaju glavna ograničenja doze za PI3K α inhibitore [169]. Pored toga, mnogi inhibitori pokazuju suboptimalnu efikasnost ili toksičnost u kliničkim ispitivanjima [195]. Klinički odgovori na terapiju često su umereni i nedovoljni da opravdaju nastavak studija zbog izraženih toksičnosti. Zbog toga je identifikacija i dizajn novih inhibitora PI3K α sa poboljšanom selektivnošću i povoljnijim odnosom efikasnosti i bezbednosti od velikog značaja. Savremeni pristup razvoju novih kandidata ne podrazumeva samo optimizaciju afiniteta prema ciljanoj izoformi, već i sveobuhvatnije sagledavanje osobina koje mogu uticati na potencijalnu primenu ovakvih jedinjenja. Takva ispitivanja uključuju ranu procenu farmakokinetički relevantnih karakteristika, sposobnosti prolaska kroz biološke barijere, kao i dodatnu eksperimentalnu karakterizaciju svojstava koja mogu doprineti boljem razumevanju njihovog ponašanja u biološkim sistemima. Ovakav integrisani pristup omogućava racionalniju selekciju obećavajućih struktura i predstavlja važan korak ka razvoju novih inhibitora sa povoljnijim terapijskim profilom.

1.5. Dizajn kinaznih inhibitora računarskim metodama

S obzirom na brojnost kinaza i njihovu ulogu u ključnim signalnim putevima, poremećaj regulacije kinazne aktivnosti predstavlja jedan od najvažnijih mehanizama u onkogenezi, ali i u patogenezi drugih oboljenja. Od odobrenja imatiniba kao prvog kinaznog inhibitora, kinaze su postale jedan od centralnih terapijskih ciljeva farmaceutske industrije [25,196]. Opšte je poznato da napredak u dizajnu novih lekova sve manje počiva isključivo na pristupu zasnovanom na ponavljanoj sintezi većeg broja jedinjenja i njihovom ispitivanju („*trial and error*“), već u značajnoj meri proističe iz sistematičnijeg, racionalnog vođenja procesa, pri čemu su *in silico* pristupi postali jedan od ključnih pokretača razvoja, što se jasno odražava i u oblasti kinaznih inhibitora [197]. Njihov značaj se posebno vidi u ranijim fazama otkrića i optimizacije, gde omogućavaju da se potencijalni pravci hemijske optimizacije rangiraju i usmere pre nego što se uđe u opsežne eksperimentalne probe. Time se skraćuju procesi otkrića „*hit*“ jedinjenja (jedinjenja sa potvrđenom reproduktivnom aktivnošću iznad unapred definisanog praga), prelaska iz „*hit*“ u „*lead*“ (jedinjenja koje ispunjavaju unapred definisane minimalne kriterijume za dalju optimizaciju strukture i aktivnosti; *engl.* „*hit-to-lead*“), i optimizacije „*lead*“ jedinjenja, uz smanjenje broja koraka koji ne doprinose stvarnom napretku u otkrivanju jedinjenja sa poboljšanim svojstvima [198,199].

Doprinos računarskih pristupa u ovoj oblasti je važan ne samo zbog povećanja potentnosti, već i zbog rešavanja drugih poteškoća u razvoju kinaznih inhibitora. Pre svega, kinaze čine veliku i strukturno srodnu superfamiliju, pa je postizanje adekvatne selektivnosti unutar kinoma često jednako izazovno kao i postizanje same aktivnosti. Iz tog razloga *in silico* metode imaju značaj u objašnjavanju razlika u profilu vezivanja inhibitora za odgovarajuće ciljno mesto i samim tim omogućavaju usmeravanje optimizacije ka kandidatima za koje je verovatnije da će pokazati povoljan balans između aktivnosti i selektivnosti. Pored toga, literatura sve češće ističe i značaj razumevanja i kontrolisanja polifarmakologije, odnosno šireg spektra potencijalnih interakcija sa srodnim ciljnim mestima, što direktno utiče na efikasnost i bezbednosni profil kandidata [200,201].

Dodatnu složenost predstavlja činjenica da je efikasnost terapije kinaznim inhibitorima često ograničena pojavom rezistencije, pri čemu razumevanje strukturnih i funkcionalnih faktora koji utiču na sposobnost vezivanja inhibitora za ciljno mesto može biti od presudnog značaja za racionalno

usmeravanje daljih modifikacija. Iz tog razloga, *in silico* pristupi imaju poseban značaj u objašnjavanju razloga zbog kojih određene strukturne modifikacije dovode do smanjenja aktivnosti u biološki relevantnim uslovima, kao i u dizajnu kandidata koji mogu zadržati efikasnost i u prisustvu mutacija ili drugih adaptivnih promena [200,201].

Razvoj sve većih baza podataka, zajedno sa napretkom metoda za obradu i analizu podataka i veštačke inteligencije (engl. *data science/artificial intelligence*), dodatno je proširio mogućnosti računarskog dizajna kinaznih inhibitora. Ovi pristupi omogućavaju da se prethodno ispitane serije jedinjenja bolje iskoriste kao osnova za dizajn novih kandidata i da se ranije prepoznaju strukture sa većim potencijalom za dalja ispitivanja. U novijoj literaturi se zato računarske metode sve više posmatraju kao neizostavna podrška eksperimentalnom radu, kroz iterativne cikluse u kojima se hipoteze najpre oblikuju računarski, a zatim ciljano proveravaju eksperimentalno [202,203].

Dizajn lekova primenom računarskih metoda (engl. *Computer-Aided Drug Design, CADD*) predstavlja važan deo savremenog procesa otkrivanja i razvoja novih lekova. CADD pristupi se koriste u identifikaciji, karakterizaciji i optimizaciji potencijalnih kandidata za lekove, pri čemu mogu doprineti racionalnijem izboru molekula za dalja eksperimentalna ispitivanja i bržoj i efikasnijoj selekciji kandidata u ranoj fazi razvoja leka [204,205]. U zavisnosti od toga da li se koriste informacije o trodimenzionalnoj strukturi ciljnog mesta dejstva, CADD metode se najčešće dele na **dizajn lekova zasnovan na strukturi ciljnog mesta dejstva**, odnosno **strukturno-zasnovani dizajn lekova** i **dizajn lekova zasnovan na strukturi liganada** (engl. *ligand-based drug design, LBDD*), odnosno **ligand-zasnovani dizajn lekova**. SBDD koristi 3D strukturu biološke mete ili njenog vezujućeg mesta za identifikaciju i optimizaciju molekula koji mogu ostvariti povoljne interakcije sa ciljem, dok se LBDD zasniva na podacima o poznatim aktivnim jedinjenjima i odnosu između njihove strukture i biološke aktivnosti [204,206].

Iako se SBDD i LBDD zasnivaju na različitim vrstama podataka, u savremenom dizajnu lekova oni se pre svega posmatraju kao komplementarni pristupi [205,207]. SBDD omogućava direktnije proučavanje interakcija između liganada i ciljnog mesta, ali njena primena može biti otežana kod fleksibilnih proteina, promenljivih vezujućih mesta ili u situacijama kada pouzdana 3D struktura mete nije dostupna. Nasuprot tome, LBDD polazi od poznatih aktivnih jedinjenja i može da prepozna veze između strukture liganada i njihove biološke aktivnosti čak i kada strukturni podaci o meti nisu dostupni [204,206]. Zbog toga kombinovanje ova dva pristupa može pouzdanije usmeriti dizajn novih jedinjenja, jer SBDD doprinosi razumevanju načina vezivanja u ciljnom mestu, dok LBDD olakšava prepoznavanje strukturnih osobina liganada značajnih za aktivnost [205,207].

CADD zato predstavlja iterativni proces koji povezuje računarsko modelovanje, dizajn, sintezu i eksperimentalnu proveru aktivnosti novih jedinjenja. Polazeći od poznate strukture ciljnog mesta dejstva ili prethodno dostupnih podataka o aktivnim ligandima, *in silico* studije se koriste za identifikaciju i definisanje prioriternih potencijalnih kandidata. Nakon toga sledi sinteza odabranih jedinjenja i ispitivanje njihovih bioloških osobina, kao što su potentnost, afinitet i efikasnost, primenom odgovarajućih *in vitro* testova. Rezultati ovih ispitivanja zatim se koriste za tumačenje odnosa između strukture i aktivnosti i za usmeravanje narednog ciklusa modelovanja, sinteze i biološke evaluacije [208,209].

1.6. Metode u dizajnu lekova bazirane na strukturi ciljnog mesta

SBDD se primenjuje kada je dostupna trodimenzionalna struktura ciljanog makromolekula (najčešće proteina) ili kada se ona može pouzdano modelovati [210]. U okviru SBDD pristupa koriste se eksperimentalno određene ili računarski predviđene strukture receptora radi dizajniranja i optimizacije liganada sa odgovarajućim elektrostatičkim i stereohemijskim svojstvima, kao i visokim afinitetom vezivanja. Analizom trodimenzionalne organizacije aktivnog mesta mogu se identifikovati

žljebovi i poddžepovi mesta vezivanja, kao i prostorna raspodela naelektrisanja, što omogućava racionalno uvođenje strukturnih modifikacija koje poboljšavaju potentnost i/ili selektivnost.

Intenzivan razvoj strukturno-bioloških metoda doveo je do toga da se u Svetskoj proteinskoj bazi podataka (engl. *Protein Data Bank*, PDB) danas nalazi više stotina hiljada eksperimentalno određenih biomolekulskih struktura [211]. Eksperimentalne metode koje se najčešće koriste za razrešavanje trodimenzionalne strukture ciljnog mesta delovanja uključuju:

- 1) **Kristalografiju zasnovanu na X-zracima** [212]
- 2) **NMR spektroskopiju** [213]
- 3) **Kriogenu elektronsku mikroskopiju** [214]

Ipak, broj poznatih proteinskih sekvenci višestruko prevazilazi broj dostupnih eksperimentalnih struktura: baze podataka Nacionalnog Centra za Biotehnoške Informacije (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sadrže enorman i rastući broj zapisa proteinskih sekvenci, dok je broj definisanih trodimenzionalnih struktura znatno manji [215]. Dodatno, određivanje strukture mnogih proteina ostaje eksperimentalno zahtevno, posebno za membranske proteine, zbog njihove hidrofobne površine, slabije stabilnosti izvan membranskog okruženja i poteškoća u ekspresiji, prečišćavanju i kristalizaciji [216,217]. Zbog toga se u savremenom istraživanju široko koriste *in silico* pristupi, koji mogu obezbediti strukturne modele pogodne za SBDD kada eksperimentalna struktura nije dostupna [218].

Postoje dve osnovne kategorije metoda predviđanja strukture proteina: modelovanje zasnovano na šablonu (engl. *template-based modeling*, TBM) i modelovanje bez šablona, odnosno slobodno modelovanje (engl. *free modeling*, FM), u zavisnosti od toga da li se tokom izgradnje modela koriste poznate proteinske strukture kao šabloni [219,220]. Pored toga, savremene podele nisu potpuno stroge: neke TBM metode uključuju energetske vođeno usavršavanje modela, dok deo FM pristupa koristi fragmentno uzorkovanje i informacije iz PDB baze, uključujući metode mašinskog učenja [221]. U okviru ove opšte podele, algoritmi se u praksi najčešće razvrstavaju prema konkretnoj strategiji izgradnje modela na:

- 1) ***Ab initio* metode** – ove metode pripadaju FM pristupima, jer ne koriste poznatu strukturu kao direktan šablon. Polaze od termodinamičkog principa da nativna konformacija proteina odgovara stanju najniže slobodne energije i omogućavaju predviđanje novih nabora proteina, ali su računski zahtevne i ograničene kod dužih sekvenci.
- 2) **Metodologije ugradnje sekvence i prepoznavanja nabora (engl. *threading/fold recognition*)** – ove metode pripadaju TBM pristupima, jer ciljnu sekvencu uklapaju u biblioteku poznatih 3D nabora. Zasnivaju se na pretpostavci da je struktura proteina konzervirana od sekvence, pa mogu biti korisne i kada je sličnost sekvence između ciljnog proteina i dostupnih šablona niska.
- 3) **Homologno modelovanje** – takođe pripada TBM pristupima. Zasniva se na korišćenju poznatih struktura homolognih proteina kao šablona za izgradnju modela ciljnog proteina i obično daje najtačnije rezultate među klasičnim metodama kada postoji odgovarajući homologni šablon.
- 4) **Hibridne metode** – predstavljaju pristupe koji kombinuju elemente više metodologija, uključujući informacije iz poznatih struktura, fragmentno uzorkovanje, višestruka poravnanja sekvenci i metode mašinskog učenja. AlphaFold i srodni algoritmi predstavljaju napredne primere takvih pristupa.

Homologno modelovanje dugo je bilo jedan od standardnih pristupa za predviđanje strukture proteina. Zasniva se na pretpostavci da proteini sa sličnom aminokiselinskom sekvencom najčešće imaju i sličnu trodimenzionalnu strukturu [222]. Pojava AlphaFold2 i drugih metoda zasnovanih na

dubokom učenju (engl. *deep learning*) značajno je promenila ovu oblast. AlphaFold2 koristi neuronske mreže i informacije dobijene poređenjem velikog broja srodnih proteinskih sekvenci za predviđanje 3D strukture proteina, pri čemu je pokazao znatno veću tačnost u odnosu na ranije metode. Noviji model, AlphaFold3, dodatno proširuje ovu primenu jer omogućava predviđanje struktura kompleksa koji mogu uključivati proteine, nukleinske kiseline, male molekule, jone i modifikovane ostatke, što može biti korisno za SBDD i analizu interakcija protein–protein i protein–ligand [223].

Ipak, važno je istaći da, kada je dostupan šablon sa vrlo visokim stepenom poklapanja sekvence, homologno modelovanje i dalje može pokazati veoma dobre, a ponekad i bolje performanse, naročito u pogledu lokalne geometrije funkcionalnih regiona (npr. aktivnih mesta), pakovanja bočnih lanaca ili u slučajevima kada šablon odgovara istom domenu i konformacionom stanju koje se modeluje [224–226].

Bez obzira na to da li je struktura ciljnog proteina eksperimentalno određena ili predviđena, ona predstavlja osnovu za SBDD, jer omogućava direktno modelovanje interakcija između liganda i mesta vezivanja, a time i detaljniji uvid u način vezivanja i strukturne determinante afiniteta. Za proučavanje ovih interakcija među najčešće korišćenim pristupima su molekulski doking, strukturno-zasnovani virtuelni skrining i molekulska dinamika, koji se primenjuju komplementarno: virtuelni skrining i doking omogućavaju identifikaciju i rangiranje potencijalnih kandidata na osnovu strukturnih hipoteza o vezivanju, dok molekulska dinamika pruža dodatni uvid u stabilnost i postojanost predloženih interakcija u kontekstu konformacione fleksibilnosti receptora [210,227].

S obzirom na to da konformacione promene mogu menjati dostupnost i oblik pojedinih poddžepova, kao i geometriju ključnih polja interakcija u mestu vezivanja, u praksi se često razmatra više reprezentativnih konformacija receptora, posebno kod složenih ili prilagodljivih džepova. Ovakav pristup doprinosi realističnijoj proceni afiniteta i selektivnosti, jer smanjuje rizik da se zaključci zasnuju na jednoj, potencijalno nerepresentativnoj statičnoj strukturi proteina [227,228].

Opisi kompleksa ligand-protein mogu poslužiti za identifikaciju ključnih međumolekulskih interakcija, razumevanje ligand-indukovanih konformacionih promena i karakterizaciju (potencijalno) alternativnih mesta vezivanja. Nakon identifikacije relevantnog kompleksa ligand-receptor, podaci o biološkoj aktivnosti korelišu se sa strukturnim determinantama vezivanja, čime se omogućava usmeravanje strukturnih modifikacija liganada sa ciljem povećanja afiniteta i/ili selektivnosti prema mestu vezivanja [210,229,230].

1.6.1. Homologno modelovanje

Homologno modelovanje je kompjuterska metoda za predviđanje 3D strukture proteina na osnovu njegove aminokiselinske sekvence i poznate strukture srodnog proteina koja služi kao šablon. Polazi se od toga da proteini sa značajnom sličnošću sekvence najčešće imaju i vrlo sličnu trodimenzionalnu strukturu, jer se ona tokom evolucije čuva više nego sama sekvenca [231]. Kada postoji adekvatan šablon i poravnanje je dobro, homologno modelovanje daje pouzdane modele uz relativno kratko vreme izračunavanja u odnosu na metode bez šablona [231,232].

Iako su metode poput AlphaFold-a značajno unapredile predikciju globalnog proteinskog nabora (engl. *global protein fold*), homologno modelovanje i dalje ima praktičnu vrednost kada postoji šablon u odgovarajućem konformacionom stanju, kao i kada je potrebno dosledno modelovati varijante proteina, uključujući mutante, izoforme, insercije i delecije. Ovaj pristup je posebno koristan kada se lokalni regioni od funkcionalnog značaja, kao što su vezujuća mesta i petlje, moraju ciljano modelovati, optimizovati i validirati kroz jasno definisan tok rada [231–233]

Metoda homolognog modelovanja se sastoji od nekoliko koraka:

1. Identifikacija i selekcija šablona

U prvom koraku sekvenca proteina (target) se koristi da se u bazama eksperimentalnih struktura (najčešće PDB) pronađe odgovarajuća šablon struktura [234]. Za pretragu se često koriste BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) i psi-BLAST (engl. *position-specific-BLAST*) alati, koji omogućavaju poređenje i poravnanje sekvenci [235]. Kod udaljene homologije, kada BLAST nije dovoljno osetljiv, koriste se napredniji pristupi zasnovani na profilima i HMM-HMM (engl. *Hidden Markov Models*) poravnanjima, kao što je HHblits (engl. *HMM-HMM-based lightning-fast iterative sequence search*) [236].

Nakon pretrage potrebno je izabrati najpogodniji šablon. Pri tome se ne gleda samo procenat identičnosti/sličnosti sekvence, već i kvalitet šablon strukture (rezolucija, kompletiranost), kao i prisustvo liganda, kofaktora i konformaciono stanje (npr. aktivno/neaktivno), jer sve ovo može uticati na lokalnu geometriju i funkcionalnu interpretaciju modela [231–233].

2. Poravnanje sekvenci i korekcije

Kada je šablon izabran, radi se poravnanje target-sekvence i šablon-sekvence. Kvalitet poravnanja je ključan, jer greške u poravnanju vode ka pogrešnom mapiranju rezidua u prostoru i posle se prenose na polipeptidnu okosnicu, petlje i bočne lance [231]. Zbog toga se poravnanje često dodatno koriguje, naročito u regionima insercija/delecija i oko funkcionalno bitnih motiva, uz oslanjanje na informacije o sekundarnoj strukturi ili upotrebu više šablona [232,233].

3. Građenje modela

Postoje različite metode za formiranje 3D modela za target na osnovu šablona. Po metodologiji one se mogu podeliti na metode spajanje rigidnih tela, metode podudaranja segmenata, metoda prostornog ograničavanja i metode veštačke evolucije.

Metoda spajanja rigidnih tela (engl. *rigid body assembly*) koristi šablonsku proteinsku strukturu koja se razlaže na osnovne konzervirane regione, petlje i bočne lance. Zatim se, na osnovu poravnanja sekvenci šablona i ciljnog (target) proteina, sklapaju odgovarajući delovi u celinu. Ovakav pristup koristi SWISS-MODEL program [237].

U metodi poklapanja segmenata (engl. *segment matching*) koristi se skup atomskih položaja dobijenih iz šablonskih struktura kao “vodeće tačke” (okvir), na koje se zatim uklapaju segmenti preuzeti iz baze poznatih struktura. Izbor segmenata se zasniva na sličnosti sekvence, geometriji i proceni energije. Ceo model se generiše korišćenjem vodeće strukture kao osnove na koju se nadovezuju odabrani segmenti [238].

Kod metode prostornih ograničenja (engl. *spatial restraints*) model se formira tako što se, nakon poravnanja šablonske strukture i target sekvence, iz šablona preuzimaju ograničenja definisana dužinama veza, uglovima između veza, diedarskim uglovima i sternim (*van der Waals*-ovim) kontaktnim distancama, koja zatim usmeravaju optimizaciju modela ciljne sekvence. Ovaj pristup koristi MODELLER program [239].

Metoda veštačke evolucije (engl. *artificial evolution*) istovremeno koristi ideju sklapanja konzerviranih delova i postepene “evolutivne” izmene šablonske strukture (uvođenje mutacija, kao i insercija/delecija u skladu sa poravnanjem), sve dok šablon praktično ne postane ekvivalentan target sekvenci [240].

Kada je sličnost sekvenci visoka i poravnanje je pouzdano, različite metode često daju slične rezultate na nivou globalnog proteinskog nabora dok se razlike najčešće vide u varijabilnim regionima, posebno u petljama i kod umetnutih segmenata [232].

4. Modelovanje petlji

Pored α -heliksa i β -ploča, u strukturi proteina su prisutne i petlje. One često imaju ulogu u funkciji (npr. pristup aktivnom mestu, specifičnost interakcija), ali su ujedno i regioni koji su slabije konzervirani i promenljiviji, pa je njihovo predviđanje teže [231].

Najčešće se koriste dva pristupa: pretraga baza (empirijski zasnovana) i pretraga konformacija (*de novo*). Pod pretragom baza podrazumeva se pronalaženje sličnih segmenata u postojećim strukturama. Ova pretraga se vrši za petlje dužine od 4 do 7 rezidua. Pretraga konformacija generiše i ocenjuje konformacije petlje i može se izvesti različitim metodama kao što su *Monte Carlo* simulacija, genetski algoritmi i molekulska dinamika. Vreme računanja obično brzo raste sa dužinom petlje, pa petlje često ostaju problematičniji deo modela i razlog za dodatnu lokalnu optimizaciju [232,233].

5. Modelovanje bočnih lanaca

Bočni lanci se dodaju na već izgrađen skelet korišćenjem rotamerskih biblioteka, funkcije procene energije (engl. *scoring functions*) i pretrage prostora rotamera, jer položaji bočnih lanaca snažno utiču na lokalnu geometriju, polarne kontakte i potencijalne interakcije (npr. protein–ligand ili protein–protein) [232,233].

6. Optimizacija modela

Optimizacija se obično započinje energetsom minimizacijom radi uklanjanja sternih smetnji i očiglednih geometrijskih nepravilnosti. Po potrebi se primenjuje kontrolisana optimizacija (npr. lokalna relaksacija petlji ili bočnih lanaca, kratke simulacije), u zavisnosti od cilja modelovanja. Pri tome je važno izbeći preteranu optimizaciju koja može pogoršati realističnost modela u odnosu na eksperimentalno relevantno stanje [232,233].

7. Validacija modela

Validacija je neophodna pre potencijalne primene modela, jer upotrebljivost direktno zavisi od stereochemijske ispravnosti i fizičke uverljivosti strukture. Standardna kontrola stereochemije obuhvata analizu *Ramachandran*-ovog grafika, koji prikazuje raspored aminokiselina u zavisnosti od njihovih konformacija na osnovu torzionih uglova ϕ i ψ , kao i procenu geometrijskih parametara, pri čemu se često koristi PROCHECK [241]. Za brzu i integrisanu procenu kvaliteta homolognih modela može se koristiti i ERRAT, alat koji procenjuje verovatnoću grešaka u modelu na osnovu statistike nevezivnih (engl. *non-bonded*) interakcija između različitih tipova atoma [242]. Dodatno, globalna i lokalna pouzdanost modela može se proceniti alatima kao što je ProSA-web, koji pomaže u identifikaciji problematičnih regiona pogodnih za doradu [243]. Kombinovanje ovih alata omogućava detekciju grešaka koje najčešće potiču od lošeg poravnanja, nekorektno modelovanih petlji ili pogrešno postavljanih bočnih lanaca [232,233].

1.6.2. Molekulski doking

Molekulski doking predstavlja jednu od najčešće korišćenih računarskih metoda u okviru strukturno zasnovanog dizajna lekova, jer omogućava predviđanje mogućeg načina vezivanja malih molekula za ciljne biomolekule na osnovu njihovih trodimenzionalnih struktura. Njegova primena obuhvata

identifikaciju novih potencijalnih liganada, razumevanje eksperimentalno dobijenih aktivnosti i usmeravanje optimizacije vodećih jedinjenja. Iako rezultati dokinga predstavljaju računarsku aproksimaciju stvarnog načina vezivanja, ova metoda pruža veoma značajan uvid u potencijalne interakcije između liganda i receptora i često služi kao polazna osnova za dalja računarska i eksperimentalna ispitivanja [227,244,245].

Većina doking protokola može se opisati kroz dve funkcionalne celine: pretragu prostora poza/konformacija i scoring funkciju. Pretraga generiše veliki broj kandidatnih poza menjajući translaciju, rotaciju i konformaciju liganda (a ponekad i lokalnu fleksibilnost receptora), dok skor funkcija rangira dobijene poze prema procenjenoj povoljnosti interakcije. Kao kompromis između brzine i tačnosti, moderni algoritmi često kombinuju grublje filtere u ranoj fazi sa naknadnom lokalnom optimizacijom najboljih kandidata [244–246].

Za pretragu poza koriste se dve glavne grupe algoritama - **sistematski pristupi** i **stohastički pristupi** [245].

Sistematske metode pretrage vrše male promene u konformaciji. Ova grupa uključuje algoritme iscrpne pretrage (engl. *exhaustive search*), fragmentacije (engl. *fragmentation*) i udruživanje konformacija (engl. *conformational ensemble*). U ovu grupu spada i pristup primenjen u programu Glide, koji koristi sistematsku pretragu zasnovanu na mreži i hijerarhijsko filtriranje mogućih poza liganda [247]. Njihov nedostatak je mogućnost lociranja unutar lokalnog minimuma. **Stohastičke metode** nasumično modifikuju konformaciju liganda. Ovim je moguće izbeći da program lokalni minimum da kao krajnji rezultat, odnosno veće su šanse pronalaska globalnog minimuma. U ovu grupu spadaju Monte Karlo simulacija, genetski algoritmi (GA) i simulirano kaljenje [245]. GA je jedan od stohastičkih pristupa pretrage koji je pronašao primenu u doking programima kao što su AutoDock i GOLD [248,249]. GA predstavlja računarski algoritam koji simulira principe teorije evolucije i prirodne selekcije pri čemu se može pronaći najbolja konformacija kao i orijentacija liganda u vezujućem mestu.

Scoring funkcije u molekulskom dokingu služe za rangiranje generisanih poza liganda i razlikovanje verovatnih nativnih poza od pogrešnih rešenja, pri čemu je uvek potrebno napraviti kompromis između brzine i tačnosti. Dobijeni skor, u zavisnosti od primenjene funkcije, može odražavati aproksimaciju slobodne energije vezivanja ili relativnu meru afiniteta. Najčešće se dele na **funkcije zasnovane na polju sila** (engl. *force field-based*), **empirijske funkcije** (engl. *empirical*), **funkcije zasnovane na znanju** (engl. *knowledge-based*) i **funkcije zasnovane na mašinskom učenju** (engl. *machine learning-based*) [246,250].

Funkcije zasnovane na polju sila procenjuju vezivanje na osnovu fizičkih energetske komponenti, pre svega elektrostatičkih i *van der Waals*-ovih interakcija; u ovu grupu spada GOLDScore, odnosno scoring funkcija programa GOLD [246,249]. **Empirijske funkcije** sabiraju doprinose kao što su vodonične veze, jonske i hidrofobne interakcije, pri čemu se koeficijenti fituju na eksperimentalno određene afinitete pa njihov skor predstavlja aproksimaciju slobodne energije vezivanja. AutoDock score i Vina score pripadaju ovoj grupi [248,251]. Funkcija GlideScore, implementirana u programu Glide u okviru paketa Schrödinger, obično se smatra hibridnom funkcijom, jer kombinuje elemente funkcija zasnovanih na polju sila i empirijskih funkcija [247]. **Funkcije zasnovane na znanju** zasnivaju se na statistički izvedenim potencijalima iz poznatih struktura kompleksa, dok **funkcije zasnovane na mašinskom učenju** koriste algoritme mašinskog učenja za povezivanje strukturnih deskriptora sa afinitetom vezivanja [246,250]. Često se za rangiranje koristi kombinacija više skorova.

Zbog pojednostavljenog procesa desolvatacije, entropijskih doprinosa i fleksibilnosti receptora, molekulski doking je najčešće pouzdaniji za predikciju vezujuće poze liganda nego za preciznu

kvantifikaciju afiniteta vezivanja. Zbog toga se *docking score* vrednosti mogu koristiti za rangiranje poza istog jedinjenja kao i za preliminarno poređenje jedinjenja u okviru iste ili strukturno bliske serije, ali ih ne treba tumačiti kao direktnu zamenu za eksperimentalno određene afinitete vezivanja [244,245].

Najčešći tip molekulskog dokinga je doking u rigidni receptor, pri čemu se fleksibilnost najčešće eksplicitno razmatra na strani liganda. Međutim, konformacija vezujućeg mesta može zavisiti od liganda, pa zanemarivanje fleksibilnosti receptora može negativno uticati na rezultat. Zbog toga se koriste pristupi koji delimično uključuju fleksibilnost receptora, kao što su selektivna fleksibilnost bočnih lanaca, lokalna relaksacija vezujućeg mesta i doking nad ansamblom konformacija proteina (engl. *ensemble docking*), pri čemu se doking izvodi na više konformacija ciljanog proteina, dobijenih iz različitih kristalnih struktura ili iz molekulске dinamike. Ovi pristupi povećavaju prostor pretrage i računsku složenost, pa ne garantuju uvek bolji ishod, ali mogu biti posebno korisni kod sistema u kojima je izražena indukovana prilagodljivost vezujućeg mesta [244].

Pouzdanost metodologije dokinga u velikoj meri zavisi od izbora odgovarajuće trodimenzionalne strukture proteina, pravilne pripreme sistema i validacije primenjenog protokola. Različite eksperimentalne strukture istog proteina mogu predstavljati različita konformaciona stanja vezujućeg mesta, pa izbor receptora treba uskladiti sa prirodom ispitivanih jedinjenja i ciljem studije. Pri tome je važno voditi računa o tipu ko-kristalisanog liganda i konformacionom stanju koje on stabilizuje, jer različiti ligandi mogu indukovati ili stabilizovati različite položaje bočnih lanaca, petlji ili većih strukturnih elemenata u vezujućem mestu. Kod receptora se to često odnosi na aktivna i neaktivna stanja stabilizovana agonistima ili antagonistima. Pored toga, značajna je i hemijska priroda liganda prisutnog u odabranoj strukturi, pošto strukture ko-kristalisane sa jedinjenjima slične veličine, oblika ili tipa interakcija često predstavljaju pogodniju osnovu za doking hemijski srodnih ispitivanih molekula.

Na rezultate dokinga značajno utiče i pažljiva priprema proteina, što obuhvata pravilno određivanje protonacionih i tautomernih stanja, odgovarajući protokol pripreme kofaktora i metalnih jona, kao i procenu koje molekule vode treba zadržati zbog njihove strukturne ili funkcionalne uloge u vezujućem mestu. Jednako je važna i priprema liganda, pri čemu treba definisati odgovarajući jonizacioni i tautomerni oblik, kao i proveriti stereochemiju ispitivanih struktura. Pravilno definisanje vezujućeg džepa i eventualnih ograničenja vezivanja (engl. *constraints*), kao i validacija celokupnog doking protokola, dodatno utiču na pouzdanost dobijenih rezultata.

Validacija doking protokola se često sprovodi izvođenjem doking postupka liganda preuzetog iz eksperimentalne 3D strukture (engl. *redocking*). Osnovna pretpostavka ovakve validacije jeste da primenjeni protokol može da reprodukuje eksperimentalno utvrđenu pozu ko-kristalisanog liganda i da je rangira među najpovoljnijim rešenjima. Kada je cilj preciznije razlikovanje jedinjenja prema afinitetu, na primer u fazi *hit-to-lead* optimizacije, doking poza se često koristi kao početna hipoteza, nakon čega se mogu primeniti računski zahtevnije metode, poput procena relativnih slobodnih energija dobijenih iz simulacija molekulске dinamike, radi pouzdanije procene relativnog afiniteta [244,252,253].

Uspešnost protokola procenjuje se izračunavanjem korena srednje kvadratne devijacije (engl. *root-mean-square deviation*, RMSD) između predviđene i eksperimentalne (inicijalne) konformacije. RMSD kvantifikuje prostorno odstupanje odgovarajućih atoma u dve konformacije prema sledećoj jednačini:

$$RMSD(a, b) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left((x_{i,a} - x_{i,b})^2 + (y_{i,a} - y_{i,b})^2 + (z_{i,a} - z_{i,b})^2 \right)} \quad (1)$$

gde je n broj odgovarajućih atoma koji se porede, dok x , y i z predstavljaju njihove prostorne koordinate u predviđenoj pozi a i eksperimentalnoj, odnosno referentnoj, pozi b . *RMSD* vrednost manja od približno 2 Å najčešće se koristi kao prag za uspešno reprodukovanje eksperimentalne poze liganda [254].

Primena molekuskog dokinga u razvoju lekova obuhvata predviđanje vezujuće poze liganda, analizu interakcija sa ciljnim mestom, virtuelni skrining i podršku optimizaciji liganada. Doking poza pruža strukturnu hipotezu za racionalne modifikacije liganda, na primer radi povećanja komplementarnosti sa vezujućim mestom, poboljšanja selektivnosti ili podešavanja fizičko-hemijskih svojstava uz očuvanje afiniteta. U virtuelnom skriningu veliki broj jedinjenja se dokuje u ciljnu strukturu, zatim se rangira na osnovu *docking score* vrednosti i dodatnih kriterijuma, nakon čega se izdvaja hemijski raznovrstan podskup za eksperimentalno testiranje. Savremeni trendovi uključuju primenu sve većih biblioteka jedinjenja i kombinovanje dokinga sa dodatnim filterima, kao što su farmakoforni, fizičko-hemijski ili ADMET kriterijumi [244,245].

1.6.3. Molekulska dinamika

U najvećem broju slučajeva tokom vezivanja liganda za biomolekul dolazi do konformacionih promena obe strukture, pa je pri proučavanju njihovih interakcija neophodno uzeti u obzir fleksibilnost formiranog kompleksa. Molekulska dinamika (MD) predstavlja računarsku simulacionu tehniku kojom se prati kretanje atoma i molekula u sistemu kroz vreme pod zadatim uslovima. Osnovni princip metode zasniva se na drugom Njutnovom zakonu, prema kome za atom i važi:

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i \quad (2)$$

gde su m_i masa atoma, r_i njegov položaj, a F_i ukupna sila koja na njega deluje. Sile se dobijaju iz potencijalne energije sistema kao negativni gradijent potencijala,

$$F_i = -\nabla_i V(r) \quad (3)$$

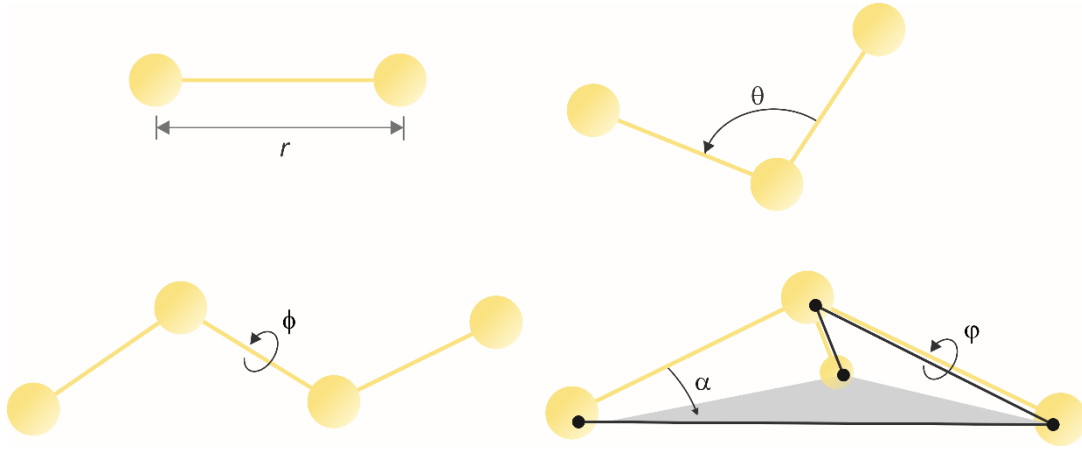
pa je zato definisanje funkcije potencijalne energije ključno za samu simulaciju [255].

U klasičnoj molekulskoj dinamici potencijalna energija sistema opisuje se odgovarajućim poljem sila (engl. *force field*), odnosno skupom matematičkih funkcija i parametara kojima se aproksimiraju vezane i nevezane interakcije u sistemu. U biomolekulskim simulacijama često se koriste porodice polja sila kao što su AMBER i CHARMM, dok se za male molekule i ligande primenjuju generalizovani parametarski skupovi kompatibilni sa tim okruženjima, kao što su GAFF (*General AMBER Force Field*) u okviru AMBER-a i CGenFF (*CHARMM General Force Field*) u okviru CHARMM-a [255–258].

Kao opšti prikaz, ukupna potencijalna energija može se predstaviti kao zbir vezivnih i nevezivnih doprinosa. Vezivni doprinosi obuhvataju istezanje veza, deformaciju uglova i promene diedarskih uglova, dok nevezivni doprinosi uključuju *van der Waals*-ove i elektrostatičke interakcije:

$$\begin{aligned}
V(r) = & \sum_{veze} k_i^{veza} (r_i - r_{0i})^2 + \sum_{uglovi} k_i^{ugao} (\theta_i - \theta_{0i})^2 \\
& + \sum_{diedarski\ ugli} k_i^{diedar} [1 + \cos(n_i \phi_i - \delta_i)] \\
& + \sum_{van\ der\ Waals-ove\ interakcije} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\
& + \sum_{elektrostatske\ interakcije} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}
\end{aligned} \tag{4}$$

U ovom zapisu, r_i i r_{0i} predstavljaju trenutnu i ravnotežnu dužinu veze, θ_i i θ_{0i} trenutnu i ravnotežnu vrednost ugla, a k_i^{veza} i k_i^{ugao} konstante sila za deformaciju veza i uglova. U torzionom članu ϕ_i predstavlja diedarski ugao, k_i^{diedar} amplitudu torzionog potencijala, n_i periodičnost, a δ_i fazni pomak. *Lennard–Jones*-ovom članu, kojim se opisuju *van der Waals*-ove interakcije, ϵ_{ij} predstavlja dubinu potencijalne jame, σ_{ij} karakteristično rastojanje para atoma, a r_{ij} njihovo međusobno rastojanje. U elektrostatičkom članu q_i i q_j su parcijalna naelektrisanja atoma, dok je ϵ_0 permitivnost vakuumu [256].



Slika 1.20. Prikaz vezivnih doprinosa u polju sila. Prilagođeno na osnovu reference [256].

Pošto za veliki broj atoma analitičko rešavanje jednačina kretanja nije moguće, trajektorija sistema dobija se numeričkom integracijom u diskretnim vremenskim koracima Δt . Standardni *Taylor*-ov razvoj za jednu koordinatu x ima oblik

$$x(t + \Delta t) = x(t) + \frac{dx(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2x(t)}{dt^2} \Delta t^2 + \dots \tag{5}$$

$$x(t - \Delta t) = x(t) - \frac{dx(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2x(t)}{dt^2} \Delta t^2 - \dots \tag{6}$$

Sabiranjem ova dva izraza eliminiše se član sa brzinom i dobija se *Verlet*-ova relacija

$$x(t + \Delta t) = 2x(t) - x(t - \Delta t) + a_x(t)\Delta t^2 \tag{7}$$

na kojoj se zasnivaju *simple Verlet*, *leap-frog* i *velocity-Verlet* integratori. Vremenski korak u atomističkim biomolekulskim simulacijama tipično iznosi 1–2 fs, pri čemu je njegoa veličina ograničena najbržim vibracionim modovima sistema. [255,256,259].

Za održavanje zadatih ograničenja dužina veza u molekulskoj dinamici često se koriste algoritmi SHAKE i RATTLE, koji uklanjaju najbrže vibracije sistema i time omogućavaju upotrebu većih vremenskih koraka; SHAKE se odnosi na korekciju položaja, dok RATTLE predstavlja njegovu verziju koja uključuje i korekciju brzina [255,256].

Biomolekulske MD simulacije najčešće se izvode uz primenu periodičnih graničnih uslova (engl. *Periodic Boundary Conditions*, PBC), pri čemu se simulaciona kutija periodično ponavlja u svim pravcima kako bi se sistem bolje aproksimirao uslovima u rastvoru i smanjili površinski efekti. Pri računanju nevezanih interakcija u MD simulacijama koriste se različiti parametri kojima se postiže ravnoteža između tačnosti i računarske efikasnosti. Granična udaljenost odsecanja interakcija (engl. *cut-off*) definiše rastojanje do kojeg se *van der Waals*-ove interakcije, kao i kratkodometni deo elektrostatičkih interakcija, računaju direktno. Funkcija izgladivanja potencijala (engl. *switching function*) omogućava postepeno smanjivanje vrednosti potencijala u definisanom opsegu rastojanja pre dostizanja granične udaljenosti, čime se izbegava nagli prekid interakcija. Lista parova atoma (engl. *pair list*) koristi se radi efikasnijeg računanja nevezanih interakcija i obuhvata parove atoma koji se nalaze unutar unapred definisane udaljenosti, veće ili jednake graničnoj udaljenosti odsecanja. Pored toga, nevezane interakcije između atoma razdvojenih sa tri kovalentne veze, odnosno 1–4 atomskih parova, mogu se posebno tretirati u zavisnosti od primenjenog polja sila [256,260].

Za potpuniji i fizički korektan opis elektrostatičke u periodičnim sistemima standardno se koristi *particle–mesh Ewald* (PME) metod, odnosno njegova glatka varijanta *smooth* PME (SPME). U ovom pristupu elektrostatički potencijal razlaže se na kratkodometni deo koji se računa u realnom prostoru i dugodometni deo koji se računa u recipročnom prostoru pomoću brze Furijeove transformacije (engl. *fast Fourier transform*, FFT) [256,261,262].

MD simulacije se mogu izvoditi u različitim simulacionim ansamblima, uključujući NVE, NVT i NPT ansamble, pri čemu su oznake N, V, E, T i P izvedene iz engleskih termina *number of particles*, *volume*, *energy*, *temperature* i *pressure*, odnosno označavaju broj čestica, zapreminu, energiju, temperaturu i pritisak, koji se u odgovarajućem ansamblu održavaju konstantnim. Kontrola temperature može se ostvariti reskaliranjem brzina, sprežanjem sa spoljnim kupatilom ili primenom *Langevin*-ove dinamike, dok se za kontrolu pritiska koriste različiti barostati, uključujući *Berendsen*-ov i *Langevin–Hoover* pristup [255,256].

Tipičan protokol biomolekulske MD simulacije obuhvata nekoliko uzastopnih faza pripreme i izvođenja sistema. Najpre se sprovodi minimizacija energije, čiji je cilj uklanjanje nepovoljnih sternih kontakata i relaksacija početne geometrije sistema pre početka same simulacije. Nakon toga sledi postepeno zagrevanje sistema do željene temperature, čime se izbegavaju nagle nestabilnosti pri prelasku iz početne strukture u dinamički režim. Sledeća faza je ekvibracija, tokom koje se sistem postepeno prilagođava zadatim uslovima temperature, pritiska i gustine, pri čemu se prati stabilizacija ključnih veličina sistema pre početka analize. Tek nakon toga se izvodi se faza produkcije, iz koje se preuzima trajektorija pogodna za dalju strukturnu, dinamičku i energetska analizu [263–265].

1.6.3.1. Analiza trajektorije molekulske dinamike

Molekulska dinamika omogućava procenu stabilnosti kompleksa ligand–receptor, praćenje ključnih interakcija tokom vremena, analizu konformacionih promena i izdvajanje reprezentativnih stanja sistema. Rezultati molekulske dinamike dobijaju se u obliku trajektorije, što omogućava kvalitativnu i kvantitativnu procenu stabilnosti kompleksa i promena strukture tokom simulacije [266].

U praksi se za evaluaciju MD trajektorije često prate *RMSD* vrednosti različitih komponenti sistema, uz dodatne parametre koji opisuju fleksibilnost i kompaktnost strukture. Ukupna stabilnost i konvergencija sistema najčešće se procenjuju na osnovu *RMSD* vrednosti u odnosu na početnu ili

referentnu strukturu, dok se lokalna fleksibilnost pojedinačnih aminokiselinskih ostataka analizira preko korena srednje kvadratne fluktuacije (engl. *root-mean-square fluctuation*, RMSF). RMSF predstavlja relativno vremensko odstupanje položaja atoma od njihovog prosečnog položaja tokom simulacije, pa veće vrednosti ovog parametra ukazuju na pokretljivije, odnosno fleksibilnije delove sistema; kod proteina se ova analiza najčešće sprovodi nad atomima proteinske kičme ili Ca atomima. Dodatno, poluprečnik žiracije (engl. *Radius of Gyration*, Rg) predstavlja meru kompaktnosti strukture, jer opisuje ponderisanu raspodelu atoma u odnosu na centar mase, pa se može koristiti za praćenje eventualnog zbijanja ili širenja proteinske strukture tokom simulacije [266].

Trajektorija se zatim koristi za praćenje ključnih međumolekulskih interakcija tokom vremena simulacije, identifikaciju aminokiselinskih ostataka koji doprinose stabilizaciji vezanog stanja, analizu promena geometrije vezujućeg mesta, prelaze između alternativnih konformacionih stanja, uočavanje vodom posredovanih interakcija i izdvajanje reprezentativnih konformacija klaster analizom. U kontekstu dizajna lekova, ovakve analize mogu biti korisne za proveru stabilnosti poza dobijenih dokingom i prepoznavanje novih potencijalnih interakcija u vezujućem mestu [266].

Na osnovu ovako dobijenih trajektorija moguće je, pored strukturne analize, pristupiti i proceni termodinamičke povoljnosti vezivanja. Afinitet vezivanja je termodinamički povezan sa slobodnom energijom vezivanja (ΔG_{bind}), pa metode zasnovane na MD nastoje da iz uzorkovanih konformacija i energetskih doprinosa procene ΔG_{bind} ili bar pouzdano rangiraju srodne ligande i komplekse. U poređenju sa molekulskim dokingom, gde scoring funkcije uglavnom daju brzu, pojednostavljenu procenu zasnovanu na ograničenom uzorkovanju i aproksimiranom tretmanu rastvarača i entropije, pristupi zasnovani na molekulskim simulacijama koriste eksplicitnije uzorkovanje i rigorozniji termodinamički okvir, pa se široko primenjuju za predviđanje afiniteta vezivanja [267].

Metode proračuna slobodne energije vezivanja dele se na tri glavne grupe: **metode krajnjeg stanja**, (engl. *endpoint methods*), **alhemijske metode** (engl. *alchemical methods*) i **metode zasnovane na putanji** (engl. *pathway methods*) [268].

U okviru **metoda krajnjeg stanja** kao tipični primeri navode se MM/PBSA i MM/GBSA, koje procenjuju slobodnu energiju na osnovu uzoraka vezanog i nevezanog stanja bez eksplicitnog definisanja transformacije između njih [269].

Alhemijske metode obuhvataju pristupe kao što su slobodna energija perturbacije (engl. *free energy perturbation*, FEP) i termodinamička integracija (engl. *thermodynamic integration*, TI), pri čemu se slobodna energija računa preko niza međustanja definisanih duž alhemijske transformacije [270].

Metode zasnovane na putanji (engl. *pathway methods*) se koriste za ispitivanje vezivanja i odvajanja liganda praćenjem njegovog kretanja duž reakcione koordinate ili putanje difuzije kroz protein. Nakon određivanja takve putanje, profil slobodne energije duž nje može se rekonstruisati primenom metoda pojačanog uzorkovanja, kao što su vođena molekulska dinamika (engl. *steered molecular dynamics*, SMD), metoda „kišobranskog uzorkovanja” (engl. *umbrella sampling*) i metadinamika (engl. *metadynamics*) [271].

Prethodno navedene tri glavne grupe metoda predstavljaju različite kompromise između teorijske rigoroznosti, računskog troška i zahteva u pogledu konvergencije uzorkovanja [267,269].

1.6.3.2. Procena slobodne energije vezivanja MM/PBSA metodom

Kao praktičan pristup za procenu slobodne energije vezivanja na osnovu MD trajektorija često se koriste MM/PBSA i srodna MM/GBSA metoda. Ove metode pripadaju grupi metoda krajnjeg stanja, jer se slobodna energija vezivanja procenjuje iz slobodnih energija krajnjih stanja sistema,

kompleksa, receptora i liganda, bez eksplicitnog praćenja celog alhemijskog ili fizičkog puta prelaza između njih. U tom smislu, MM/PBSA i MM/GBSA po računskoj zahtevnosti i tačnosti zauzimaju međupoložaj između dokinga i rigoroznijih alhemijskih metoda, kao što su FEP i TI [272–274].

MM/PBSA metoda polazi od termodinamičkog ciklusa i aproksimacije da se slobodna energija vezivanja može izraziti kao razlika slobodnih energija kompleksa, receptora i liganda [272,275]:

$$\Delta G_{bind} = G_{kompleks} - G_{receptor} - G_{ligand} \quad (8)$$

pri čemu se energija svakog stanja aproksimira izrazom:

$$\Delta G_{bind} \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} - T\Delta S \quad (9)$$

Molekulsko-mehanički član obuhvata unutrašnje, elektrostatičke i *van der Waals*-ove doprinose:

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{unutrašnje} + \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdW} \quad (10)$$

dok se doprinos solvatacije deli na polarni i nepolarni deo:

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{PB/GB} + \Delta G_{SA} \quad (11)$$

pri čemu se u MM/PBSA pristupu polarni doprinos dobija rešavanjem *Poisson–Boltzmann* jednačine, a nepolarni doprinos se najčešće aproksimira kao funkcija solventom dostupne površine (SASA):

$$\Delta G_{SA} = \gamma \cdot SASA + b \quad (12)$$

Entropijski član $-T\Delta S$ najčešće se procenjuje analizom normalnih oblika vibracija (engl. *normal-mode analysis*, NMA), mada se zbog velikog računskog troška i značajne varijabilnosti u mnogim praktičnim primenama često izostavlja, naročito kada je cilj relativno rangiranje srodnih liganada.

Praktična MM/PBSA procedura najčešće podrazumeva izvođenje MD simulacije protein-ligand kompleksa u eksplicitnom rastvaraču, zatim izdvajanje reprezentativnih konformacija iz trajektorije i naknadno računanje energetske doprinosa pomoću implicitnog modela solvatacije. U često korišćenom tzv. *single-trajectory* pristupu, konfiguracije receptora i liganda dobijaju se iz iste trajektorije kompleksa, bez dodatnih simulacija slobodnog liganda i *apo* proteina, čime se smanjuje šum u rezultatima; pri tome se član $\Delta E_{unutrašnje}$ u velikoj meri poništava između kompleksa, receptora i liganda. Ipak, ovakav pristup podrazumeva da se vezano i nevezano stanje ne razlikuju drastično po konformaciji, pa njegova uspešnost ostaje zavisna od sistema i izabranog protokola [273,275].

Glavne prednosti MM/PBSA metode u okviru SBDD su relativno nizak računski trošak, mogućnost *rescoring*-a dokinga poza i uvid u pojedinačne energetske doprinose. Međutim, rezultati zavise od kvaliteta uzorkovanja, dužine simulacije, izbora dielektrične konstante, modela implicitne solvatacije i načina tretiranja entropije. Zbog toga se MM/PBSA najčešće smatra korisnom metodom srednjeg nivoa za interpretaciju interakcija i relativno rangiranje liganada, dok vrednosti ΔG_{bind} treba tumačiti oprezno i, kada god je moguće, proveriti na poznatom skupu jedinjenja [272,273,276].

1.6.4. Strukturno bazirani virtuelni skrining

Virtuelni skrining (engl. *virtual screening*, VS) predstavlja *in silico* pristup za pretraživanje velikih hemijskih biblioteka sa ciljem identifikacije jedinjenja koja imaju najveću verovatnoću željene biološke aktivnosti. U procesu otkrivanja novih lekova VS se smatra računarskim pandanom

eksperimentalnom visokopropusnom skriningu (engl. *high-throughput screening*, HTS), jer omogućava brzo i efikasno sužavanje velikog hemijskog prostora na manji broj kandidata za dalja biološka i računarska ispitivanja. Uobičajeno se razlikuju dve osnovne strategije: **ligand-bazirani virtuelni skrining (LBVS)** i **strukturno-bazirani virtuelni skrining (SBVS)** [245].

SBVS zasniva se na molekulskom dokingu jedinjenja iz odabrane baze u vezujuće trodimenzionalne strukture ciljanog biomolekula. Na taj način se, pored predviđanja mogućeg načina vezivanja, omogućava i rangiranje jedinjenja, što predstavlja važan kriterijum za izbor kandidata za dalja ispitivanja. Budući da molekulski doking predstavlja centralni korak SBVS postupka, priprema proteina, priprema liganada, definisanje vezujućeg mesta i izbor parametara dokinga zasnivaju se na istim principima kao i kod pojedinačnih doking studija. SBVS se uopšteno sastoji iz sledećih koraka: priprema ciljanog biomolekula, izbor i priprema baze jedinjenja, molekulski doking i analiza dobijenih rezultata. U SBVS studijama često se koriste baze i biblioteke jedinjenja kao što su Enamine (<https://enamine.net/>), Life Chemicals (<https://lifechemicals.com/>), ZINC (<https://zinc.docking.org/>), ChemSpace (<https://chem-space.com/>), ChemDiv (<https://www.chemdiv.com/>), dok se baze kao što su PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) i DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) često koriste za izbor referentnih i poznatih bioaktivnih jedinjenja. Za pripremu struktura liganada i proteina potrebno je uzeti u obzir sve parametre koji se razmatraju i za sam molekulski doking [245].

Za racionalnu procenu kvaliteta SBVS protokola, pre prospektivnog skrininga često se sprovodi retrospektivna validacija VS protokola korišćenjem skupa poznatih aktivnih liganada ciljanog biomolekula, odnosno pravih pozitivnih proba, i skupa mamac-jedinjenja (engl. *decoys*). Mamac-jedinjenja su dizajnirana na osnovu struktura aktivnih jedinjenja. Strukturno su donekle slična aktivnim jedinjenjima po osnovnim fizičko-hemijskim osobinama (npr. molekulska masa, logP, broj donora i akceptora vodonične veze, broj rotabilnih veza i naelektrisanje), ali istovremeno dovoljno strukturno različita da je mala verovatnoća da zaista pokazuju aktivnost. Značaj skupova mamac-jedinjenja je u tome što omogućavaju procenu sposobnosti izabranog ciljanog biomolekula, parametara dokovanja, scoring funkcije i cele SBVS procedure da rangira aktivna jedinjenja u vrhu SBVS rang-liste, umesto da izdvaja molekule samo na osnovu fizičko-hemijskih razlika [277].

Dodatni izazov u SBVS predstavlja činjenica da su proteinski receptori često fleksibilni, pa jedna rigidna struktura ne mora adekvatno opisati sve relevantne oblike vezujućeg mesta. Zbog toga se sve češće primenjuju SBVS pristupi koji uključuju više konformacija receptora, dobijenih iz različitih kristalnih struktura ili iz simulacija molekulске dinamike. Različite tehnike se mogu koristiti za uzorkovanje konformacija iz MD simulacije. Veoma često se vrši klasterovanje trajektorija i korišćenje centroida klastera. U literaturi se može naći više metoda poput linearne diskriminantne analize (engl. *Linear Discriminant Analysis*, LDA) koje se primenjuju radi izbora onih konformacionih stanja koja najbolje razlikuju aktivna jedinjenja od mamaca. Ovakvi SBVS protokoli pokazuju bolje performanse od pristupa zasnovanih na jednoj rigidnoj strukturi receptora, naročito kada fleksibilnost vezujućeg mesta ima važnu ulogu u prepoznavanju liganda [278,279].

1.7. Metode u dizajnu lekova bazirane na strukturi liganada

Dizajn lekova zasnovan na strukturi liganada (engl. *ligand-based drug design*, LBDD) obuhvata pristupe u kojima se novi kandidati za lek dizajniraju i biraju na osnovu informacija o strukturi i aktivnosti poznatih liganada, čak i kada 3D struktura ciljnog proteina nije dostupna ili nije dovoljno pouzdana. Osnovna ideja ovog pristupa jeste da molekuli koji imaju sličnu strukturu, raspodelu ključnih farmakofornih osobina ili srodna fizičko-hemijska svojstva često pokazuju i sličan biološki efekat, pa se iz postojećih *hit* ili *lead* jedinjenja mogu izvoditi zaključci koji omogućavaju dizajn novih analoga, ali i identifikaciju jedinjenja sa novim strukturnim jezgrima (engl. *scaffolds*) odnosno novih hemijskih klasa jedinjenja. Zbog toga je LBDD naročito koristan u ranim fazama otkrivanja

lekova, kada su dostupni podaci o aktivnim jedinjenjima, ali su strukturne informacije o ciljnoj meti ograničene [280–282].

Najčešće metodologije koje se koriste u okviru LBDD obuhvataju kvantitativne odnose strukture i aktivnosti (engl. *quantitative structure–activity relationships*, *QSAR*), kvantitativne odnose strukture i osobina (engl. *quantitative structure–property relationships*, *QSPR*), farmakoforno modelovanje i virtuelni skrining zasnovan na ligandima. QSAR i QSPR pristupi nastoje da uspostave kvantitativnu vezu između strukturnih karakteristika molekula i njihove biološke aktivnosti ili drugih bitnih osobina, dok farmakoforno modelovanje identifikuje prostorni raspored osobina neophodnih za vezivanje i ispoljavanje aktivnosti [280–282]. Virtuelni skrining zasnovan na ligandima omogućava pretragu velikih biblioteka jedinjenja na osnovu sličnosti sa poznatim aktivnim ligandima ili na osnovu usklađenosti sa definisanim farmakofornim modelom [282,283]. U novije vreme, LBDD se sve češće dopunjuje metodama mašinskog i dubokog učenja, koje omogućavaju efikasnije prepoznavanje složenih obrazaca između strukture molekula i njihove aktivnosti [283].

1.7.1. QSAR i QSPR analize

QSAR analize predstavljaju računarske metode kojima se uspostavlja kvantitativna veza između strukturnih karakteristika molekula i njihove biološke aktivnosti. Polazi se od pretpostavke da se promene u hemijskoj strukturi mogu odraziti na promene u intenzitetu biološkog odgovora, tako da se odgovarajućim izborom molekulskih deskriptora i statističkih ili mašinski zasnovanih modela može predvideti aktivnost novih jedinjenja. Zbog toga QSAR zauzima važno mesto u racionalnom dizajnu lekova, naročito u ranim fazama otkrića bioaktivnih molekula, kada je potrebno brzo proceniti veliki broj struktura pre eksperimentalne provere [284].

Sa QSAR pristupom usko je povezano i QSPR modelovanje, koje se zasniva na istoj metodološkoj osnovi, ali se od njega razlikuje po prirodi izlazne promenljive. Dok je kod QSAR modela cilj predviđanje biološke aktivnosti, kod QSPR pristupa modeluju se fizičko-hemijska i druga svojstva jedinjenja, kao što su lipofilnost, rastvorljivost, permeabilnost ili stabilnost [285].

Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*, *OECD*) definisala je smernice za validaciju QSAR modela kako bi se obezbedilo da oni budu naučno utemeljeni, transparentni i prihvatljivi za regulatornu primenu [286]. Prema **OECD smernicama**, QSAR model treba da ispunjava 5 osnovnih zahteva:

1. Definisana izlazna promenljiva

Model mora tačno da navede koje svojstvo predviđa - na primer fizičko-hemijsko, biološko ili ekotoksikološko svojstvo. Važno je da bude jasno šta se meri, u kojim uslovima i kojom metodom, jer ista krajnja tačka može biti određena različitim eksperimentalnim protokolima.

2. Nedvosmislen algoritam

Mora biti jasno kako model dolazi do predikcije. To znači da treba da budu opisani algoritam, deskriptori, softver, verzija softvera, ulazni podaci i eventualna podešavanja, tako da drugi mogu da razumeju i po mogućstvu reprodukuju rezultat.

3. Definisan domen primenljivosti

Model mora da navede za koje supstance i u kom hemijskom/prostornom/deskriptorskom opsegu je pouzdan. Drugim rečima, treba da se zna kada je neka nova supstanca „unutar domena“ modela, a kada je predikcija nesigurnija ili neprimerena.

4. Odgovarajuće mere slaganja, robusnosti i prediktivnosti

Model treba da ima prikazane pokazatelje koji govore koliko dobro opisuje podatke na kojima je razvijen i koliko dobro predviđa osobine novih supstanci, zbog čega se jasno navodi podela podataka na trening i test set podataka (u određenim slučajevima i verifikacioni), kao i eventualni eksterni set za nezavisnu proveru prediktivne moći modela. Ovde spadaju statističke mere performansi, kao i informacije o sastavu i ulozi svakog od navedenih setova podataka.

5. Mehanistička interpretacija, ukoliko je moguća

Poželjno je da model ima naučno smisljeno objašnjenje zašto određene strukturne osobine dovode do određenog efekta. To znači da veza između strukture i aktivnosti ne treba da bude samo statistička, već i hemijski, biološki ili toksikološki opravdana kada je to moguće.

Bez obzira na to da li se primenjuju za QSAR ili QSPR modelovanje, izgradnja pouzdanih modela podrazumeva više međusobno povezanih koraka: prikupljanje eksperimentalnih podataka, reprezentaciju hemijske strukture, izračunavanje molekulskih deskriptora, izbor relevantnih promenljivih, formiranje modela i njegovu internu i eksternu validaciju. Poseban značaj imaju procena robusnosti, prediktivne sposobnosti i domena primenljivosti, jer se vrednost modela ne ogleda samo u dobrom uklapanju postojećih podataka, već i u sposobnosti da pouzdano predviđa ponašanje novih jedinjenja [286,287].

1.7.1.1. Tipovi modela i primenjivani deskriptori

Prema nivou strukturne reprezentacije QSAR modeli se najčešće dele na **2D-QSAR**, **3D-QSAR** i višedimenzionalne pristupe. U 2D-QSAR modelima molekuli se opisuju pomoću deskriptora izvedenih iz dvodimenzionalne strukture, dok 3D-QSAR uključuje trodimenzionalnu organizaciju molekula i prostornu raspodelu osobina relevantnih za aktivnost. Dalji razvoj doveo je do višedimenzionalnih pristupa, uključujući **4D-**, **5D-** i **6D-QSAR**, kojima se nastoje prevazići ograničenja klasičnih 3D-QSAR modela uvođenjem dodatnih nivoa strukturne i interakcione informacije [288,289].

Molekulski deskriptori koji se koriste u QSAR modelima mogu se klasifikovati prema dimenzionalnosti strukturne reprezentacije iz koje se izvode, ali i prema prirodi informacija koje opisuju [290,291]. Prema dimenzionalnosti, najčešće se razlikuju 0D/1D, 2D i 3D deskriptori, dok se u okviru višedimenzionalnih pristupa razmatraju i 4D, 5D i 6D nivoi opisa [289,292,293]. Najjednostavniji 0D i 1D deskriptori obuhvataju konstitucione informacije, kao što su molekulska masa, broj atoma, broj pojedinih elemenata, broj veza i prisustvo funkcionalnih grupa [292,293]. Dvodimenzionalni deskriptori izvedeni su iz molekulskog grafa i obuhvataju, između ostalog, indekse povezanosti, različite topološke indekse i strukturne fragmente, zbog čega predstavljaju osnovu 2D-QSAR pristupa [293,294]. Trodimenzionalni deskriptori zasnivaju se na geometriji molekula i prostornom rasporedu atoma, pa opisuju oblik, zapreminu, površinu, sterne i elektrostatičke karakteristike, kao i druge prostorno zavisne osobine molekula [293]. U literaturi su, pored 2D i 3D deskriptora, opisani i višedimenzionalni nivoi molekulskog opisa, pri čemu su 4D deskriptori najjasnije definisani. Oni se zasnivaju na učestalosti pojavljivanja različitih tipova atoma u određenim delovima prostora kroz ansambl konformacija molekula, pa pored prostorne organizacije obuhvataju i njegovu konformacionu fleksibilnost. Zbog toga 4D deskriptori predstavljaju proširenje 3D opisa sa jedne reprezentativne konformacije na skup mogućih trodimenzionalnih rasporeda molekula [295].

Pored podele prema dimenzionalnosti, molekulski deskriptori mogu se klasifikovati i prema prirodi informacija koje opisuju. U toj podeli najčešće se izdvajaju konstitucionni, topološki, geometrijski, elektronski, kvantnohemijski i termodinamički deskriptori [290,296,297]. **Konstitucionni deskriptori** izražavaju osnovni sastav molekula i obuhvataju jednostavne numeričke pokazatelje, kao što su molekulska masa, broj atoma, broj veza, broj heteroatoma i broj prstenova [292]. **Topološki deskriptori** opisuju način na koji su atomi međusobno povezani i kodiraju informacije o veličini molekula, obliku, grananju, prisustvu heteroatoma i višestrukih veza. Tipični primeri su *Wiener*-ov i *Randić*ev indeks, kao i *Kier–Hall*-ovi indeksi povezanosti [296,298]. U širem smislu, u 2D topološke deskriptore mogu se svrstati i deskriptori atomskih parova, jer počivaju na najkraćim topološkim udaljenostima između parova atoma; u praktičnim taksonomijama oni se često vode kao posebna podgrupa 2D atomskih parova, pri čemu B deskriptori označavaju prisustvo/odsustvo, a F deskriptori učestalost datog para atoma na zadatoj topološkoj udaljenosti [299]. CATS deskriptori mogu biti 2D, ali i 3D topološko-farmakoforni deskriptori, jer opisuju parove farmakofornih tipova na definisanim topološkim udaljenostima [300]. **Geometrijski deskriptori** polaze od trodimenzionalne strukture molekula; u ovu grupu spadaju, RDF [301], 3D-MoRSE [302], WHIM [303] i GETAWAY [304] deskriptori. **Elektronski deskriptori** opisuju raspodelu naboja i parametre elektronske strukture, kao što su parcijalna atomska naelektrisanja, dipolni moment, polarizabilnost, a uključuju i kvantnohemijske deskriptore kao što su energije HOMO i LUMO orbitala, ukupna energija i ukupna elektronska energija molekula [305]. **Termodinamički deskriptori** obuhvataju energetske i entropijske parametre, kao što su standardne entalpije isparavanja, sublimacije i solvatacije, entropija topljenja, kao i vibraciona, rotaciona i translaciona entropija i toplotni kapacitet [306].

1.7.1.2. 3D-QSAR modeli zasnovani na poljima molekulskih interakcija

Posebnu podgrupu 3D deskriptora i 3D-QSAR pristupa čine metode zasnovane na **poljima molekulskih interakcija** (engl. *Molecular Interaction Fields*, MIFs), koje opisuju raspodelu interakcione energije između jedinjenja, odnosno njegovih funkcionalnih grupa, i odgovarajuće hemijske probe postavljene u trodimenzionalnu mrežu oko molekula. U ovim pristupima polazi se od pretpostavke da biološka aktivnost ne zavisi samo od opšteg oblika i sastava molekula, već i od prostornog rasporeda regiona pogodnih za sterne, elektrostatičke, hidrofobne i vodonično-vezujuće interakcije. MIF-ovi imaju veoma važnu ulogu u opisivanju sposobnosti liganda da stupi u interakciju sa makromolekulima, poput receptora ili enzima. Na ovaj način je moguće identifikovati regione prostora koji su povoljni za određene tipove intermolekulskih interakcija, pri čemu probe predstavljaju fizičkohemijske osobine zamišljenog vezujućeg mesta ispitivanog liganda [307,308].

Za analizu MIF-ova najčešće se koriste četiri vrste hemijskih proba. **TIP proba** opisuje sterne interakcije i daje informaciju o obliku jedinjenja, **DRY proba** karakteriše hidrofobne interakcije, **N1 proba** identifikuje regione pogodne za interakciju sa donorima vodonične veze, odnosno ukazuje na prisustvo akceptorskih centara u molekulu, dok **O proba** opisuje regione pogodne za interakciju sa akceptorima vodonične veze, odnosno ukazuje na prisustvo donorskih centara [308,309].

Računanje MIF interakcija zasniva se na primeni *Lennard–Jones*-ovog i *Coulomb*-ovog potencijala, pri čemu se u pojednostavljenom prikazu interakcioni potencijal može predstaviti jednačinom:

$$E = E_{VDW} + E_{EL} + E_{HB} + S \quad (13)$$

gde E_{VDW} označava *van der Waals*-ovu energiju, E_{EL} elektrostatičku energiju, E_{HB} energiju vodonične veze, dok se parametar S odnosi na entropijski doprinos sistemu. Na taj način MIF-ovi pružaju detaljan trodimenzionalni opis regiona molekula koji mogu učestvovati u različitim tipovima nekovalentnih interakcija [308].

Na konceptu molekulskih polja zasnivaju se klasične 3D-QSAR metode zavisne od poravnanja molekula (engl. *alignment-dependent*), među kojima su najpoznatije **CoMFA** (engl. *Comparative Molecular Field Analysis*) i **CoMSIA** (engl. *Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*). U CoMFA pristupu, nakon prostornog poravnanja molekula, analiziraju se sterna i elektrostatička polja oko zajedničkog skeleta, pri čemu se korelacija između raspodele tih polja i biološke aktivnosti koristi za konstrukciju prediktivnog modela. CoMSIA zadržava osnovni princip trodimenzionalnog poređenja liganada, ali umesto direktne upotrebe klasičnih polja koristi indekse sličnosti i može obuhvatiti sterna, elektrostatička, hidrofobna i vodonično-vezujuća svojstva. Obe metode predstavljaju tipične 3D-QSAR pristupe u kojima deskriptorski prostor proizlazi iz prostorne raspodele interakcionih osobina molekula, a ne samo iz njegove 2D povezanosti [310,311].

Za razliku od ovih pristupa zavisnih od poravnanja, posebno mesto među 3D deskriptorima zasnovanim na molekulskim poljima zauzimaju **GRIND** (engl. *GRid-INdependent Descriptors*) deskriptori, razvijeni kao 3D deskriptori nezavisni od poravnanja (engl. *alignment-independent*) izvedeni iz molekulskih interakcionih polja. U originalnoj metodologiji, predstavljenoj uz program **ALMOND**, GRIND se dobijaju kroz računanje MIF-ova, izdvajanje relevantnih regiona iz svakog polja i kodiranje njihovih međusobnih prostornih odnosa u obliku korelograma [312]. Osnovu GRIND deskriptora čine parovi odabranih MIF čvorova, odnosno karakterističnih interakcionih regiona izdvojenih iz istih ili različitih tipova polja, pri čemu jedan GRIND deskriptor opisuje određeni par polja i njihovu međusobnu udaljenost u definisanom intervalu. Drugim rečima, GRIND deskriptori kvantifikuju rastojanje između parova regiona značajnih za sterne, hidrofobne, elektrostatičke ili vodonično-vezujuće interakcije, čime se trodimenzionalna informacija iz MIF-ova prevodi u numerički oblik pogodan za QSAR modelovanje. U originalnoj verziji kodiranje se vrši postupkom **maksimalne auto- i unakrsne korelacije** (engl. *maximum auto- and cross-correlation, MACC, odnosno MACC-2*), pri čemu se za svaki interval udaljenosti zadržava najveći proizvod energija odgovarajućeg para čvorova, a rezultati se prikazuju u obliku auto- i cross-korelograma [312,313].

Kasnije je razvijena unapređena varijanta ovih deskriptora, označena kao **GRIND-2**, koja zadržava osnovni princip GRIND pristupa, ali uvodi poboljšanja u diskretizaciji MIF-ova i praktičnoj primeni na velike i strukturno heterogene skupove jedinjenja. Ključna novina u tom kontekstu jeste primena algoritma **AMANDA** za izdvajanje regiona najpovoljnijih interakcija iz MIF-ova (engl. *hot spots*). Za razliku od originalnog ALMOND algoritma, u kojem se iz svakog polja izdvaja unapred definisan broj čvorova optimizacijom koja kombinuje intenzitet polja i međusobne udaljenosti, AMANDA koristi energetske prefiltriranje i zatim bira promenljiv broj reprezentativnih tačaka u zavisnosti od lokalnih karakteristika polja. Takav pristup je brži, ne zahteva ručno prilagođavanje parametara za svaku seriju jedinjenja i pogodniji je za nesupervizovanu obradu velikih i hemijski raznorodnih skupova, a u objavljenim poređenjima daje deskriptore slične GRIND deskriptorima ili nešto bolje prediktivne sposobnosti od originalnog postupka [313,314].

Na nivou kodiranja prostornih odnosa, originalni MACC pristup može dovesti do toga da ista varijabla u različitim molekulima predstavlja različite parove reprezentativnih MIF tačaka, što može otežati interpretaciju modela. Kao odgovor na to predložen je algoritam **konzistentno visokih auto- i unakrsnih korelacija** (engl. *Consistently Large Auto and Cross Correlation, CLACC*), koji zadržava korelogramsku logiku GRIND pristupa, ali uvodi izbor parova MIF-ova i njihovo usklađivanje, kako bi ista varijabla kroz celu seriju što doslednije predstavljala isti par farmakofornih karakteristika na sličnom međusobnom rastojanju [313,315]. Zbog toga su GRIND, a posebno GRIND-2, naročito korisni kod strukturno heterogenih liganada i u situacijama kada je poželjno sačuvati mehanistički interpretabilan 3D opis, a istovremeno izbeći ograničenja klasičnih metoda zavisnih od poravnanja.

1.7.2. Metode mašinskog učenja u QSAR i QSPR analizi

U savremenoj QSAR i QSPR analizi sve značajniju ulogu imaju metode mašinskog učenja, jer omogućavaju modelovanje složenih, često nelinearnih odnosa između molekulskih deskriptora i ispitivanog odgovora jedinjenja [308,309]. Dok se QSAR fokusira na biološke aktivnosti, kao što su K_d , K_i , IC_{50} i ED_{50} , kao i na binarne klasifikacije poput aktivno/neaktivno, QSPR obuhvata hemijska ili fizička svojstva jedinjenja, uključujući tačku topljenja, pritisak pare, pK_a , $\log P$ i druga svojstva [310]. U osnovi, nadgledani modeli mašinskog učenja koji se koriste u ovim analizama mogu se formulisati kao klasifikacioni ili regresioni. Klasifikacioni modeli koriste se kada je cilj razvrstavanje jedinjenja u diskretne kategorije, na primer na aktivna i neaktivna, toksična i netoksična ili permeabilna i nepermeabilna. Nasuprot tome, regresioni modeli služe za predviđanje kontinuiranih numeričkih vrednosti, kao što su IC_{50}/K_i , odnosno njihove negativne logaritamske transformacije pIC_{50}/pK_i , kao i $\log P$ i druga fizičko-hemijska, farmakokinetička ili toksikološka svojstva. Među često primenjivanim algoritmima u heminformatici lekova nalaze se višestruka linearna regresija (engl. *multiple linear regression*, MLR), metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (engl. *partial least squares regression*, PLS), slučajna šuma (engl. *random forest*, RF), metoda potpornih vektora (engl. *support vector machine*, SVM), odnosno regresija potpornih vektora (engl. *support vector regression*, SVR), metoda k najbližih suseda (engl. *k-nearest neighbors*, k-NN), veštačke neuronske mreže (engl. *artificial neural networks*, ANN) i savremeni pristupi dubokog učenja (engl. *deep learning*, DL) [197,316,317]. Kod mnogih metoda mašinskog učenja važan korak predstavlja podešavanje hiperparametara, odnosno unapred zadatih parametara modela i postupka treniranja koji nisu naučeni direktno iz podataka, već određuju šta i kako model može da nauči i utiču na njegove performanse i sposobnost generalizacije [318].

1.7.2.1. *Višestruka linearna regresija*

Višestruka linearna regresija (MLR) predstavlja jednu od osnovnih statističkih metoda za modelovanje odnosa između jedne kontinuirane zavisne promenljive i većeg broja nezavisnih promenljivih, pri čemu se pretpostavlja da je ta veza linearna u odnosu na parametre modela [319]. Opšti oblik modela može se predstaviti jednačinom:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_pX_p + \varepsilon \quad (14)$$

gde je Y zavisna promenljiva, $X_1, X_2, \dots, X_p$ skup nezavisnih promenljivih, odnosno molekulskih deskriptora, b_0 odsečak na ordinati, $b_1, b_2, \dots, b_p$ regresioni koeficijenti, a ε slučajna greška modela. Parametri modela najčešće se procenjuju metodom najmanjih kvadrata, minimizacijom odstupanja između eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti [319]. Zbog jednostavnosti i dobre interpretabilnosti, MLR je jedna od klasičnih metoda u QSAR/QSPR analizama, naročito kada se želi uspostaviti jasna matematička veza između strukturnih deskriptora i biološke aktivnosti ili fizičko-hemijskih svojstava jedinjenja [320,321].

Pri izgradnji MLR modela poseban značaj ima izbor odgovarajućeg podskupa deskriptora, jer prevelik broj promenljivih može dovesti do prenaučenosti, nestabilnosti modela i problema multikolinearnosti [320,322]. Zbog toga se često primenjuju postupci selekcije promenljivih, kao što su **postupno uključivanje promenljivih** (engl. *forward selection*), **postupno isključivanje promenljivih** (engl. *backward elimination*) i **kombinovana postupna selekcija promenljivih** (engl. *stepwise regression*). Kod *forward* postupka model se započinje bez prediktora, a zatim se promenljive uvode jedna po jedna prema kriterijumu najvećeg poboljšanja modela. Kod *backward* postupka polazi se od početnog modela u koji su uključene sve promenljive, nakon čega se najmanje značajne promenljive sukcesivno uklanjaju. *Stepwise* regresija predstavlja kombinovani pristup, pri kojem se promenljive postepeno uključuju, ali se u svakom koraku istovremeno proverava da li neka od prethodno uključenih promenljivih više ne ispunjava kriterijum za zadržavanje u modelu. Izbor i

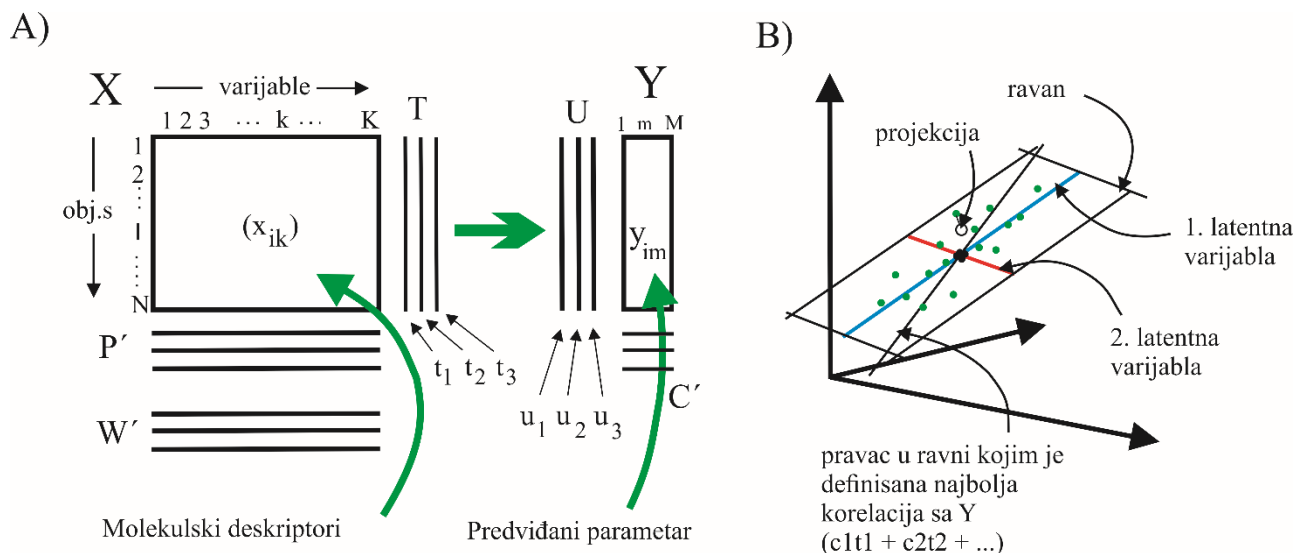
zadržavanje deskriptora u ovim postupcima najčešće se regulišu statističkim parametrima za ulazak i izbacivanje promenljivih iz modela, obično zasnovanim na **F-testu** ili **p-vrednosti**. Na taj način se obezbeđuje da u konačnom modelu ostanu samo oni deskriptori koji značajno doprinose objašnjenju posmatrane zavisne promenljive [322,323]. Pored sekvencijalnih postupaka, u selekciji deskriptora često se koriste i heurističke optimizacione metode, kao što su genetski algoritmi, koje omogućavaju pretraživanje velikog broja mogućih kombinacija promenljivih i identifikaciju podskupova deskriptora sa najboljim prediktivnim performansama [322,324].

Iako savremenije metode mogu uspešnije opisivati složene nelinearne odnose, MLR i dalje ima važnu ulogu kao jednostavan, transparentan i interpretabilan početni ili referentni model u QSAR/QSPR analizama [320,321].

1.7.2.2. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata

Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) predstavlja linearni multivarijantni pristup za modelovanje odnosa između matrice prediktora X i matrice odgovora Y (Slika 1.21A). Posebno je pogodna kada skup podataka sadrži veliki broj prediktora, kada su oni međusobno korelisani ili kada broj prediktora prevazilazi broj posmatranja [325–327]. Zbog toga je PLS postala standardni alat u hemometriji, a značajno mesto ima i u QSAR/QSPR analizama [325,328].

Osnovna ideja PLS metode jeste da se originalni deskriptori ne koriste direktno u regresiji, već da se iz njih konstruiše manji broj **latentnih promenljivih**, odnosno **komponenti**. Latentne promenljive predstavljaju izvedene promenljive koje sažimaju informaciju sadržanu u originalnim prediktorima i služe za opisivanje odnosa između matrica X i Y . U tom smislu, PLS traži takve komponente koje imaju dobru prediktivnu vezu sa odgovorom Y , a ne samo da opisuju strukturu matrice prediktora (Slika 1.21B) [325,327].



Slika 1.21. Organizacija podataka u PLS modelu: A) matrica X sadrži prediktorske promenljive, odnosno deskriptore hemijske strukture, dok matrica Y sadrži zavisne promenljive, kao što su biološka aktivnost ili drugo ispitivano svojstvo; B) podaci iz matrice X mogu se predstaviti kao skup tačaka u višedimenzionalnom prostoru, koje se projektuju na manji broj latentnih promenljivih. Prilagođeno na osnovu reference [325].

Na nivou modela to znači da se i matrica prediktora i matrica odgovora opisuju pomoću manjeg broja latentnih komponenti i rezidualnog, neobjašnjenog dela. Za razliku od pristupa koji komponente biraju samo prema varijansi matrice X , poput analize glavnih komponenti (engl. *Principal*

Component Analysis, PCA), kod PLS-a komponente se određuju tako da opisuju zajedničku strukturu, odnosno odnos između X i Y [325,327].

PLS se može posmatrati kao linearni regresioni model zasnovan na transformisanim, sažetim promenljivama umesto na originalnim deskriptorima. Na taj način problem velikog broja i međusobne korelacije prediktora prevazilazi se projekcijom podataka u prostor manjeg broja komponenti, nakon čega se na tim komponentama uspostavlja regresioni odnos sa odgovorom. Upravo zato je PLS posebno korisna u situacijama u kojima klasična višestruka linearna regresija postaje nepouzdana [325,327].

Broj latentnih promenljivih predstavlja jedan od ključnih parametara PLS modela. Premali broj može dovesti do nedovoljnog opisa odnosa između prediktora i odgovora, dok prevelik broj povećava rizik od preteranog prilagođavanja modela podacima. Zbog toga se njihov broj u praksi određuje validacijom (najčešće unakrsnom), a u QSAR/QSPR studijama naglašava se i potreba za pažljivom procenom performansi PLS modela [325,328].

U odnosu na višestruku linearnu regresiju, prednost PLS metode jeste u tome što može efikasno da se primeni na skupove podataka sa izraženom multikolinearnošću, velikim brojem prediktora i, po potrebi, sa više odgovornih promenljivih. Zbog toga se PLS široko koristi u hemometriji, analitičkoj hemiji i QSAR/QSPR modelovanju [325,327,328].

1.7.2.3. Veštačke neuronske mreže

Veštačke neuronske mreže (ANN) predstavljaju modele mašinskog učenja koji se mogu koristiti i za klasifikaciono i za regresiono modelovanje. Njihov značaj u QSAR/QSPR analizama proističe iz sposobnosti da modeluju složene i nelinearne odnose između molekulskih deskriptora i posmatranog odgovora [329,330].

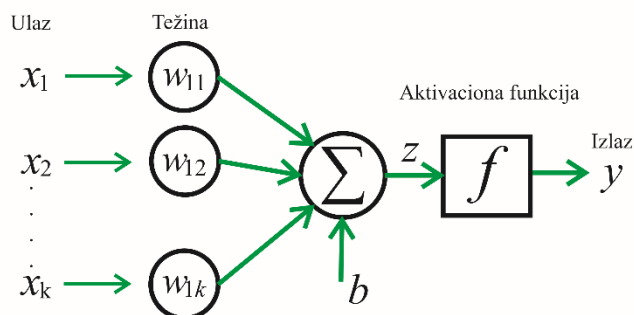
Osnovnu računsku jedinicu ANN modela predstavlja veštački neuron, koji ulazne vrednosti kombinuje pomoću težina i slobodnog člana, a zatim rezultat transformiše aktivacionom funkcijom [262]. To se može prikazati izrazima:

$$z = \sum_{i=1}^n w_i x_i + b \quad (15)$$

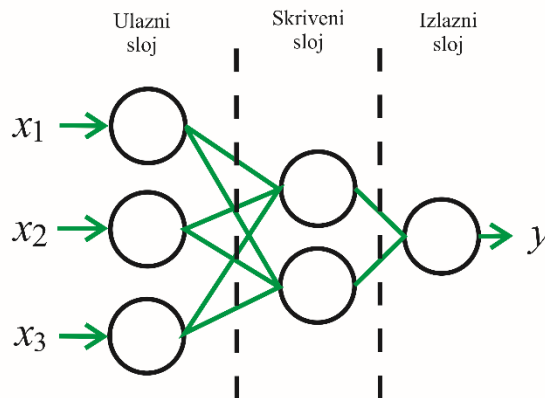
$$y = f(z) \quad (16)$$

gde su x_i ulazne promenljive, w_i težine, b slobodni član (engl. *bias*), f aktivaciona funkcija, a y izlaz neurona. *Bias* se može posmatrati kao dodatni neuron čija je aktivacija stalno jednaka ± 1 , čime se omogućava pomeranje aktivacije i veća fleksibilnost modela [332]. Na ovaj način neuron formira ponderisanu sumu ulaznih signala, koja se zatim transformiše aktivacionom funkcijom i prosleđuje ka narednom sloju mreže (Slika 1.22A). Na nivou arhitekture, ANN se najčešće sastoji od ulaznog sloja, jednog ili više skrivenih slojeva i izlaznog sloja. Ulazni sloj prima deskriptore ili druge ulazne promenljive, skriveni slojevi vrše njihovu nelinearnu transformaciju, dok izlazni sloj daje konačnu predikciju, odnosno klasu ili numeričku vrednost odgovora (Slika 1.22B).

A)



B)



Slika 1.22. Šematski prikaz osnovnih elemenata veštačke neuronske mreže: A) model veštačkog neurona, u kojem se ulazne promenljive ponderišu odgovarajućim težinama, sabiraju sa *bias* članom, a zatim transformišu aktivacionom funkcijom dajući izlaz; B) primer višeslojne veštačke neuronske mreže sa ulaznim, skrivenim i izlaznim slojem.

Neke od češće korišćenih aktivacionih funkcija su:

$$f(x) = \begin{cases} x & \text{identitetska funkcija, raspon: } (-\infty, +\infty) \\ \frac{1}{1 + e^{-x}} & \text{logistička sigmoidna funkcija, raspon: } (0,1) \\ \frac{e^x - e^{-x}}{e^x + e^{-x}} & \text{hiperbolička tangentna funkcija, raspon: } (-1, +1) \\ e^{-x} & \text{eksponencijalna funkcija, raspon: } (0, +\infty) \\ \sin(x) & \text{sinusna funkcija, raspon: } [0,1] \\ \left(\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}}\right) e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} & \text{Gausova funkcija} \end{cases} \quad (17)$$

U QSAR/QSPR modelovanju najčešće se koriste mreže sa **više slojeva perceptrona** (engl. *Multilayer Perceptron, MLP*) i **mreže radijalnih baznih funkcija** (engl. *Radial Basis Function, RBF*). **Duboke neuronske mreže** (engl. *Deep Neural Network, DNN*) predstavljaju proširenje ovog pristupa i obuhvataju arhitekture sa više skrivenih slojeva. U QSAR studijama dugo su preovlađivale tzv. „plitke” mreže sa jednim skrivenim slojem, dok duboke mreže postaju važnije sa rastom dostupnih skupova podataka i računarskih mogućnosti [262–264].

Kada su skupovi podataka mali, jednostavniji ili plitki modeli često pokazuju stabilnije performanse, dok duboke neuronske mreže postaju konkurentnije na većim skupovima podataka, gde mogu bolje da iskoriste složenije obrasce u podacima. Zbog toga izbor između plitkih i dubokih mreža zavisi ne samo od prirode problema, već i od veličine i raznovrsnosti korišćenog seta podataka [264,265].

Glavne prednosti neuronskih mreža u QSAR/QSPR analizama su velika fleksibilnost, sposobnost modelovanja izraženih nelinearnosti i dobra prediktivna moć kada su dostupni odgovarajući podaci. Sa druge strane, njihove glavne mane su slabija interpretabilnost u poređenju sa linearnim modelima, osetljivost na izbor arhitekture i potreba za pažljivom optimizacijom i validacijom modela. U praksi se performanse modela podešavaju izborom **arhitekture** i **hiperparametara** kao što su **broj skrivenih slojeva**, **broj neurona u skrivenim slojevima**, izbor **aktivacione funkcije**, **stopa učenja**, **broj epoha** i **parametri regularizacije** [263,264,266].

1.7.2.4. Potporna vektorska regresija

Metoda potpornih vektora (engl. *support vector machine*, SVM) predstavlja nadgledanu metodu mašinskog učenja koja je prvobitno razvijena za klasifikacione zadatke, dok se za regresione probleme koristi njena modifikacija poznata kao potporna vektorska regresija (engl. *support vector regression*, SVR) [335,336]. U QSAR/QSPR analizama SVM i SVR imaju značajnu primenu, jer omogućavaju modelovanje složenih odnosa između molekulskih deskriptora i ispitivanog odgovora, uključujući i nelinearne zavisnosti [336–338].

Kod regresione varijante, odnosno SVR, cilj je da se pronađe funkcija koja što bolje aproksimira eksperimentalne vrednosti, a da pri tome ostane što jednostavnija, odnosno što „ravnija” u prostoru karakteristika (engl. *feature space*). U slučaju ε -SVR pristupa, standardni optimizacioni problem može se zapisati na sledeći način [336,339]:

$$\min \frac{1}{2} w^T w + C \sum_{i=1}^N (\zeta_i + \zeta_i^*) \quad (18)$$

uz ograničenja:

$$y_i - (w^T \Phi(x_i) + b) \leq \varepsilon + \zeta_i \quad (19)$$

$$(w^T \Phi(x_i) + b) - y_i \leq \varepsilon + \zeta_i^* \quad (20)$$

$$\zeta_i, \zeta_i^* \geq 0 \quad (21)$$

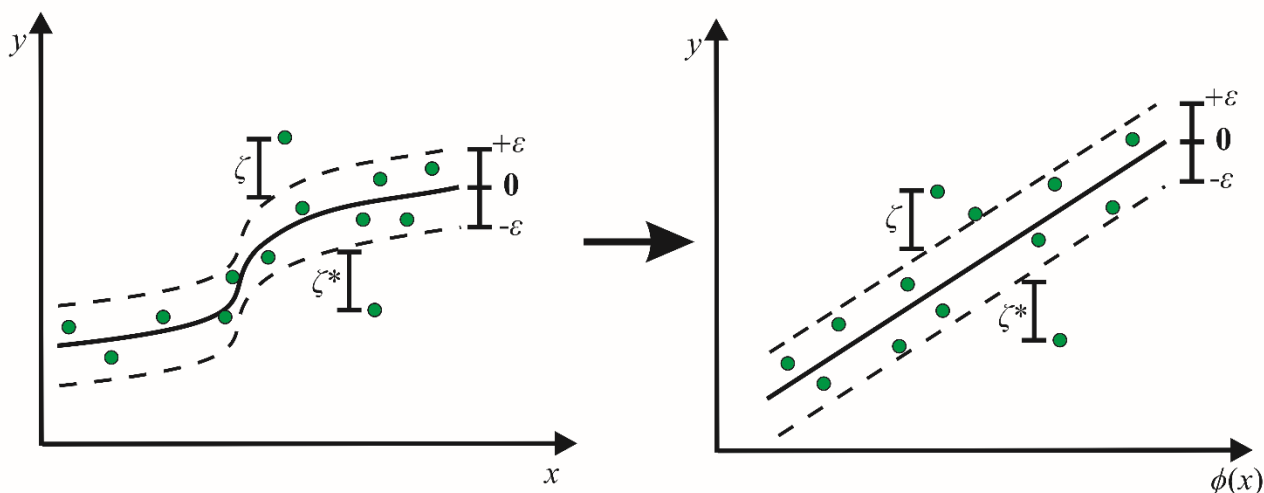
gde član $\frac{1}{2} w^T w$ predstavlja meru složenosti modela, dok drugi deo izraza opisuje ukupnu kaznu za odstupanja. **Parametar C** , odnosno **parametar regularizacije** (engl. *regularization parameter; cost/penalty parameter*) određuje kompromis između tačnosti i jednostavnosti modela, odnosno „kaznu” za tačke koje izlaze iz dozvoljene zone greške. **Parametar ε** , odnosno **širina ε -zona tolerancije** (engl. *epsilon parameter/ε-insensitive tube width*), definiše širinu zone u kojoj se odstupanja ne penalizuju, dok promenljive ζ_i i ζ_i^* predstavljaju odstupanja izvan te zone. Potporni vektori (engl. *support vectors*) predstavljaju one uzorke koji imaju doprinos konačnoj regresionoj funkciji; u ε -SVR modelu to su, praktično, tačke koje leže na granici ε -zone ili se nalaze izvan nje, dok tačke unutar ε -zone najčešće ne doprinose modelu direktno.

Pored ε -SVR pristupa, koristi se i ν -SVR varijanta. Kod nje se širina ε -zone ne zadaje unapred direktno, već se uvodi parametar ν (engl. *nu parameter*), kojim se kontroliše ponašanje modela u pogledu broja potpornih vektora i dozvoljenih odstupanja. Preciznije, ν predstavlja gornju granicu udela grešaka i donju granicu udela potpornih vektora, a ujedno omogućava da se širina cevi tolerancije prilagodi samim podacima [336,339].

Za opisivanje nelinearnih odnosa u SVM/SVR modelima se koriste **funkcije jezgra** (engl. *kernel functions*), koje omogućavaju implicitno preslikavanje podataka u prostor obeležja više dimenzionalnosti, bez eksplicitnog računanja koordinata u tom prostoru [336,337]. U opštem obliku, funkcija jezgra može se zapisati kao:

$$K(x_i, x_j) = \phi(x_i) \cdot \phi(x_j) \quad (22)$$

U ovoj formuli x_i i x_j označavaju dva objekta predstavljena vektorima deskriptora, $\phi(x)$ njihovo preslikavanje u prostor obeležja, a $K(x_i, x_j)$ skalarni proizvod preslikanih vektora, odnosno meru njihove sličnosti u tom prostoru (Slika 1.23) [336].



Slika 1.23. Šematski prikaz SVR modela - nelinearni odnos u originalnom prostoru preslikava se funkcijom jezgra u prostor obeležja $\phi(x)$, gde se modeluje linearnom regresionom funkcijom; isprekidane linije označavaju ε -zonu, dok ζ_i i ζ_i^* predstavljaju odstupanja tačaka izvan dozvoljene granice greške.

Najčešće korišćene funkcije jezgra su [336,339,340]:

$$K(x_i, x_j) = \begin{cases} x_i \cdot x_j & \text{linearna funkcija jezgra} \\ (\gamma x_i \cdot x_j + r)^d & \text{polinomijalna funkcija jezgra} \\ \exp(-\gamma |x_i - x_j|^2) & \text{RBF funkcija jezgra} \\ \tanh(\gamma x_i \cdot x_j + r) & \text{sigmoidna funkcija jezgra} \end{cases} \quad (23)$$

Ovde γ predstavlja **parametar jezgra** (engl. *Gamma parameter, kernel coefficient*) i određuje osetljivost funkcije jezgra na međusobne razlike između uzoraka, r je konstanta pomeraja, a d stepen polinoma.

Najvažniji hiperparametri pri optimizaciji SVR modela uključuju parametar C , parametar ε kod ε -SVR modela, odnosno parametar ν kod ν -SVR modela, kao i parametre izabrane funkcije jezgra. Pri upotrebi RBF funkcije jezgra naročito je važan parametar γ , dok su kod polinomijalne funkcije jezgra značajni γ , r i d . Izbor funkcije jezgra i vrednosti hiperparametara značajno utiče na performanse modela, pa se oni u praksi određuju na osnovu validacionih rezultata [336,339].

Iako SVR omogućava efikasno modelovanje složenih i nelinearnih odnosa i može dati dobre prediktivne performanse i u uslovima visokodimenzionalnih podataka i relativno malih uzoraka, kvalitet modela zavisi od adekvatne optimizacije hiperparametara i može biti osetljiv na sastav trening seta. Dodatno, mehanistička interpretacija SVR modela najčešće nije neposredna, pošto je doprinos pojedinačnih deskriptora obično teško protumačiti, zbog čega se ovaj pristup ubraja u slabije interpretabilne metode [335,336].

1.7.3. Validacija

Četvrto pravilo OECD smernica uključuje i ekstenzivnu validaciju kreiranih modela. Za procenu prediktivnosti modela koriste se različite statističke metrike, uključujući R^2 za trening set, Q^2 i koren srednje kvadratne greške procene (engl. *Root Mean Square Error of Estimation, RMSEE*) [341]. Sledeće jednačine koriste se za njihovo izračunavanje:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{eksp(trening)} - Y_{pred(trening)})^2}{\sum(Y_{eksp(trening)} - \bar{Y}_{trening})^2} \quad (24)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{eksp(trening)} - Y_{pred(cv-trening)})^2}{\sum(Y_{eksp(trening)} - \bar{Y}_{trening})^2} \quad (25)$$

$$RMSEE = \sqrt{\frac{\sum(Y_{eksp(trening)} - Y_{pred(trening)})^2}{n_{trening}}} \quad (26)$$

gde su $Y_{eksp(trening)}$, $Y_{eksp(trening)}$ i $\bar{Y}_{trening}$ redom eksperimentalne, predviđene i srednje predviđene vrednosti ispitivane aktivnosti ili osobine trening seta jedinjenja.

Q^2 i $Y_{pred(cv-trening)}$ predstavljaju parametre unakrsne validacije (engl. *Cross Validation*, CV). CV predstavlja postupak interne validacije u kome se početni trening skup deli na deo za izgradnju modela i validacioni podskup. U svakoj iteraciji jedan deo trening skupa se privremeno izostavlja, model se gradi na preostalim uzorcima, a zatim se predviđaju izostavljeni uzorci; ukupni rezultati iz pojedinačnih iteracija koriste se za procenu robusnosti i interne prediktivne sposobnosti modela. Kod *leave-one-out* (LOO) validacije izostavlja se po jedan uzorak, kod *leave-many-out* (LMO) validacije izostavlja se veći, unapred definisan udeo uzoraka, dok se kod *k-struke* (engl. *k-fold*) unakrsne validacije trening skup deli na *k* međusobno isključivih podskupova približno jednake veličine, pri čemu se svaki podskup jednom koristi za validaciju. Za razliku od opšte LMO validacije, u kojoj se mogu ponavljati različite kombinacije izostavljenih uzoraka, *k-struka* validacija ima unapred definisane podskupove, tako da svaki uzorak bude u validacionom podskupu jednom [286,342].

Kao pokazatelji zadovoljavajuće interne validacije, koja ukazuje na robusnost i pouzdanost modela unutar trening seta podataka, poželjno je da R^2 ima vrednost veću od 0,7, Q^2 veću od 0,5, a $RMSEE$ što manju.

Modeli se takođe mogu podvrgnuti eksternoj validaciji [341,343], kojom se procenjuje njihova prediktivnost izračunavanjem koeficijenta determinacije za test skup (R_{pred}^2) i korena srednje kvadratne greške predikcije (engl. *Root Mean Square Error of Prediction*, $RMSEP$):

$$R_{pred}^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{eksp(test)} - Y_{pred(test)})^2}{\sum(Y_{eksp(test)} - \bar{Y}_{trening})^2} \quad (27)$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum(Y_{eksp(test)} - Y_{pred(test)})^2}{n_{test}}} \quad (28)$$

U navedenim jednačinama, $Y_{obs(test)}$ i $Y_{pred(test)}$ predstavljaju eksperimentalne i predviđene ispitivane aktivnosti ili osobine za test skup, dok $\bar{Y}_{trening}$ označava srednju vrednost ispitivane aktivnosti ili osobine trening seta jedinjenja. Vrednost n_{test} predstavlja broj jedinjenja u test skupu. Modeli sa dobrom moći predviđanja eksternog seta podataka bi trebalo da imaju R_{pred}^2 vrednost veću od 0,5, dok vrednost $RMSEP$ treba biti manja od duple vrednosti $RMSEE$.

Radi dodatne procene prediktivne sposobnosti modela, mogu se izračunati i parametri *r*-metrike (r_m^2 , $r_m^{1/2}$, $\bar{r}_m^2$ i Δr_m^2) [344,345] pomoću sledećih jednačina:

$$r_m^2 = r^2 \left(1 - \sqrt{|r^2 - r_0^2|}\right) \quad (29)$$

$$r_m^2 = r^2 \left(1 - \sqrt{|r^2 - r_0^2|}\right) \quad (30)$$

$$\overline{r_m^2} = \frac{r_m^2 + r_m'^2}{2} \quad (31)$$

$$\Delta r_m^2 = |r_m^2 - r_m'^2| \quad (32)$$

r^2 i r_0^2 predstavljaju kvadrate koeficijenata korelacije između eksperimentalno dobijenih i predviđenih aktivnosti test skupa, sa i bez odsečka na Y osi, redom. Ta dva parametra se mogu izračunati korišćenjem sledećih jednačina:

$$r^2 = \frac{[\sum(Y_{eksp(test)} - \bar{Y}_{eksp(test)})(Y_{pred(test)} - \bar{Y}_{pred(test)})]^2}{\sum(Y_{pred(test)} - \bar{Y}_{pred(test)})^2 \times \sum(Y_{eksp(test)} - \bar{Y}_{eksp(test)})^2} \quad (33)$$

$$r_0^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{eksp(test)} - kY_{pred(test)})^2}{\sum(Y_{eksp(test)} - \bar{Y}_{eksp(test)})^2} \quad (34)$$

$$r_0'^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{pred(test)} - k'Y_{eksp(test)})^2}{\sum(Y_{pred(test)} - \bar{Y}_{pred(test)})^2} \quad (35)$$

k i k' predstavljaju nagibe ovih prava i izračunavaju se preko sledećih jednačina:

$$k = \frac{\sum(Y_{eksp(test)}Y_{pred(test)})}{\sum(Y_{pred(test)})^2} \quad (36)$$

$$k' = \frac{\sum(Y_{eksp(test)}Y_{pred(test)})}{\sum(Y_{eksp(test)})^2} \quad (37)$$

Za adekvatan model, vrednosti parametara r_m^2 , $r_m'^2$ i $\overline{r_m^2}$ treba da budu veće od 0,5, dok vrednost parametra Δr_m^2 treba da bude manja od 0,2. Kao jedan od kriterijuma prihvatljivosti modela, vrednosti parametara k i k' treba da budu u intervalu 0,85–1,15.

Za proveru pouzdanosti modela može se izračunati i koeficijent saglasnosti korelacije (engl. *Concordance Correlation Coefficient, CCC*) [346], prema sledećoj jednačini:

$$CCC = \frac{2 \sum_{i=1}^n (X_{eksp(test),i} - \bar{X}_{eksp(test)})(Y_{pred(test),i} - \bar{Y}_{pred(test)})}{\sum_{i=1}^n (X_{eksp(test),i} - \bar{X}_{eksp(test)})^2 + \sum_{i=1}^n (Y_{pred(test),i} - \bar{Y}_{pred(test)})^2 + n_{test}(\bar{X}_{eksp(test)} - \bar{Y}_{pred(test)})^2} \quad (38)$$

U ovoj jednačini, $Y_{eksp(test)}$ i $Y_{pred(test)}$ predstavljaju eksperimentalne i predviđene vrednosti ispitivane aktivnosti ili osobine za test skup, $\bar{Y}_{pred(test)}$ označava srednju vrednost ispitivane aktivnosti ili osobine test skupa, dok n_{test} predstavlja broj jedinjenja u test skupu.

1.7.4. Domeni primenljivosti

Osnovna svrha formiranog QSAR/QSPR modela jeste da omogući što pouzdanije predviđanje proučavane zavisne varijable, odnosno biološke aktivnosti ili druge osobine od interesa za nova jedinjenja. Zbog toga procena upotrebljivosti modela ne podrazumeva samo njegovu validaciju u smislu dobrog slaganja, robusnosti i prediktivnosti, već i jasno definisanje domena primenljivosti (engl. *Applicability Domain*, AD). Jasno definisan AD predstavlja treći princip OECD smernica. On se može opisati kao fizičko-hemijski i strukturni prostor, kao i prostor predviđane zavisne varijable, odnosno biološki prostor u kome model daje predikcije sa određenim stepenom pouzdanosti. Predikcije za nova jedinjenja mogu se smatrati pouzdanijim kada ta jedinjenja pripadaju prostoru definisanom trening skupom, jer tada predstavljaju interpolaciju, dok su predikcije izvan tog prostora ekstrapolacije i zbog toga su manje pouzdane [347–349].

Za određivanje AD razvijen je veći broj pristupa. U širem smislu, strategije za definisanje AD mogu se zasnivati na fizičko-hemijskom, strukturnom i odzivnom domenu, kao i integrisanim metodama [348]. Kada se AD razmatra u prostoru fizičko-hemijskih deskriptora, najčešće se razlikuju metode zasnovane na opsegu vrednosti (engl. *range-based methods*), geometrijske metode (engl. *geometrical-based methods*), metode zasnovane na udaljenosti (engl. *distance-based methods*) i metode zasnovane na raspodeli gustine verovatnoće (engl. *probability density distribution-based methods*). Pošto nijedna od ovih metoda nije univerzalno najbolja, za potpuniju procenu domena primenljivosti često se preporučuje kombinovanje više komplementarnih pristupa [348–350].

Jedan od često primenjivanih metoda za definisanje domena primenljivosti je *leverage* metoda, koja pripada metodama zasnovanim na udaljenosti i često se primenjuje kod regresionih QSAR modela [349–351]. *Leverage* vrednost predstavlja meru udaljenosti posmatranog jedinjenja od centra trening skupa u prostoru deskriptora, pri čemu su *leverage* vrednosti dijagonalni elementi tzv. *hat* matrice (H):

$$H = X(X^T X)^{-1} X^T \quad (39)$$

gde je X matrica deskriptora trening skupa. Za pojedinačno jedinjenje *leverage* vrednost (h_i) se može izraziti jednačinom:

$$h_i = x_i^T (X^T X)^{-1} x_i \quad (40)$$

gde je x_i vektor vrednosti deskriptora za i -to jedinjenje, a X matrica modelskih deskriptora za trening skup. Na taj način *leverage* kvantifikuje koliko je posmatrano jedinjenje udaljeno od centra X -prostora, odnosno koliko može biti uticajno pri izgradnji modela.

Granična *leverage* vrednost (h^*) se koristi kao prag za procenu da li se jedinjenje nalazi unutar domena primenljivosti QSAR modela. Ako je n broj jedinjenja iz trening skupa, a p broj nezavisnih varijabli, ta vrednost se može se izračunati formulom [348,351]:

$$h^* = \frac{3(p+1)}{n} \quad (41)$$

Kada je za neko jedinjenje $h_i > h^*$, ono se smatra strukturno udaljenim od hemijskog prostora definisanog trening skupom, pa njegova predikcija predstavlja ekstrapolaciju modela i mora se tumačiti sa oprezom. Pri tome, jedinjenja iz trening skupa sa visokim *leverage* vrednostima mogu snažno uticati na regresioni model, ali ne moraju nužno biti odstupajuće tačke u prostoru odgovora ukoliko imaju male reziduale [349,351].

Za grafički prikaz domena primenljivosti leverage pristupa često se koristi *Williams*-ov grafikon, u kome se prikazuju *leverage* vrednosti i standardizovani reziduali. Ovaj grafikon omogućava istovremenu identifikaciju jedinjenja koja odstupaju u prostoru odgovora i jedinjenja koja su strukturno uticajna u prostoru deskriptora. Kao odstupajuće tačke u prostoru odgovora najčešće se izdvajaju jedinjenja sa standardizovanim rezidualima većim od tri standardne devijacije ($R > 3\sigma$), dok se kao strukturno udaljena izdvajaju jedinjenja sa $h > h^*$. Kombinovana analiza ova dva kriterijuma omogućava pouzdaniju procenu AD nego samo poređenje h_i i h^* , jer istovremeno uzima u obzir i položaj jedinjenja u prostoru deskriptora i veličinu greške predikcije [348,351].

1.7.5. Strategije dizajniranja novih jedinjenja u okviru LBDD

U okviru dizajna lekova zasnovanog na strukturi liganada, nove bioaktivne strukture najčešće se razvijaju polazeći od poznatih aktivnih jedinjenja na ciljnom biomolekulu i njihovih ključnih strukturnih i farmakofornih osobina. U zavisnosti od cilja optimizacije, mogu se primenjivati različite strategije, koje se razlikuju po obimu i dubini strukturnih promena. Takve promene mogu imati za cilj fino podešavanje afiniteta, selektivnosti i fizičko-hemijskih osobina, ali i dobijanje novih hemijskih klasa jedinjenja sa željenim farmakološkim dejstvom. Sam process dizajniranja novih liganada se ne smatra isključivo LBDD pristupom, jer može biti zasnovan i na informacijama o poznatim ligandima i na strukturnim podacima o receptoru. Kada su takvi strukturni podaci dostupni, oni mogu dodatno usmeriti optimizaciju liganda, jer omogućavaju da se modifikacije planiraju u skladu sa oblikom i ključnim interakcijama vezujućeg mesta [352].

1.7.5.1. *Strukturne modifikacije i generisanje novih liganada u LBDD*

U okviru LBDD, nova jedinjenja se najčešće dizajniraju polazeći od jednog ili više poznatih aktivnih liganada, pri čemu se izdvajaju ključne osobine odgovorne za biološki efekat i zatim planski modifikuju pojedini delovi molekula radi očuvanja aktivnosti i poboljšanja afiniteta, selektivnosti, fizičko-hemijskih svojstava i farmakokinetičkog profila. Ove promene mogu biti manje, poput modifikacija supstituenata, bočnih lanaca ili prstenova, ali i obimnije, uključujući pojednostavljivanje strukture, odnosno uklanjanje suvišnih ili neesencijalnih delova molekula uz zadržavanje strukturnih elemenata ključnih za aktivnost, što je naročito korisno kod kompleksnih i sintetički manje pristupačnih *lead* jedinjenja sa nepovoljnim ADMET osobinama [352,353]. U širem smislu, dizajn novih struktura može obuhvatiti i *de novo* pristup, odnosno generisanje novih molekulskih struktura na osnovu informacija o poznatim aktivnim ligandima i/ili strukturi receptora [354].

U tom širem okviru značajno mesto imaju i fragmentno zasnovani pristupi (*engl. fragment-based drug design, FBDD*). Opšti tok FBDD obuhvata izgradnju fragmentne biblioteke, skrining fragmenata i *fragment-to-lead* optimizaciju. U ovoj završnoj fazi najčešće se razlikuju četiri strategije:

- Nadograđivanje fragmenata (*engl. fragment growing*), pri kome se početni fragment nadograđuje tako da zauzme ostatak aktivnog mesta;
- Zamena molekulskih skeleta (*engl. scaffold hopping*), koji podrazumeva zamenu fragmenta početnog jedinjenja pogodnijim fragmentom;
- Povezivanje fragmenata (*engl. fragment linking*), gde se dva ili više fragmenata koji se vezuju za različite subdžepove povezuju linkerom;
- Spajanje fragmenata (*engl. fragment merging*), pri čemu se delimično preklapajući fragmenti objedinjuju u jedinstvenu strukturu sa potencijalno većom potentnošću.

Ove strategije mogu se koristiti pojedinačno ili u kombinaciji, u zavisnosti od konkretnog sistema i dostupnih strukturnih informacija. Ovaj pristup omogućava očuvanje ključnih osobina poznatog

aktivnog liganda uz potencijalno generisanje novih hemijskih klasa jedinjenja sa poželjnim farmakološkim profilom [352,355].

1.7.5.2. *Scaffold hopping kao strategija dizajniranja novih hemijskih klasa jedinjenja*

Scaffold hopping predstavlja strategiju u kojoj se centralni deo poznatog aktivnog jedinjenja zamenjuje novim molekulskim okvirom sličnog oblika i sličnog farmakofornog rasporeda, sa ciljem očuvanja ključnih osobina odgovornih za biološku aktivnost uz istovremeno dobijanje nove hemijske klase jedinjenja [356]. U tom smislu, ovaj pristup se može posmatrati kao proširenje bioizosterne zamene, ali sa većim stepenom strukturne transformacije, jer ne menja samo pojedinačne atome ili male grupe, već može zahvatiti čitav centralni skelet molekula. Takva promena može doprineti poboljšanju afiniteta, selektivnosti, fizičko-hemijskih i farmakokinetičkih svojstava, kao i prevazilaženju problema vezanih za toksičnost ili intelektualnu svojinu [356,357].

Potruga novog *scaffold*-a najčešće polazi od poznatog aktivnog liganda i od identifikacije onih strukturnih i farmakofornih elemenata koji moraju ostati očuvani da bi se zadržala aktivnost. Zbog toga cilj nije samo generisanje strukturno različitog analoga, već prelazak ka novom hemijskom prostoru koji i dalje može da obezbedi odgovarajući prostorni raspored donorskih, akceptorskih, hidrofobnih i drugih strukturnih karakteristika [356,358].

Metode *scaffold hopping*-a se mogu podeliti na:

- topološke metode (engl. *topological methods*)
- metode zasnovane na obliku (engl. *shape-based methods*)
- metode zasnovane na strukturi (engl. *structure-based methods*) [359].

Jedan od pristupa *scaffold hopping*-a zasnovanih na obliku koristi XED (engl. *eXtended Electron Distribution*) polje sila. Standardna molekulsko-mehanička polja sila često postavljaju pojedinačna naelektrisanja u centrima atoma, odnosno primenjuju tzv. aproksimaciju atom-centričnih naelektrisanja (engl. *atom centered charge (ACC) approximation*) što pri malim rastojanjima može dovesti do gubitka smanjene preciznosti opisa raspodele naelektrisanja, naročito u aromatičnim regionima kao i delovima strukture gde su formirane vodonične veze. XED je razvijen radi poboljšanja kvaliteta elektrostatičkih i disperzionih potencijala oko površine molekula, pri čemu se molekul najpre opisuje pomoću trodimenzionalnog molekulskog elektrostatičkog potencijala (engl. *molecular electrostatic potential, MEP*), a zatim se taj opis pojednostavljuje preko tačaka molekulskog polja (engl. *field points*), koje odgovaraju pozitivnim, negativnim, hidrofobnim i *van der Waals* regionima. Na taj način sličnost se ne procenjuje samo na osnovu hemijske strukture ili samog oblika, već i na osnovu rasporeda molekulskih polja. U pojedinim pristupima optimizaciji liganada mogu se koristiti i informacije iz 3D strukture protein-ligand kompleksa, uključujući tačke molekulskih polja vezujućeg mesta i okolnih aminokiselinskih ostataka. Takav pristup zato nije isključivo ligand-zasnovan, već može imati i elemente dizajna zasnovanog na strukturi receptora [360].

1.8. Terapijski potencijal i izazovi kinaznih inhibitora u bolestima CNS-a

Poseban značaj u razvoju kinaznih inhibitora ima njihova potencijalna primena kod oboljenja CNS-a, jer terapijska efikasnost u ovim indikacijama ne zavisi samo od aktivnosti prema ciljanoj kinazi, već i od sposobnosti jedinjenja da dostigne odgovarajuće koncentracije u moždanom tkivu. Ovo je naročito važno kod primarnih tumora CNS-a, kao što su meduloblastom i multififormni glioblastom, kao i kod metastaza perifernih tumora u CNS, koje predstavljaju značajan terapijski izazov [361–363]. Pored malignih bolesti, pojedine protein kinaze razmatraju se i kao terapijski ciljevi u neuroinflamatornim i neurodegenerativnim poremećajima, uključujući moždani udar, Parkinsonovu

i Alchajmerovu bolest, kao i amiotrofičnu lateralnu sklerozu [26]. Zbog toga procena permeabilnosti kinaznih inhibitora kroz KMB predstavlja važan korak u njihovoj ranoj karakterizaciji.

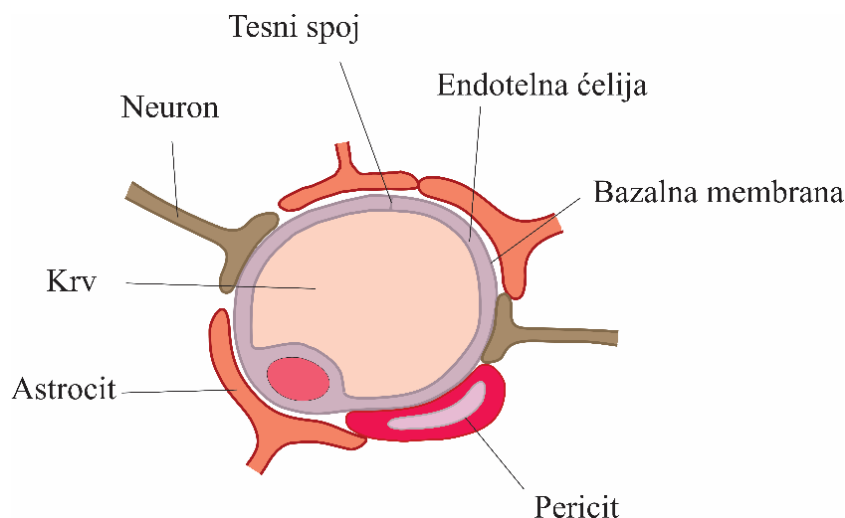
U tom kontekstu, sve veći broj istraživanja podržava i novi koncept poznat kao „bolest poremećenog ćelijskog ciklusa” (engl. *Aberrant Cell Cycle Disease*, ACCD), koji sugerise da maligni tumori i neurološki poremećaji mogu deliti slične molekulske mehanizme. Ključna zajednička osobina ovih stanja je „nepravilni ponovni ulazak u ćelijski ciklus“, koji dovodi do prekomerne aktivacije kinaza i onkoproteina. Kao posledica, u malignom tumoru se podstiče proliferacija tumorskih ćelija, dok u neurološkim bolestima dolazi do progresivne smrti neurona [364,365].

Međutim, razvoj terapija usmerenih na kinaze za lečenje bolesti CNS-a i dalje predstavlja značajan izazov, pre svega zbog specifičnih ograničenja povezanih sa razvojem lekova za CNS. Većina do sada razvijenih kinaznih inhibitora, kao i potencijalnih kinaznih ciljnih mesta dejstva koji su ispitivani, odnosi se na poremećaje van CNS-a, dok indikacije za bolesti CNS-a i dalje zaostaju u odnosu na druge terapijske oblasti, poput onkologije [361–363].

Uprkos navedenim izazovima, kinaze predstavljaju izuzetno atraktivne terapijske mete, s obzirom na njihovu ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa i signalnih puteva koji kontrolišu rast, diferencijaciju i preživljavanje ćelija. Posebno su interesantne kinaze uključene u aktivaciju mikroglije, kao što su leucinom bogata ponavljajuća kinaza 2 (engl. *Leucine-Rich Repeat Kinase 2*, LRRK2), Abelsonova tirozin-protein-kinaza 1 (engl. Abelson Tyrosine-Protein Kinase 1, c-Abl), Src porodične protein-tirozin kinaze (engl. *Src Family Kinases*, SFKs), Ste20-slična kinaza 1 sisara (engl. *Mammalian Sterile 20-Like Kinase 1*, MST1) i receptorske tirozin kinaze TAM porodice (engl. *TAM Family Receptor Tyrosine Kinases*, TAM RTKs) [366]. Poremećaj regulacije ovih signalnih puteva povezuje inflamatorne procese sa neurodegeneracijom, čime se otvara mogućnost razvoja novih ciljnih terapijskih strategija usmerenih ka bolestima CNS-a.

Pored neuroinflamatornih i neurodegenerativnih poremećaja, inhibicija pojedinih proteinskih tirozin-kinaza, kao što su ABL i EGFR, kao i lipidnih kinaza, poput PI3K, razmatra se i u kontekstu terapije tumora CNS-a [361,363]. Međutim, sama biološka relevantnost kinaza kao terapijskih meta nije dovoljna za uspešnu primenu inhibitora u lečenju bolesti CNS-a, jer njihov terapijski efekat zavisi i od sposobnosti da savladaju krvno-moždanu barijeru i dostignu odgovarajuću koncentraciju u tumorskom tkivu.

Krvno-moždana barijera (KMB) predstavlja izuzetno selektivan sistem sastavljen od nefenestriranih endotelnih ćelija moždanih kapilara koje su povezane složenim spojnim proteinima, kao što su tesni spojevi (engl. *tight junctions*, TJs) i adherentni spojevi, koji ograničavaju paracelularnu permeabilnost (Slika 1.24). Osim endotelnih ćelija, strukturni i funkcionalni integritet je dodatno podržan pericitima u bazalnoj membrani i astrocitima [367,368]. Svojim složenim transportnim mehanizmom, KMB reguliše prenos hranljivih materija, jona i hormona i sprečava ulazak neurotoksina ili patogena u mozak [369,370]. Optimizacija lekova, tako da mogu da dospeju do CNS-a predstavlja veoma izazovnu i važnu fazu u pretkliničkim istraživanjima jedinjenja koja ciljaju CNS [371]. Pri tome treba imati u vidu da je kod tumora CNS-a, naročito kod glioblastoma, integritet KMB često heterogeno izmenjen, pa se umesto samog „prolaska kroz KMB“ često govori o postizanju terapijski relevantne ekspozicije u CNS-u, odnosno tumorskom tkivu.



Slika 1.24. Šematski prikaz KMB. Prilagođeno na osnovu reference [372].

Da prolazak kroz KMB predstavlja jedan od ključnih kriterijuma u razvoju kinaznih inhibitora za bolesti CNS-a, pokazuju i primeri jedinjenja sa kliničkom ili eksperimentalnom primenom u neuroonkologiji. Među najkarakterističnijim primerima izdvajaju se tovorafenib, tip II RAF inhibitor odobren za relapsni ili refraktorni pedijatrijski gliom niskog gradusa sa fuzijom ili strukturnim preuređenjem gena BRAF ili BRAF V600 mutacijom [373,374], dabrafenib (Slika 1.8B) u kombinaciji sa trametinibom za pedijatrijski gliom niskog stepena sa BRAF V600E mutacijom koji zahteva sistemsku terapiju [375,376], kao i everolimus za lečenje subependimalnog gigantocelularnog astrocitoma (SEGA) povezanog sa tuberoznom sklerozom, kada se lezija ne može u potpunosti hirurški ukloniti i potrebna je terapijska intervencija [377,378]. Među eksperimentalnim jedinjenjima posebno se izdvajaju paksalisib (GDC-0084), oralni inhibitor PI3K/mTOR koji prodire u mozak razvijen za glioblastom [379,380], AZD1390, ATM inhibitor optimizovan za prolazak kroz KMB [381,382] i zotiraciclib (TG02), multikinazni inhibitor sa aktivnošću prema više CDK kinaza, posebno CDK9, sa prekliničkim podacima o penetraciji kroz KMB i kliničkim ispitivanjima u rekurentnim visokogradusnim astroцитomima i glioblastomu [383–385].

Zbog toga se u optimizaciji kinaznih inhibitora za CNS tumore afinitet prema meti mora razmatrati paralelno sa fizičko-hemijskim osobinama koje određuju permeabilnost kroz KMB, distribuciju u CNS-u i podložnost efluksnim transporterima. Metode kojima se procenjuje permeabilnost kroz KMB se obavezno uključuju u ispitivanje novih jedinjenja. *In vitro* i *in silico* metode omogućavaju ekonomičniju i jednostavniju procenu mogućnosti prolaska jedinjenja kroz KMB, tako da razvoj ovakvih metoda ima veliki značaj u razvoju kinaznih inhibitora [386,387]. Takođe, testiranje prodora u CNS za lekove koji ciljaju periferna tkiva je neophodno da bi se izbegli neželjeni efekti u CNS-u [388].

1.8.1. *In vitro* metode za ispitivanje permeabilnosti kroz KMB

Razvoj *in vitro* modela krvno-moždane barijere (KMB) proistekao je iz potrebe za pouzdanim, reproduktivnim i visokopropusnim sistemima za proučavanje barijerne i transportne funkcije ove strukture. S obzirom na to da približno 100% makromolekulskih neuroterapeutika i više od 98% malih molekula ne prolazi uspešno kroz KMB, rana eliminacija neadekvatnih kandidata predstavlja važan korak u razvoju terapija. *In vitro* modeli omogućavaju kontrolisane i ponovljive uslove ispitivanja, zahtevaju manje količine ispitivanih supstanci i smanjuju oslanjanje na složenije i skuplje *in vivo* studije [371].

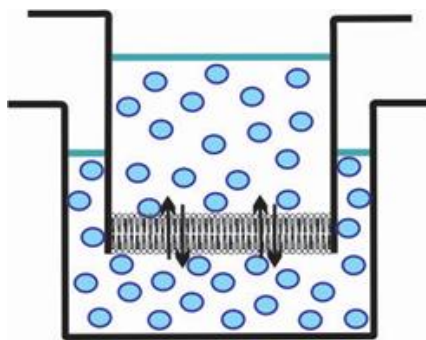
Savremeni pristupi modelovanju KMB u *in vitro* uslovima mogu se podeliti u dve osnovne grupe: nećelijske modele, zasnovane na veštačkim membranama i ćelijske modele, zasnovane na kulturama ćelija, koji se dalje dele na statičke i dinamičke sisteme [371,389].

Nećelijski modeli obuhvataju sisteme koji imitiraju lipidnu prirodu membrane bez upotrebe živih ćelija. Jedan od najznačajnijih testova iz ove grupe je paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama (engl. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA). Ovi modeli pogodni su za ranu fazu visokopropusnog skrininga, jer su jednostavni, jeftini i reproduktivni, ali im je osnovno ograničenje to što ne uključuju transportere, enzime ni druge ćelijske komponente KMB, pa zato ne mogu verno opisati aktivni transport i efluksne mehanizme [371,390].

Ćelijski *in vitro* modeli predstavljaju složeniji pristup, jer uključuju moždane mikrovaskularne endotelne ćelije, a u naprednijim varijantama i druge komponente neurovaskularne jedinice, kao što su astrociti i periciti. U zavisnosti od porekla ćelija, ovi sistemi mogu biti zasnovani na primarnim kulturama ili na immortalizovanim ćelijskim linijama. Primarne ćelije bolje zadržavaju osobine slične *in vivo* KMB, ali imaju ograničen broj pasaža, dok immortalizovane linije omogućavaju veću standardizaciju, ali često pokazuju slabije barijerne osobine [371,389]. U okviru ćelijskih modela koriste se moždane endotelne linije, ali i neendotelne epitelne linije odnosno surogat sistemi kao što su MDCK, MDCK-MDR1 i Caco-2 ćelijske linije [371,391,392]. Ova grupa modela deli se na statičke i dinamičke sisteme [371,389]. Statički sistemi se najčešće zasnivaju na *Transwell* sistemima sa polupropustljivom membranom i obuhvataju monokulture, ko-kulture i složenije multikulturene sisteme [393,394], dok dinamički sistemi uključuju efekat protoka i sile smicanja i obuhvataju, između ostalog, sisteme sa šupljim vlaknima (DIV-KMB) i mikrofluidne KMB platforme [395,396], čime omogućavaju realističnije oponašanje *in vivo* uslova.

1.8.2. Paralelni test permeabilnosti na veštačkim membranama

PAMPA test predstavlja *in vitro*, nećelijski model razvijen za procenu pasivne difuzije jedinjenja kroz različite biološke membrane [397]. Metoda je razvijena kao visokopropusni sistem zasnovan na mikrotitarskim pločama sa 96 bunarića, pri čemu se svaki sastoji od dve komore međusobno odvojene veštačkom lipidnom membranom (Slika 1.25). Ova membrana se formira impregnacijom poroznog filtera rastvorom fosfolipida u organskom rastvaraču, čime se dobija tanki lipidni sloj koji simulira barijerna svojstva bioloških membrana. Osnovni princip PAMPA testa zasniva se na merenju efektivne permeabilnosti (P_e) jedinjenja kroz lipidni sloj, pri čemu se simulira transcelularna pasivna difuzija. Modifikacija PAMPA metode za procenu prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (**PAMPA-KMB**) razvijena je sa ciljem predviđanja pasivne penetracije jedinjenja u CNS. U ovom modelu veštačka membrana se impregnira lipidnim ekstraktom svinjskog mozga, čime se simulira lipidni sastav endotelne ćelije KMB [398]. U daljem razvoju metode sprovedene su brojne optimizacije eksperimentalnih uslova, uključujući promene lipidnog sastava membrane, pH vrednosti, izbora rastvarača i vremena inkubacije, radi poboljšanja prediktivne pouzdanosti i proširenja primene [399]. PAMPA-KMB model se danas koristi za ranu selekciju lekova kandidata koji deluju na nivou CNS-a, rangiranje serija jedinjenja tokom optimizacije struktura, kao i razvoj *in silico* QSPR modela zasnovanih na strukturnim osobinama ispitivanih jedinjenja i eksperimentalno dobijenim P_e vrednostima.



Slika 1.25. Šematski prikaz PAMPA sistema – donorski (ispod) i akceptorski (iznad) bunarić odvojeni veštačkom lipidnom membranom.

Glavne prednosti ove metode obuhvataju mogućnost visokopropusnog skrininga i mogućnost potpune automatizacije, kao i znatno niže troškove u poređenju sa ćelijskim modelima, poput Caco-2 sistema. Pored toga, metoda se odlikuje dobrom reproduktivnošću i robusnošću eksperimentalnog sistema, uz mogućnost prilagođavanja lipidnog sastava membrane i pH uslova u skladu sa specifičnim ciljem ispitivanja. Posebno je značajna dobra korelacija sa pasivnom *in vivo* permeabilnošću, naročito u slučaju transcelularne difuzije [398–400].

Sa druge strane, najvažnija ograničenja metode odnose se na nemogućnost modelovanja aktivnog transporta i efluksnih mehanizama (npr. P-glikoproteina, P-gp), kao i nemogućnost procene paracelularnog transporta. Dodatno, sistem ne omogućava procenu metaboličkih procesa niti interakcija sa ćelijskim komponentama. Kao tehničko ograničenje može se javiti i zadržavanje izrazito lipofilnih jedinjenja unutar lipidne membrane, dok je pouzdanost metode smanjena za vrlo hidrofilna jedinjenja i molekule čiji transport dominantno zavisi od aktivnih mehanizama [399,400].

Iako PAMPA-KMB ne modeluje aktivni transport niti P-glikoproteinski (P-gp) efluks, predstavlja ekonomičan i pouzdan alat u ranoj fazi razvoja lekova, posebno kinaznih inhibitora, kod kojih je kontrola penetracije kroz krvno-moždanu barijeru od velikog značaja - kako za postizanje terapijskog efekta u CNS bolestima, tako i za izbegavanje neželjenih centralnih efekata kod inhibitora namenjenih perifernim indikacijama [401–403].

Na efektivnu permeabilnost mogu uticati sastav i količina lipidne faze, pH donorskog i akceptorskog odeljka, vreme inkubacije, mešanje sistema, prisustvo kosolvenata ili surfaktanata, kao i izabrana metoda detekcije. Zbog toga se P_e vrednosti najpouzdanije poredе unutar istog eksperimentalnog protokola, dok direktno poređenje podataka dobijenih različitim PAMPA varijantama može dovesti do pogrešnih zaključaka. Ovaj aspekt je posebno značajan kod hemijski raznovrsnih serija jedinjenja, kod kojih razlike u jonizacionom stanju, rastvorljivosti i afinitetu prema lipidnoj membrani mogu značajno uticati na izmerene vrednosti [404–406].

Posebnu pažnju treba posvetiti i lipidnom sastavu veštačke membrane. Studije zasnovane na PAMPA modelima sa ekstraktima prirodnih lipida pokazale su da membrana ne predstavlja samo inertnu hidrofobnu prepreku, već da njena fosfolipidna kompozicija i površinski naboj mogu uticati na permeabilnost jedinjenja različitog naelektrisanja. U modelima KMB često se koriste polarni lipidi mozga, jer bolje od jednostavnih hidrofobnih membrana oponašaju fizičko-hemijsku selektivnost KMB. Novija ispitivanja prirodnih lipidnih ekstrakata pokazala su da neutralna i pozitivno naelektrisana jedinjenja, u proseku, lakše prolaze kroz lipidne membrane u odnosu na anjonska i cviterjonska jedinjenja, što je povezano sa interakcijama jonizovanih molekula i nabijenih fosfolipidnih komponenti membrane. Ovaj podatak je važan za tumačenje PAMPA-KMB rezultata, jer ukazuje da permeabilnost ne zavisi samo od opšte lipofilnosti, već i od odnosa između jonizacionog stanja jedinjenja i karakteristika lipidne faze [407,408].

Važan aspekt interpretacije PAMPA rezultata predstavlja i procena retencije jedinjenja u membrani. Kod lipofilnih jedinjenja smanjena koncentracija u akceptorskom odeljku ne mora nužno ukazivati na slabu interakciju sa membranom, već može biti posledica izraženijeg zadržavanja u lipidnom sloju. Zbog toga poređenje koncentracija u početnom (radnom), donorskom i akceptorskom rastvoru omogućava potpuniju procenu raspodele jedinjenja u PAMPA sistemu i smanjuje rizik od pogrešnog tumačenja niskih P_e vrednosti [409,410].

U PAMPA testu analitička metoda ima ključnu ulogu, jer se efektivna permeabilnost izračunava na osnovu koncentracija ispitivanog jedinjenja u donorskom i akceptorskom bunariću nakon definisanog perioda inkubacije. Za određivanje koncentracija mogu se koristiti različiti analitički pristupi, uključujući tečnu hromatografiju visokih performansi (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) analizu i tečna hromatografija spregnuta sa tandemskom masenom spektrometrijom (engl. *Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS), pri čemu se izbor metode prilagođava hemijskim osobinama ispitivanih jedinjenja, očekivanim koncentracijama i sastavu uzorka [9,10]. HPLC analiza omogućava hromatografsko razdvajanje ispitivanog jedinjenja od komponenata pufera, organskih rastvarača, solubilizatora ili potencijalnih nečistoća, čime se povećava pouzdanost određivanja u odnosu na direktno merenje apsorbance. LC-MS/MS se naročito primenjuje kada se ispituju jedinjenja sa slabim UV apsorpcionim karakteristikama, niskim koncentracijama, slabom rastvorljivošću ili u prisustvu komponenata koje mogu ometati određivanje. Nakon analitičkog određivanja koncentracija, vrednosti u donorskom i akceptorskom bunariću koriste se za izračunavanje $P_e/\log P_e$ parametara, koji predstavljaju osnovu za procenu pasivne permeabilnosti kroz veštačku lipidnu membranu [398,411].

1.9. Kinazni inhibitori i DNK - potencijalne interakcije i biološki značaj

Iako su inhibitori protein kinaza razvijeni kao ciljani lekovi, za kliničke kinazne inhibitore je pokazano da često ispoljavaju dejstvo na više molekulskih meta i da, pored primarnih kinaznih meta, mogu ostvarivati i ne-kinazne *off-target* interakcije, što može doprineti pojavi dodatnih efekata. U okviru takve proširene karakterizacije, DNK predstavlja relevantnu potencijalnu metu [412–414].

Ispitivanja su pokazala da pojedini kinazni inhibitori mogu ostvariti interakciju sa dvostrukim helksom DNK, među kojima se posebno izdvajaju lapatinib, imatinib, dasatinib i sunitinib [415–418]. Budući da DNK ima ključnu ulogu u regulaciji ćelijskih procesa, uključujući replikaciju i deobu ćelija, ovakve interakcije mogu imati značajne biološke posledice. Vezivanjem za DNK, mali molekuli mogu modifikovati njenu strukturu i time uticati na funkcionalnost proteina koji se prirodno vezuju za genetski materijal, što može dovesti do poremećaja u transkripciji, replikaciji i popravci DNK. Takvi efekti mogu doprineti antineoplastičnoj aktivnosti inhibitora, ali i izazvati neželjene citotoksične ili genotoksične posledice [419,420].

Poznato je da vezivanje malih molekula za DNK može uticati na procese u kojima DNK učestvuje, uključujući transkripciju i replikaciju, jer se vezivanjem liganda mogu promeniti svojstva DNK relevantna za njenu funkciju i interakcije sa proteinima. U tom smislu, efekat DNK-vezivanja nije jednoznačan: u antitumorskom kontekstu, funkcionalno ometanje procesa zavisnih od DNK može doprineti antiproliferativnom dejstvu, dok u drugim okolnostima isti princip može voditi neželjenoj citotoksičnosti [421–423].

Savremeni pregledi DNK–ligand interakcija ukazuju da se mali molekuli mogu vezivati za DNK kovalentno ili nekovalentno, pri čemu je nekovalentno vezivanje reverzibilno i ostvaruje se kombinacijom elektrostatičkih interakcija, vodoničnih veza i *van der Waals*-ovih interakcija, a nekovalentno vezivanje liganada se najčešće razmatraju kroz modove kao što su interkalacija i vezivanje u žljebove. Važno je da se biološke posledice ne izvode samo iz činjenice da ligand vezuje DNK: istraživanja mutagenosti nekovalentnih DNK-interagujućih molekula pokazuju da su za ishod

presudni način vezivanja, afinitet i nishodne biohemijske posledice u konkretnom biološkom kontekstu [424,425].

U pojedinim slučajevima, direktne interakcije malih molekula sa DNK mogu biti povezane sa sledom događaja koji uključuje strukturne promene i funkcionalno ometanje procesa zavisnih od DNK, a u određenim slučajevima i stabilizaciju topoizomera II–DNK kompleksa (topo II “*poison*” efekat), sa posledničnim nakupljanjem prekida DNK [426]. Odgovor na oštećenje DNK (engl. *DNA Damage Response*, DDR) opisan je kao koordinisana mreža detekcije lezija, signalizacije i popravke, koja integriše informacije o obimu oštećenja i može usmeriti ćeliju ka zastoju ciklusa i popravci, ili ka eliminacionim ishodima poput apoptoze [427].

Zbog toga je, pre detaljnog razmatranja bioloških posledica, korisno sistematizovati osnovne tipove interakcija liganada sa DNK, jer način vezivanja u velikoj meri određuje stabilnost kompleksa i verovatne funkcionalne ishode [424].

1.9.1. Tipovi interakcija liganada i molekula DNK

Lekovi mogu stupati u interakciju sa molekulom DNK putem kovalentnih i nekovalentnih veza. Kovalentno vezivanje leka za DNK je najčešće ireverzibilno i može dovesti do trajne inhibicije funkcija DNK, što u krajnjem ishodu može rezultirati ćelijskom smrću. Nasuprot tome, nekovalentne interakcije su reverzibilne i zasnivaju se na principu molekularnog prepoznavanja [428].

Nekovalentno vezivanje ostvaruje se putem različitih tipova interakcija, kao što su elektrostatičke sile, vodonične veze i *van der Waals*-ove (uključujući dipol–dipol) interakcije. Stabilnost formiranog kompleksa lek–DNK zavisi od ukupnog doprinosa i intenziteta ovih intermolekulskih sila [428]. Lekovi koji ostvaruju nekovalentne interakcije sa DNK mogu se svrstati u nekoliko grupa:

- a) interkalatni agensi,
- b) ligandi koji se vezuju za mali žljeb DNK,
- c) ligandi koji se vezuju za veliki žljeb DNK i
- d) ligandi koji se vezuju elektrastatičkim silama za spoljašnju stranu dvolančane spirale DNK [428].

Interkalacija predstavlja specifičan tip nekovalentne interakcije pri kome se planarno, najčešće policiklično aromatično jezgro molekula umeće između susednih parova baza DNK, uz istovremeno odmotavanje i izduženje heliksa [429]. Primarni doprinos stabilnosti kompleksa potiče od π – π slaganja aromatičnih sistema liganda i baza DNK, uz istovremeno smanjenje količine površinski vezane vode nakon formiranja kompleksa; nastale vodonične veze mogu biti direktne ili posredovane molekulima vode. Umetanje planarnog molekula između parova baza dovodi do lokalnih konformacionih promena DNK, uz povećanje razmaka između susednih parova baza i prilagođavanje šećerno-fosfatne okosnice, odnosno delimično odmotavanje [428,429].

Lekovi koji se vezuju u mali žljeb DNK najčešće imaju zakrivljenu, strukturu oblika polumeseca koja je komplementarna obliku žljeba [430,431]. Nakon vezivanja, ligand (lek) se uklapa u šupljinu žljeba i potiskuje prisutni hidratacioni sloj. Stabilnost kompleksa prvenstveno se zasniva na *van der Waals*-ovim interakcijama, dok se kod pojedinih jedinjenja ostvaruju i vodonične veze sa bazama (često u sekvencama bogatim adenin-timin baznim parovima), direktno ili posredstvom molekula vode. Vodom posredovani kontakti mogu biti značajan stabilizacioni faktor. Iako se može očekivati da vezivanje u mali žljeb izaziva relativno malo promena DNK, opisano je da dolazi do promena heličnog uvrtnja i rotacije jedne baze radi omogućavanja vodoničnog vezivanja, dok *van der Waals*-ove sile mogu dovesti i do ozbiljnijih odstupanja heliksa od normalne geometrije; ujedno se mogu javiti i konformacione promene samog liganda radi maksimalnog broja stabilizujućih kontakata. Na

nivou kontaktnih mesta u malom žljebu, u strukturnim analizama se ističe značaj purinskog N3, pirimidinskog O2, guaninskog N2 i dezoksiriboze O4', a vodom posredovane interakcije mogu doprineti stabilizaciji kompleksa [428,430].

Znatno je manji broj **supstanci koje se vezuju za veliki žljeb**. Ovakva zastupljenost se može povezati sa strukturnom organizacijom velikog žljeba i činjenicom da on predstavlja ključnu oblast sekvenciono-specifičnog prepoznavanja DNK od strane proteina. U velikom žljebu atomi azota i kiseonika baznih parova orijentisani su ka unutrašnjosti samog žljeba, odnosno u smeru ose heliksa, čime su pristupačni proteinima za specifične interakcije. Zbog toga se razvoj liganada koji se selektivno vezuju za veliki žljeb često razmatra u kontekstu inhibicije protein–DNK interakcija [428,432].

Na kraju, jedinjenja koja se **elektrostatički vezuju** za spoljašnju stranu DNK najčešće ostvaruju nespecifične interakcije sa negativno naelektrisanom šećerno-fosfatnom okosnicom, a ovaj način vezivanja se često javlja kada ligand pokazuje sklonost ka samo-asocijaciji i formiranju agregata koji se “nanižu” uz DNK radi smanjenja međusobnog elektrostatičkog odbijanja liganada [428,432].

U praksi se način vezivanja liganda za DNK, naročito kada nisu dostupni strukturni podaci visoke rezolucije, najčešće procenjuje indirektno, kombinovanjem više eksperimentalnih kriterijuma čija pouzdanost zavisi od primenjene metode [433].

1.9.2. Voltametrijsko ispitivanje interakcija kinaznih inhibitora sa DNK

Brojne tehnike se koriste za ispitivanje tipa i intenziteta interakcije lek–DNK, od klasičnih spektroskopskih metoda, kao što su UV-VIS, fluorescentna, IR/FTIR i NMR spektroskopija, preko elektrohemijskih metoda poput voltametrije, do savremenih optičkih i elektrohemijskih DNK-biosenzora [428]. Elektrohemijske metode su posebno korisne kada se ispituju elektroaktivni lekovi, jer omogućavaju analizu oksido-redukcionog ponašanja ispitivanog jedinjenja, ali i praćenje promena elektrohemijskog odgovora DNK nakon formiranja kompleksa [434].

Zato je elektrohemijsko ispitivanje mehanizama oksidacije i redukcije inhibitora kinaza značajno za bolje razumevanje njihove hemijske reaktivnosti, mogućih transformacija elektroaktivnih funkcionalnih grupa i odnosa između strukture i mehanizma delovanja. Pored toga, promene u voltametrijskim signalima leka ili elektroaktivnih baza DNK mogu pružiti informacije o nastanku kompleksa lek-DNK i jačini interakcije [434].

Voltametrija predstavlja grupu elektrohemijskih metoda koje se zasnivaju na merenju promene jačine struje s promenom napona u elektrolitičkim ćelijama. Jačina struje odražava brzinu difuzije analita iz unutrašnjosti rastvora do površine radne elektrode gde dolazi do njegove oksidacije ili redukcije, tako da difuziona struja predstavlja analitički signal proporcionalan koncentraciji analita [435].

Elektrohemijsku ćeliju čine tri elektrode u kontaktu sa rastvorom elektrolita: radna, referentna i pomoćna elektroda. U ovom sistemu potencijal radne elektrode kontroliše se u odnosu na referentnu elektrodu, dok struja protiče gotovo isključivo između radne i pomoćne elektrode. Ovakav raspored omogućava preciznu kontrolu potencijala na mestu na kome se odigrava elektrohemijska reakcija, uz minimalan uticaj prolaska struje kroz referentnu elektrodu [436,437]. Merena struja u elektrohemijskoj ćeliji obuhvata faradejsku i nefaradejsku komponentu. Faradejska struja nastaje usled oksidacije ili redukcije elektroaktivne vrste na površini elektrode, dok je od nefaradejskih procesa posebno značajna kapacitivna struja, koja potiče od punjenja i pražnjenja dvojnog električnog sloja na granici elektroda–rastvor. U elektroanalitičkim ispitivanjima za analizu je najznačajniji deo signala koji potiče od faradejske komponente struje analita [438,439].

Radna elektroda je centralni element elektrohemijske ćelije, jer se na njenoj površini odvija oksidacija ili redukcija ispitivane vrste. U voltametrijskim merenjima potencijal radne elektrode kontroliše se u odnosu na referentnu elektrodu, dok se meri struja koja protiče između radne i pomoćne elektrode, pa radna elektroda mora da obezbedi dobar odnos signal–šum i reproduktivnost. Materijal elektrode se bira prema redoks ponašanju analita i pozadinskoj struji u potrebnom opsegu potencijala, dok na intenzitet signala utiču i geometrija elektrode, stanje njene površine i dizajn ćelije. Čvrste elektrode su često pogodnije od živine za rad pri pozitivnijim potencijalima, ali zahtevaju pažljiv pretretman i poliranje da bi se obnovila površina i omogućili reproduktivni rezultati [437,440].

Elektroda od staklastog ugljenika (engl. *glassy-carbon electrode*, GCE) je jedna od najčešće korišćenih ugljeničnih elektroda, dobijena termičkom obradom polimera na visokim temperaturama u inertnoj atmosferi. Odlikuje se dobrom hemijskom otpornošću, mehaničkom čvrstinom, mogućnošću poliranja i širokim radnim opsegom potencijala, zbog čega se veoma često koristi u elektroanalizi. Na površini ove elektrode lako se adsorbuju molekuli ili joni reaktanata, kao i međuprodukti hemijskih reakcija i različite nečistoće iz rastvora. Zbog mogućnosti adsorpcije organskih materija, ove elektrode se često mogu modifikovati i koristiti kao elektrohemijski senzori i biosenzori [437,440,441].

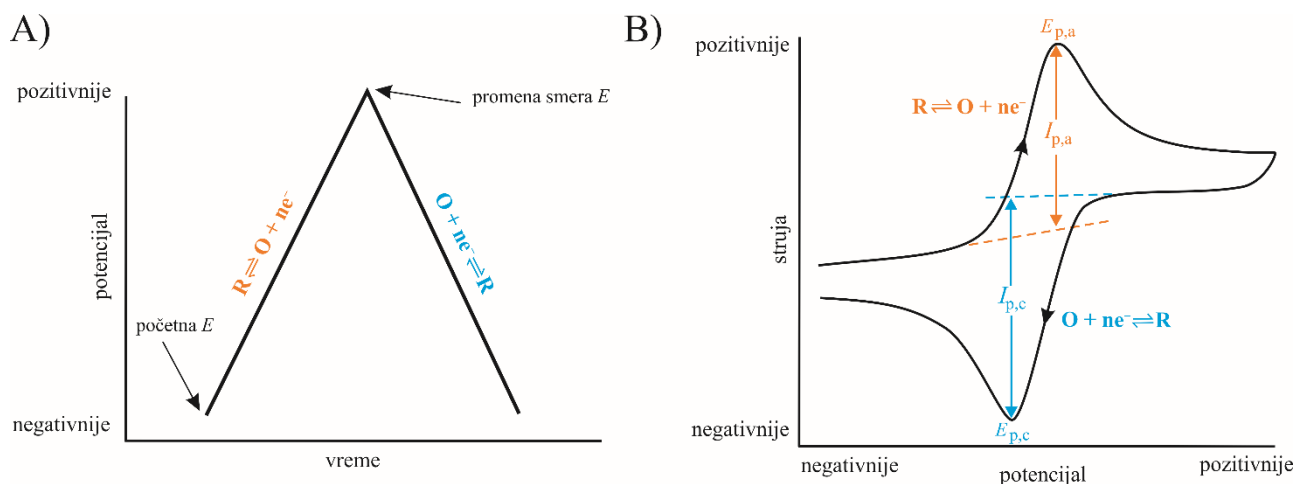
Potencijal radne elektrode uvek se definiše u odnosu na **referentnu elektrodu**, čiji potencijal treba da bude stabilan i nezavisan od elektroaktivnih vrsta u rastvoru. Uloga referentne elektrode je da obezbedi stabilan i reproduktivan potencijal u odnosu na koji se meri potencijal radne elektrode. U praksi se najčešće koristi Ag/AgCl elektroda jer je jednostavna za rukovanje i često primenljiva u vodenim sistemima. Njen potencijal je određen ravnotežom Ag/AgCl redoks para i zavisi od aktivnosti hloridnih jona [436,437,440].

Pomoćna (kontra) elektroda zatvara električno kolo i obezbeđuje protok struje u celom sistemu, tako da kroz referentnu elektrodu protiče zanemarljiva struja i njen potencijal ostaje stabilan. Struja koja polarizuje radnu elektrodu teče između radne i pomoćne elektrode, dok se potencijal radne meri prema referentnoj u posebnom kolu. Materijal i oblik pomoćne elektrode mogu biti različiti, ali se obično koristi elektroda veće površine od radne kako bi njena polarizacija bila što manja. U voltametrijskim eksperimentima najčešće se koristi elektroda od platine [436,437].

1.9.2.1. Voltametrijske tehnike

Od voltametrijskih tehnika koje se najčešće primenjuju u elektroanalitičkim ispitivanjima, poseban značaj imaju ciklična voltametrija (engl. *Cyclic Voltammetry*, CV), diferencijalno pulsna voltametrija (engl. *Differential Pulse Voltammetry*, DPV) i voltametrija pravougaonih talasa (engl. *Square-Wave Voltammetry*, SWV), jer omogućavaju uvid u mehanizam elektrodnog procesa, reverzibilnost reakcije i osetljivo registrovanje elektrohemijskog odziva ispitivanih jedinjenja [442].

Ciklična voltametrija (CV) je brza elektroanalitička potenciodinamička tehnika koja se koristi za kvalitativno ispitivanje elektrohemijskih reakcija. Zasniva se na merenju struje kroz elektrolitičku ćeliju dok se potencijal radne elektrode linearno menja s vremenom, najpre do zadate krajnje vrednosti, a zatim u suprotnom smeru. Tako se dobija ciklični voltamogram sa pikovima definisanim položajem pika (E_p) i jačinom struje pika (I_p) (Slika 1.26). Pošto se merenje izvodi u rastvoru koji se ne meša, voltamogram ima odvojene pikove oksidacije i redukcije, a posebna prednost CV je što omogućava praćenje elektrohemijskog ponašanja produkata nastalih na elektrodi [440,443,444].



Slika 1.26. Šematski prikaz ciklične voltametrije: A) promena potencijala elektrode tokom vremena sa promenom smera skeniranja; B) tipičan ciklični voltamogram reverzibilnog redoks sistema sa anodnim pikom oksidacije ($R \rightleftharpoons O + ne^-$) i katodnim pikom redukcije ($O + ne^- \rightleftharpoons R$). Na slici su označeni potencijali i struje anodnog ($E_{p,a}$ i $I_{p,a}$) i katodnog pika ($E_{p,c}$ i $I_{p,c}$). Prilagođeno na osnovu reference [436].

Analizom zavisnosti intenziteta struje pika od brzine promene potencijala može se proceniti da li je elektrodni proces pretežno **difuziono** ili **adsorpciono kontrolisan**. Ako struja pika raste srazmerno kvadratnom korenu brzine promene potencijala, proces je pretežno difuziono kontrolisan, a ako struja pika raste srazmerno samoj brzini promene potencijala, proces je pretežno adsorpciono kontrolisan. U logaritamskom obliku ta zavisnost može se zapisati kao:

$$\log I_p = \log k + x \log v \quad (42)$$

pri čemu nagib blizak 0,5 ukazuje na difuziono kontrolisane, a nagib blizak 1 na adsorpciono kontrolisane procese; međuvrednosti ukazuju na mešovite difuziono-adsorpciono kontrolisane elektrodne procese [440,442].

Pored procene načina transporta elektroaktivne vrste do površine elektrode, ciklična voltametrija omogućava i procenu reverzibilnosti elektrodnog procesa.

Kod **reverzibilnog procesa** prenos elektrona je dovoljno brz da se na površini elektrode praktično održava Nernstova ravnoteža. Za reverzibilan difuziono kontrolisan proces, u cikličnom voltamogramu su prisutni anodni i katodni pik, a za jednoelektronski proces razlika između anodnog i katodnog potencijala pika iznosi približno:

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{57,0 \text{ mV}}{n} \quad (43)$$

na 25 °C. Odnos intenziteta struja anodnog i katodnog pika je približno jednak jedinici:

$$\left| \frac{I_{p,a}}{I_{p,c}} \right| \approx 1 \quad (44)$$

To znači da je razlika između pikova obrnuto srazmerna broju elektrona, pa za jednoelektronski proces iznosi oko 57 mV, a za efektivni dveelektronski reverzibilni proces oko 28,5 mV. Za izraženo reverzibilni sistem karakteristično je da se položaj pikova se pri promeni brzine skeniranja ne menja [440,444].

Za dodatnu procenu reverzibilnosti procesa i broja elektrona može se koristiti i razlika između potencijala pika i potencijala na polovini visine pika. Za reverzibilan difuziono kontrolisan proces važi:

$$|E_p - E_{p1/2}| = \frac{56,6 \text{ mV}}{n} \quad (45)$$

gde je $E_{p1/2}$ potencijal na polovini visine pika, a n broj elektrona koji učestvuje u elektrodnom procesu [434].

Kod **kvazireverzibilnog procesa** kinetika prenosa elektrona više nije dovoljno brza za potpuno reverzibilno ponašanje, ali ni toliko spora da bi proces bio potpuno ireverzibilan. I anodni i katodni pik i dalje mogu biti prisutni, ali je razlika između potencijala pikova veća od teorijske vrednosti za reverzibilan sistem:

$$\Delta E_p > \frac{57,0}{n} \quad (46)$$

pri čemu ΔE_p raste sa porastom brzine skeniranja. Istovremeno, anodni pik se pomera ka pozitivnijim, a katodni ka negativnijim potencijalima, pa E_p postaje zavisen od brzine promene potencijala. Zbog toga se kvazireverzibilan proces u praksi prepoznaje po zavisnosti E_p i ΔE_p od brzine skeniranja i po ponašanju koje je između reverzibilnog i ireverzibilnog limita [440]. Kod kvazireverzibilnih sistema vrednost $|E_p - E_{p1/2}|$ se nalazi između vrednosti karakterističnih za reverzibilne i ireverzibilne procese i tumači se zajedno sa zavisnošću E_p , ΔE_p i I_p od brzine promene potencijala [434].

Kod **ireverzibilnog procesa** povratni pik izostaje ili je veoma slab, jer proizvod nastao na elektrodi ne učestvuje u povratnoj reakciji u meri karakterističnoj za reverzibilan sistem. U tom slučaju potencijal pika zavisi od brzine promene potencijala i pomera se ka pozitivnijim vrednostima za oksidaciju, odnosno ka negativnijim za redukciju. Za ovakve procese ne postoji jedna jednostavna teorijska vrednost za ΔE_p kao kod reverzibilnog sistema; umesto toga, njihovo prepoznavanje se zasniva na odsustvu ili izraženom slabljenju povratnog pika i na zavisnosti E_p od brzine promene potencijala [440]. Kod ireverzibilnih elektrodnih procesa razlika između potencijala pika i potencijala na polovini visine pika pri 25 °C se može opisati jednačinom:

$$|E_p - E_{p1/2}| = \frac{47,7 \text{ mV}}{\alpha n} \quad (47)$$

gde je α koeficijent prenosa naelektrisanja čija je vrednost manja od 1 (najčešće između 0,3 i 0,7). Na osnovu ove relacije se može proceniti proizvod αn , dok se broj elektrona može proceniti ukoliko je vrednost α poznata ili se uzme odgovarajuća pretpostavljena vrednost [445].

Linearna zavisnost potencijala pika od pH se može prikazati jednačinom:

$$E_p = a \cdot \text{pH} + b \quad (48)$$

Nagib ove zavisnosti koristi se za procenu odnosa broja protona i elektrona koji učestvuju u elektrodnom procesu. Prema Nernstovoj jednačini, vrednost nagiba bliska 59 mV po jedinici pH pri 25 °C ukazuje da u procesu učestvuje jednak broj protona i elektrona.

Diferencijalno pulsna voltametrija (DPV) je pulsna tehnika u kojoj se na stepeničasti bazni potencijal superponiraju pulsevi konstantne amplitude, a struja se meri neposredno pre pulsa i na

kraju pulsa (Slika 1.27). Kao analitički signal se prikazuje njihova razlika, pa je doprinos kapacitivne struje znatno smanjen u odnosu na faradejsku struju. Zbog toga je DPV jedna od najosetljivijih voltametrijskih tehnika i pogodna je za preciznije određivanje položaja pika i procenu reverzibilnosti procesa [442].

Za oksidaciju je potencijal pika povezan sa polutalasnim potencijalom relacijom:

$$E_p = E_{1/2} - \frac{\Delta E}{2} \quad (50)$$

dok se za redukciju znak menja. Sa porastom ireverzibilnosti E_p se udaljava od reverzibilne vrednosti $E_{1/2}$, širina pika se povećava, a visina smanjuje. Za reverzibilan proces poluširina pika (širina pika na njegovoj poluvisini) se može izraziti kao:

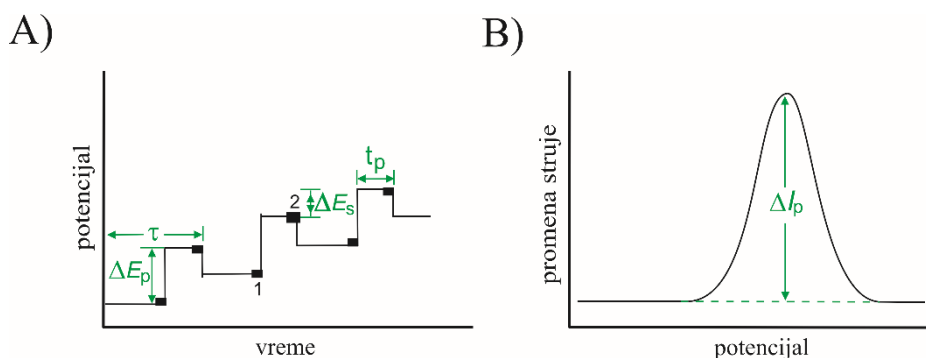
$$W_{1/2} = \frac{90,4 \text{ mV}}{n} \quad (51)$$

što znači da je poluširina pika obrnuto srazmerna broju elektrona: za jednoelektronski reverzibilan proces iznosi oko 90,4 mV, a za dvoelektronski oko 45,2 mV. Ireverzibilni procesi obično daju šire pikove od teorijskih reverzibilnih vrednosti [442].

Linearna zavisnost potencijala pika od pH se i ovom slučaju može prikazati jednačinom:

$$E_p = a \cdot \text{pH} + b \quad (52)$$

Nagib ove zavisnosti koristi se za procenu učešća protona; vrednosti bliske 59 mV po jedinici pH pri 25 °C ukazuju da u procesu učestvuje jednak broj protona i elektrona [442,444].



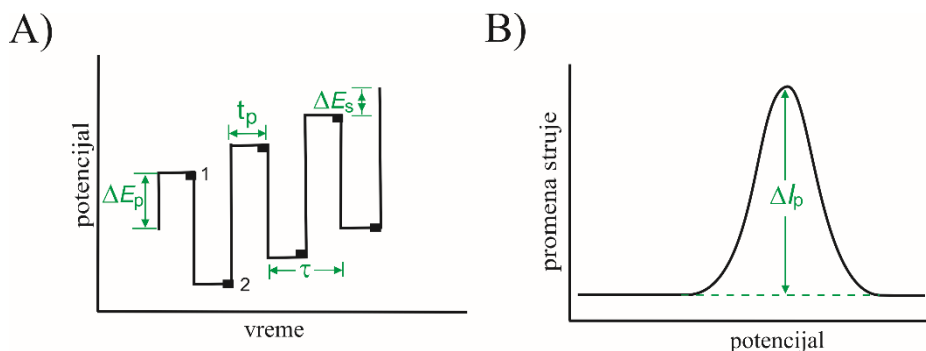
Slika 1.27. Šematski prikaz diferencijalno pulsne voltametrije: A) promena potencijala elektrode tokom vremena, sa nizom potencijalnih pulseva definisanih amplitudom pulsa (ΔE_p), korakom potencijala (ΔE_s), trajanjem pulsa (t_p) i vremnom ciklusa (τ); B) karakterističan signal u obliku pika prikazan kao promena struje u funkciji potencijala, pri čemu ΔI_p predstavlja razliku struja izmerenih pre i na kraju pulsa. Prilagođeno na osnovu reference [436].

Voltametrija pravougaonih talasa (SWV) je pulsna tehnika u kojoj se na stepeničasti potencijal superponira kvadratni talas, a struja se meri na kraju direktnog i povratnog poluciklusa (Slika 1.28). Neto signal dobija se kao razlika te dve vrednosti:

$$\Delta I = I_f - I_b \quad (49)$$

gde su I_f direktna, a I_b povratna struja. Zbog ovakvog načina merenja SWV pokazuje veliku osetljivost, kratko vreme analize i manji doprinos nefardejske struje. Direktna, povratna i neto komponenta struje mogu se analizirati odvojeno, ali je neto signal najčešće najkorisniji za analitičku interpretaciju [442].

Glavna prednost SWV je mogućnost rada pri visokim efektivnim brzinama skeniranja, čak do reda 1 Vs^{-1} , zbog čega je vreme analize kratko, a problemi sa blokiranjem površine elektrode manje izraženi nego kod DPV. Zbog toga se SWV često koristi za brzu i osetljivu analizu na složenim ili modifikovanim površinama [442].



Slika 1.28. Šematski prikaz voltametrije pravougaonih talasa: A) promena potencijala elektrode tokom vremena, pri čemu su označeni amplituda pulsa (ΔE_p), trajanje pulsa (t_p), vreme ciklusa (τ) i korak potencijala (ΔE_s); B) karakterističan signal u obliku pika prikazan kao promena struje u funkciji potencijala, pri čemu ΔI_p predstavlja razliku struja izmerenih u označenim tačkama tokom jednog ciklusa. Prilagođeno na osnovu reference [436].

1.9.2.2. DNK-biosenzor i ispitivanje konstante vezivanja za DNK

Elektrohemijski DNK-biosenzor predstavlja analitički sistem u kojem je DNK imobilizovana na površini elektrode i ima ulogu biološkog elementa prepoznavanja. Elektroda u ovom sistemu interakciju DNK sa analitom prevodi u merljiv električni signal na granici elektroda-rastvor. Takvi biosenzori se koriste za proučavanje interakcija lek-DNK, ispitivanje genotoksičnosti i oštećenja genetskog materijala, kao i za određivanje jedinjenja koja selektivno stupaju u interakciju sa oligonukleotidima ili dvolančanom DNK (engl. *double-stranded DNA*, dsDNA) [441,442].

Imobilizacija DNK na površini elektrode može se ostvariti različitim pristupima, uključujući fizičku adsorpciju DNK na elektrodnu površinu, uklapanje biomolekula u kompozitnu matricu, polimerni film ili sol-gel mrežu, kao i kovalentno vezivanje preko aktiviranih funkcionalnih grupa. U elektrohemijskim studijama interakcija lek-DNK GCE elektroda predstavlja jednu od često primenjivanih elektroda, pri čemu se dvolančana DNK može imobilizovati na njenoj površini fizičkom adsorpcijom. U zavisnosti od načina pripreme mogu se dobiti tanki, široki ili višeslojni DNK filmovi. Višeslojna organizacija je naročito korisna kada se želi potpuno prekrivanje površine elektrode DNK slojem, kako bi promena signala poticala prvenstveno od interakcije ispitivanog jedinjenja sa imobilisanom DNK, a ne od nespecifične adsorpcije slobodnog jedinjenja na голу elektrodu [441,442].

Elektrohemijska detekcija DNK najčešće se zasniva na direktnoj oksidaciji purinskih baza, pre svega guanina i adenina, odnosno njihovih rezidua u imobilisanoj DNK. Na ugljeničnim elektrodama purinske baze i njihovi nukleotidi i nukleozidi obično daju izraženije oksidacione signale od pirimidinskih baza, dok na oblik, položaj i intenzitet pikova utiču osobine površine elektrode, adsorpcija DNK na elektrodi, sekvenca i strukturna organizacija nukleinske kiseline. Kako šećerne komponente i fosfatne grupe nisu elektroaktivne, pomeranje voltametrijskih pikova nukleozida i

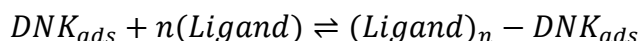
nukleotida, odnosno otežan transfer elektrona, u odnosu na same baze, najverovatnije je posledica glikozidne veze. Prisustvo fosfatne grupe dodatno smanjuje intenzitet struje pika, zbog čega nukleotidi daju slabiji signal od nukleozida. Zbog toga promena visine i/ili položaja oksidacionih pikova dezoksiguanozina (dG) i dezoksiadenozina (dA) može služiti kao pokazatelj interakcije liganda sa imobilisanom DNK [442,446].

U studijama interakcije lek–DNK često se prati smanjenje oksidacionog pika guanina ili adenina nakon vezivanja liganda za imobilisanu DNK. Jedan od uobičajenih načina izražavanja promene odziva jeste normalizovani signal, na primeru pika dA:

$$d(dA)\% = \frac{I_{p\text{-kompleks},dA}}{I_{p\text{-DNK},dA}} \times 100 \quad (50)$$

gde je $I_{p\text{-DNK},dA}$ intenzitet struje pika dezoksiadenozina pre interakcije, a $I_{p\text{-kompleks},dA}$ intenzitet struje pika nakon vezivanja liganda za DNK. Ovakav pristup omogućava poređenje različitih koncentracija i vremena inkubacije preko relativne promene signala [441].

Primenom višeslojnog DNK-biosenzora može se odrediti prividna konstanta vezivanja kompleksa liganda sa DNK adsorbovanom na površini elektrode. Pri tome je koncentracija DNK koja se nanosi na površinu elektrode konstantna, dok se koncentracija analita u rastvoru postepeno povećava [447]. Ravnotežna reakcija formiranja kompleksa liganda sa adsorbovanom DNK može se predstaviti kao:



Iz ove reakcije konstanta ravnoteže definiše se kao:

$$K = \frac{[(Ligand)_n - DNK_{ads}]}{[DNK_{ads}][Ligand]^n} \quad (51)$$

gde n predstavlja molarni odnos vezanog liganda prema molarnoj količini baza DNK, a ravnotežne koncentracije pojedinačnih komponenti posmatraju se kao deo ukupne koncentracije u reakcionoj smeši:

$$[DNK_{ads}] = c(DNK_{ads}) - [(Ligand)_n - DNK_{ads}] \quad (52)$$

i

$$[Ligand] = c(Ligand) - [(Ligand)_n - DNK_{ads}] \quad (53)$$

Na osnovu opšteg *Hill*-ovog modela kooperativnosti [448], uvodi se frakcija vezanog liganda f , koja je data kao odnos koncentracije kompleksirane DNK i maksimalne moguće koncentracije kompleksa:

$$f = \frac{[(Ligand)_n - DNK_{ads}]}{[(Ligand)_n - DNK_{ads}]_{maks}} \quad (54)$$

Ista frakcija može se izraziti i preko koncentracije liganda i konstante disocijacije K_d :

$$f = \frac{[Ligand]^n}{[Ligand]^n + K_d^n} \quad (55)$$

pri čemu za konstantu vezivanja (K) važi:

$$K = K_d^{-1} \quad (56)$$

Pošto u interakciji učestvuju parovi baza DNK, maksimalna koncentracija kompleksa $[(Ligand)_n - DNK_{ads}]_{maks}$ predstavlja maksimalan broj baza DNK koje mogu biti kompleksirane, dok $[(Ligand)_n - DNK_{ads}]$ predstavlja koncentraciju baza koje su kompleksirane pri datoj koncentraciji liganda. Zato razlika između ove dve vrednosti predstavlja koncentraciju slobodnih parova baza dostupnih za vezivanje:

$$[DNK_{ads}] = [(Ligand)_n - DNK_{ads}]_{maks} - [(Ligand)_n - DNK_{ads}] \quad (57)$$

Sledeći korak je povezivanje količine kompleksa sa voltametrijskim signalom. Pretpostavlja se da su struje pika proporcionalne količini elektroaktivnih mesta, pa važi:

$$I_{p-kompleks} = K \cdot n \cdot [(Ligand)_n - DNK_{ads}] \quad (58)$$

$$I_{p-DNK} = K \cdot n \cdot [(Ligand)_n - DNK_{ads}]_{max} \quad (59)$$

gde je k proporcionalna konstanta, $I_{p-kompleks}$ struja pika nakon vezivanja liganda, a I_{p-DNK} struja pika same DNK. Iz Hill-ovog modela dobija se i izraz:

$$\frac{f}{1-f} = K^n \cdot [Ligand]^n \quad (60)$$

Pošto se frakcija vezivanja može izraziti preko struja pika kao:

$$f = \frac{I_{p-kompleks}}{I_{p-DNK}} \quad (61)$$

sledi:

$$1 - f = \frac{I_{p-DNK} - I_{p-kompleks}}{I_{p-DNK}} \quad (62)$$

Uvrštavanjem u prethodnu jednačinu dobija se:

$$\frac{I_{p-kompleks}}{I_{p-DNK} - I_{p-kompleks}} = K^n \cdot [Ligand]^n \quad (63)$$

Logaritmovanjem obe strane dobija se linearni oblik:

$$\log \left(\frac{I_{p-kompleks}}{I_{p-DNK} - I_{p-kompleks}} \right) = n \log K + n \log [Ligand] \quad (64)$$

Ova jednačina omogućava određivanje konstante vezivanja. Iz nagiba prave dobija se n , a iz odsečka na ordinati vrednost potrebna za izračunavanje K .

Na osnovu vrednosti konstante vezivanja, kao i smera pomeraja potencijala pika pri interakciji sa DNK, moguće je orijentaciono proceniti način vezivanja liganda za DNK. Više vrednosti K ukazuju na jači afinitet i često se povezuju sa interkalacijom, dok niže vrednosti K češće odgovaraju vezivanju za žleb ili elektrostatičkim interakcijama. Pomeraj signala ka pozitivnijim potencijalima obično

ukazuje na interkalaciju, dok pomeraj ka negativnijim potencijalima može ukazivati na elektrostatičku interakciju [449].

Iz određene konstante vezivanja može se izračunati standardna promena *Gibbs*-ove slobodne energije, ΔG , koja predstavlja meru termodinamičke povoljnosti i stabilnosti formiranog kompleksa adsorbovane DNK i analita. Standardna promena *Gibbs*-ove slobodne energije izračunava se prema jednačini:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (65)$$

gde je R univerzalna gasna konstanta, T apsolutna temperatura, a K konstanta vezivanja. Negativna vrednost ΔG ukazuje da je proces vezivanja termodinamički povoljan i spontan pod ispitivanim uslovima, dok pozitivna vrednost ΔG ukazuje na termodinamički nepovoljan, odnosno nespontan process [450].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je integrisano eksperimentalno, i heminformatičko ispitivanje strukturnih, farmakofornih, farmakokinetičkih i toksikoloških osobina odabranih kinaznih inhibitora i strukturno srodnih jedinjenja, sa posebnim fokusom na procenu njihove permeabilnosti kroz krvno-moždanu barijeru, potencijal za interakciju sa DNK i racionalni dizajn novih selektivnih inhibitora PI3K α izoforme.

Specifični ciljevi istraživanja obuhvataju:

1. Procena permeacije kinaznih inhibitora i strukturno srodnih jedinjenja kroz krvno-moždanu barijeru

- *In vitro* određivanje pasivne permeabilnosti odabranih kinaznih inhibitora kroz KMB, derivata hinazolina i pirimidina, kao i strukturno sličnih derivata hinolina, tiazola i selenazola, primenom PAMPA-KMB testa.
- Tumačenje eksperimentalno određene permeabilnosti ispitivanih jedinjenja kroz KMB u odnosu na dostupne kliničke podatke, uz razmatranje *in silico* predviđenih farmakokinetičkih parametara koji mogu uticati na njihov *in vivo* prolazak kroz KMB.
- Formiranje, poređenje i validaciju QSPR modela za predviđanje permeabilnosti jedinjenja kroz KMB, uključujući MLR, ANN i SVR modele.
- Procenu mogućnosti primene razvijenih modela kao alata za preliminarni izbor jedinjenja sa povoljnim profilom permeabilnosti kroz KMB.

2. Ispitivanje oksidoredukcionih osobina erlotiniba (inhibitora EFGR 4-anilinohinazoliniskog tipa) i njegovog potencijala za interakciju sa DNK

- Elektrohemijску karakterizaciju erlotiniba primenom voltametrijskih tehnika, sa ciljem ispitivanja njegovih oksidoredukcionih osobina i faktora koji utiču na elektrodne procese.
- Ispitivanje interakcije erlotiniba sa DNK, primenom elektrohemijskog DNK-biosenzora, uključujući procenu tipa vezivanja, kao i određivanje konstante vezivanja.
- *In silico* ispitivanje mogućih načina vezivanja erlotiniba za DNK primenom molekuskog dokinga i simulacija molekulske dinamike, uz karakterizaciju ostvarenih interakcija i stabilnosti formiranog kompleksa.
- Poređenje eksperimentalnih i računarskih rezultata u cilju sveobuhvatnijeg tumačenja potencijalne interakcije erlotiniba sa DNK.

3. Primena CADD metoda u ispitivanju selektivnih inhibitora PI3K α

- Ispitivanje načina vezivanja selektivnih inhibitora PI3K α , koji pripadaju derivatima benzoksazepina i tiazola, sa sve četiri PI3K izoforme - PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ primenom molekuskog dokinga i simulacija molekulske dinamike.
- Identifikaciju ključnih interakcija i strukturnih karakteristika koje doprinose afinitetu i selektivnosti prema PI3K α izoformi u odnosu na ostale PI3K izoforme.
- Primena predviđenih bioaktivnih konformacija liganada u formiranju 3D-QSAR modela za sve četiri izoforme enzima.
- Validacija i mehanistička interpretacija 3D-QSAR modela radi određivanja ključnih steričkih, elektrostatičkih, hidrofobnih i drugih farmakofornih karakteristika značajnih za selektivnu inhibiciju PI3K α .
- Uporedna analiza doking i 3D-QSAR rezultata radi formiranja strategije za dizajn novih potencijalno selektivnih PI3K α inhibitora.
- Primenu virtuelnog skrininga zasnovanog na strukturi ciljnog mesta radi identifikacije novih strukturno različitih jedinjenja sa potencijalnim inhibitornim dejstvom na PI3K α .

4. Racionalni dizajn i selekcija novih potencijalno selektivnih PI3K α inhibitora

- Primenu *scaffold-hopping* pristupa radi identifikacije novih osnovnih struktura koje zadržavaju ključne farmakoforne karakteristike prethodno definisane 3D-QSAR i doking analizama na PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ izoformama.
- Dizajn novih potencijalnih PI3K α inhibitora i procenu njihove aktivnosti, selektivnosti i načina vezivanja primenom prethodno razvijenih 3D-QSAR modela i molekuskog dokinga na PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ izoformama.
- *In silico* karakterizaciju farmakokinetičkih i toksikoloških (ADMET) osobina novodizajniranih jedinjenja primenom *online* platformi na različitim računarskim prediktivnim pristupima.
- Procenu potencijala dizajniranih jedinjenja za prolazak kroz KMB primenom prethodno razvijenih QSPR modela permeabilnosti.
- Procenu strukturnih karakteristika dizajniranih jedinjenja relevantnih za moguća buduća elektrohemijska ispitivanja i interakcije sa biološkim makromolekulima.
- Odabir najperspektivnijih kandidata na osnovu integrisane procene predviđene aktivnosti, selektivnosti na PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ izoformama, i ADMET profila.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Opšti podaci

3.1.1. Standardi i hemikalije

Proizvođač komercijalnih standarda u ovoj disertaciji je Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD i uključuju:

- Afatinib
- Aksitinib
- Dabrafenib-mezilat
- Erlotinib-hidrohlorid
- Everolimus
- Fasudil
- Gefitinib
- Haloperidol
- Imatinib
- Imatinib EP nečistoća C (N-dezmetilimatinib)
- Krizotinib
- Lapatinib-ditozilat
- Levodopa
- Nilotinib-hidrohlorid
- Nintedanib-esilat
- Palbociklib
- RKI-1447
- Ruksolitinib-fosfat
- Vemurafenib

Dodatna ispitivana jedinjenja 1–17 (Slika 3.1), korišćena u izradi disertacije, dobijena su zahvaljujući saradnji sa istraživačkim grupama prof. V. Savića sa Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, prof. N. Filipovića sa Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu i prof. T. Todorović sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Hemikalije i reagensi korišćeni u disertaciji su:

- Amonijak, p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Acetonitril HPLC čistoće (J.T. Baker, Deventer, Holandija)
- Amonijak, p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Amonijum-hlorid, p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Apsolutni etanol (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- Dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka)
- Dezoksiribonukleinska kiselina iz timusa teleta, ct-DNK, natrijumova so, broj proizvoda D 1501 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Dimetil-sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Dodekan, ReagentPlus®, ≥99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Kalijum-dihidrogenfosfat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Limunska kiselina, p.a. (Fisher Scientific, Loughborough, UK)
- Metanol HPLC čistoće (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum-acetat, p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Natrijum-citrat dihidrat, p.a. (Fisher Scientific, Loughborough, UK)
- Natrijum-dihidrogenfosfat, p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)

- Natrijum-hidrogenfosfat (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Natrijum-hidrogenfosfat, p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Natrijum-hlorid, ACS reagents, ≥99% (J.T. Baker, Deventer, Holandija)
- Polarni lipidi mozga svinje, katalogski broj 141101C (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, SAD)
- Sirćetna kiselina, p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Visokoprečišćeni azot (Messer Tehnogas, Beograd, Srbija)
- Al₂O₃ prah, veličina čestica 0,05 μm (Metrohm Autolab, Utrecht, Holandija)

3.1.2. Oprema

Oprema korišćena za izvođenje eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije obuhvatala je:

- Ag/AgCl referentna elektroda (3,00 M KCl) (Metrohm, Herisau, Švajcarska)
- μ-Autolab analizator (Eco Chemie, Utrecht, Holandija)
- Dionex UltiMate 3000 HPLC sistem (Thermo Scientific, Germering, Nemačka)
- Elektroda od staklastog ugljenika, GCE, d = 3 mm (CH Instruments, Inc., Austin, TX, SAD)
- PAMPA ploče sa filter membranama (MultiScreen-HV, 0.45 μm, clear, cat. no. MAHVN4510) (Millipore, Billerica, MA, SAD)
- pH metar PHM 220 sa kombinovanom pH elektrodom Radiometer GK2401B (Radiometer, Danska)
- Platinska pomoćna elektroda (Metrohm, Herisau, Švajcarska)
- Poroshell 120 EC-C18 kolona, 250 × 4,6 mm, veličina čestica 5 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- SCALTEC SBC 32 analitička vaga (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Nemačka)
- Troelektrodna elektrohemijaska ćelija (Metrohm, Herisau, Švajcarska)
- Ultrazvučno kupatilo „Iskra“ UZ 4R (Šentjernej, Slovenija)

3.1.3. Računarski programi

Računarski programi i serveri korišćeni za pripremu struktura, obradu podataka, molekulske modelovanje i *in silico* analize u ovoj doktorskoj disertaciji obuhvatali su:

- ADMET Predictor 13.1 (Simulations Plus, <https://www.simulations-plus.com/software/admetpredictor/>)
- AMBIT tautomer generator (<https://ambit.sourceforge.net/>)
- APBS 3.4.1 (<https://www.poissonboltzmann.org/>)
- BLAST (National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- CaFE 1.0 (Calculation of Free Energy, VMD plugin, https://github.com/HuiLiuCode/CaFE_Plugin)
- CGenFF (ParamChem, <https://cgenff.umaryland.edu/>)
- CHARMM-GUI (<https://www.charmm-gui.org/>)
- Cresset Spark 10.7.1 (Cresset, <https://cresset-group.com/software/spark/>)
- DataWarrior 5.5 (OpenMolecules, <https://openmolecules.org/datawarrior/>)
- Discovery Studio Visualizer 2021 (Dassault Systèmes BIOVIA, <https://www.3ds.com/products/biovia/discovery-studio/visualization>)
- DRAGON 6.5 (Kode srl, https://chm.kode-solutions.net/products_dragon.php)

- DUDE-Z server (<http://dudez.docking.org/>)
- ERRAT (<https://saves.mbi.ucla.edu/>)
- FLAP 2.2.2 (Molecular Discovery Ltd, <https://www.moldiscovery.com/software/flap/>)
- Gaussian 09W (Gaussian, Inc., <https://gaussian.com/>)
- GOLD 2022.2 (Cambridge Crystallographic Data Centre, <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/software/gold/>)
- GPES 4.9 (Eco Chemie/Metrohm Autolab, <https://www.metrohm.com/>)
- KNIME 5.1 (KNIME AG, <https://www.knime.com/>)
- MarvinSketch 20.8 (ChemAxon/Certara, <https://www.certara.com/marvin/>)
- MDAnalysis (<https://www.mdanalysis.org/>)
- MODELLER 10.1 (<https://salilab.org/modeller/>)
- NAMD 2.14 (University of Illinois, <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>)
- OpenBabel (<https://openbabel.org/>)
- Pentacle 1.07 (Molecular Discovery Ltd, <https://www.moldiscovery.com/software/pentacle/>)
- PlayMolecule (Acellera, <https://www.playmolecule.com/>)
- PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>)
- ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>)
- SPSS v.18.0 (IBM, <https://www.ibm.com/products/spss-statistics>)
- STATISTICA 13.6 (TIBCO Software Inc., <https://www.tibco.com/products/tibco-statistica>)
- SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://www.swissadme.ch/>)
- UCSF Chimera 1.17.3 (University of California, San Francisco, <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>)
- Visual Molecular Dynamics (VMD) 1.9.3 (University of Illinois, <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)

3.2. PAMPA-KMB ispitivanje i QSPR modelovanje permeabilnosti kinaznih inhibitora

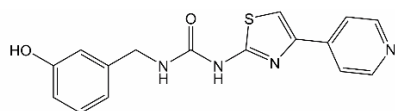
3.2.1. Izvođenje PAMPA testa

Efektivna permeabilnost 34 strukturno različita derivata ispitana je korišćenjem PAMPA-KMB testa [451]. Ispitivana jedinjenja su obuhvatala 15 odobrenih inhibitora protein kinaza - afatinib, aksitinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, krizotinib, lapatinib, nilotinib, nintedanib, ruksolitinib, palbociklib, dabrafenib, vemurafenib, everolimus i fasudil (Slike 1.3-1.10). Takođe su ispitivani N-dezmetilimatinib, nečistoća imatiniba definisana u Evropskoj farmakopeji kao imatinib EP nečistoća C, kao i i RKI-1447 kao eksperimentalni ROCK inhibitor. Radi proširenja seta podataka ispitivana su i nova eksperimentalna jedinjenja, uključujući dva sintetička derivata aril-2-aminopiridina, označena kao jedinjenja 1 i 2 [452] i petnaest piridinskih derivata tiazolil-hidrazona i selenazolil-hidrazona, označena kao jedinjenja 3–17 [453,454], od kojih su neka pokazala antineoplastičnu aktivnost, dok je za njihov strukturni skelet poznato da može ispoljavati inhibitornu aktivnost prema protein kinazama (Slika 3.1).

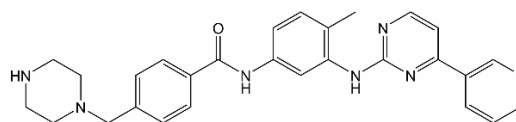
Početni rastvori su pripremljeni u dimetil-sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji od 5 mg/mL, koji su zatim razblaženi u fiziološkom fosfatnom puferu (PBS, pH = 7.4). PBS je pripremljen rastvaranjem 8,0 g natrijum-hlorida (NaCl), 2,38 g dinatrijum-hidrogenfosfata (Na₂HPO₄) i 0,19 g kalijum-dihidrogen fosfata (KH₂PO₄) u 1 L vode. Tween 80 je dodat u koncentraciji od 5% radi obezbeđivanja odgovarajuće rastvorljivosti jedinjenja sa niskom rastvorljivošću u puferu [398]. Konačna koncentracija radnih rastvora bila je 25 µg/mL, i takvi su korišćeni u PAMPA analizi. Pre izvođenja testa je ispitana permeabilnost levodope, kao polarnog jedinjenja sa niskom permeabilnošću, i haloperidola, kao lipofilnijeg jedinjenja sa višom permeabilnošću, u uslovima bez dodatka i sa

dodatkom Tween-a 80, radi procene uticaja ovog surfaktanta i provere primenljivosti modifikovanog PAMPA-KMB postupka.

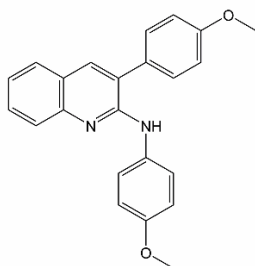
Veštačka membrana pripremljena je rastvaranjem 20 mg PBL-a u 1 mL dodekana. Po 4 μ L ovog rastvora naneto je na filter membrane ploče sa bunarićima. Donorski bunarići napunjeni su sa po 300 μ L radnih rastvora ispitivanih jedinjenja, dok je u akceptorske bunariće dodato po 300 μ L fosfatnog pufera sa 5% Tween-a 80. Nakon toga, akceptorska ploča je postavljena preko donorske ploče, formirajući sendvič-sistem, koji je zatvoren odozgo i obavijen parafilmom. Sistem je inkubiran tokom 18 sati na 25 °C.



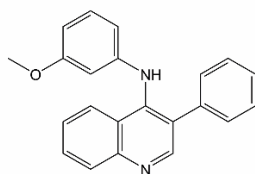
RKI-1447



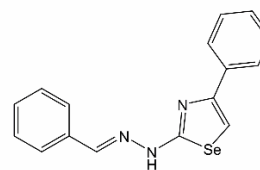
N-Dezmetilimatinib



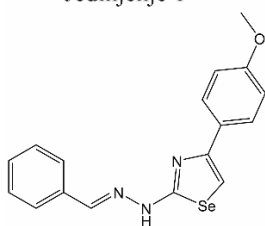
Jedinjenje 1



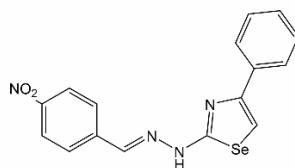
Jedinjenje 2



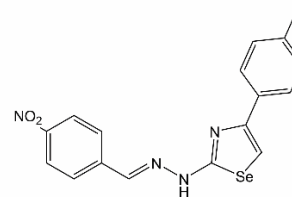
Jedinjenje 3



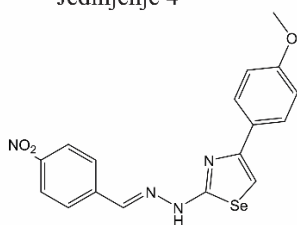
Jedinjenje 4



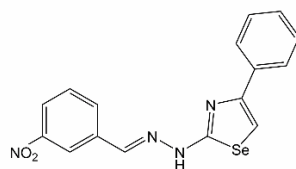
Jedinjenje 5



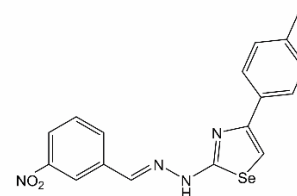
Jedinjenje 6



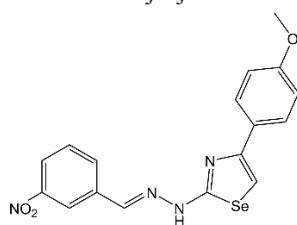
Jedinjenje 7



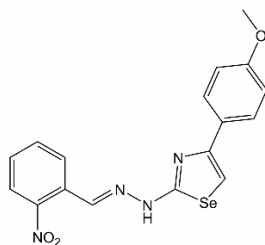
Jedinjenje 8



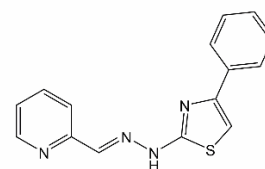
Jedinjenje 9



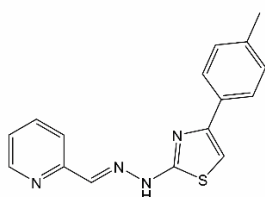
Jedinjenje 10



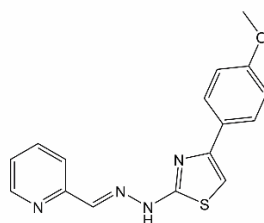
Jedinjenje 11



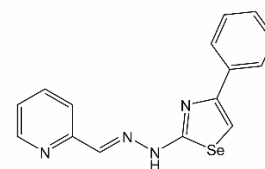
Jedinjenje 12



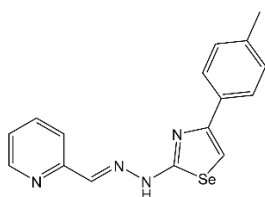
Jedinjenje 13



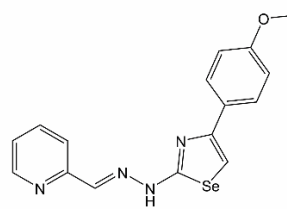
Jedinjenje 14



Jedinjenje 15



Jedinjenje 16



Jedinjenje 17

Slika 3.1. Strukturne formule dodatnih ispitivanih jedinjenja ispitivanih PAMPA testom.

Nakon inkubacije, sendvič-sistem je pažljivo razdvojen, a koncentracije jedinjenja u početnim rastvorima, kao i u rastvorima iz donorskih i akceptorskih bunarića, određene su primenom HPLC analize sa UV detekcijom (HPLC-UV). Svi uzorci analizirani su u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti izmerenih koncentracija. Efektivna permeabilnost ispitivanih jedinjenja izračunata je primenom sledećih jednačina:

$$VaCa(t) + VdCd(t) = VdCd(0)(1 - R) \quad (66)$$

$$P_e = - \frac{2.303Vd}{A(t - \tau_{lag})} \left(\frac{1}{1+r_v} \right) \log_{10} \left[1 - \left(\frac{1+r_v^{-1}}{1-R} \right) \frac{Ca(t)}{Cd(0)} \right] \quad (67)$$

u kojoj su:

Va – zapremina akceptorskog bunarića – 300 μ L;

Vd – zapremina donorskog bunarića – 300 μ L;

A – površina filtera – 0,28 cm^2 ;

t – vreme inkubacije – 64 800 s;

$Ca(t)$ – koncentracija jedinjenja u akceptorskim bunarićima nakon inkubacije;

$Cd(t)$ – koncentracija jedinjenja u donorskim bunarićima nakon inkubacije;

$Cd(0)$ – koncentracija jedinjenja u donorskim bunarićima pre inkubacije;

R – molska frakcija jedinjenja zadržana na membrani;

r_v – odnos zapremine donora (300 μ L) i akceptora (300 μ L) – $Vd/Va = 1$;

τ_{lag} – vreme potrebno za zasićenje membrane (približno 20 min).

3.2.2. Analiza rezultata PAMPA-KMB testa primenom HPLC metode

HPLC analiza je izvedena korišćenjem Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Germering, Nemačka) sistema opremljenog DAD (engl. *Diode Array Detector*) detektorom. Hromatografsko razdvajanje sprovedeno je na koloni Poroshell 120 EC-C18, dimenzija $250 \times 4,6$ mm, sa veličinom čestica od 5 μ m. Temperatura kolone održavana je na 30 °C, dok je temperatura autosampler bila podešena na 10 °C. Zapremina injektovanog uzorka iznosila je 20 μ L. Za većinu jedinjenja brzina protoka mobilne faze iznosila je 0,8 mL/min, dok je za jedinjenje 2 primenjena brzina protoka od 1,0 mL/min. UV detekcija sprovedena je na talasnim dužinama od 230, 254, 265 i 278 nm. Kao mobilna faza korišćena je smeša 10 mM fosfatnog pufera, pH 2,3, i acetonitrila (ACN), u različitim zapreminskim odnosima, od 30:70 do 90:10 (v/v).

3.2.3. Priprema seta podataka za PAMPA-KMB QSPR modelovanje

Strukture registrovanih kinaznih inhibitora preuzete iz baze podataka DrugBank [455] podvrgnute su hijerarhijskom klasterovanju u programu DataWarrior 5.5 [456]. Klasterovanje je izvedeno na osnovu FragFp molekulskih otisaka, odnosno binarnih otisaka zasnovanih na rečniku podstrukturnih

fragmenata, kako bi se proverilo da ispitivani set jedinjenja obuhvata različite tipove hemijskih struktura kinaznih inhibitora koji se koriste u kliničkoj praksi.

Dominantni oblici ispitivanih jedinjenja pri fiziološkoj vrednosti pH od 7,40 određeni su u programu MarvinSketch 20.8. Geometrije dobijenih struktura zatim su optimizovane u programu Gaussian 09W [457], najpre primenom semiempirijske PM3 metode (engl. *Parameterized Model revision 3*), a potom *Hartree-Fock* metodom sa baznim setom 3-21G.

3.2.4. Računanje molekulskih deskriptora

Softveri DRAGON 6.5 [458] i ADMET Predictor 13.1 [459] korišćeni su za izračunavanje niza različitih geometrijskih, elektronskih, topoloških i fizičkochemijskih deskriptora za ispitivani set podataka. Deskriptori sa malom ili nultom varijansom su uklonjeni. Takođe su provereni na kolinearnost, pri čemu su u izradi prediktivnog modela korišćeni samo deskriptori sa interkorelacijom manjom od 0,90. Za skaliranje deskriptora korišćena je *Z-score* normalizacija, čime je pripremljen konačan set od 910 deskriptora.

3.2.5. QSPR modelovanje

Za razvoj QSPR modela primenjeno je nekoliko metoda modelovanja. Deskriptori ispitivanih jedinjenja korišćeni su kao nezavisne varijable, dok je vrednost $\log P_e$, dobijena u PAMPA-KMB studiji, korišćena kao zavisna varijabla. Za razvoj QSPR modela primenjene su tri metode mašinskog učenja – MLR, ANN i SVR. Svi modeli razvijeni su korišćenjem softvera STATISTICA 13.6 [460].

Za izbor varijabli u razvoju MLR modela korišćena je *stepwise* regresija, na osnovu kriterijuma „*F* za uključivanje“ = 6 i „*F* za uklanjanje“ = 4. SVR i ANN modeli zatim su kreirani sa istim izabranim varijablama.

SVR modelovanje sprovedeno je radi ispitivanja mogućih nelinearnih zavisnosti između izabranih deskriptora i vrednosti $\log P_e$. Hiperparametri ε , C i γ optimizovani su tokom pretrage optimalnog modela, pri čemu su njihove vrednosti varirane u opsezima 10–45 za C , 0,01–0,10 za ε i 0,10–1,00 za γ . Kombinacije vrednosti hiperparametara iz navedenih intervala procenjivane su primenom desetostruka unakrsne validacije (engl. *10-fold cross-validation*), a optimalna kombinacija izabrana je na osnovu najmanje validacione greške, odnosno najboljih prediktivnih performansi modela. U postupku optimizacije SVR modela testirane su četiri funkcije jezgra: linearna, polinomijalna, RBF i sigmoidna funkcija jezgra.

ANN modeli sastojali su se od tri sloja: ulaznog sloja, jednog skrivenog sloja i izlaznog sloja. Za treniranje mreža korišćen je *Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno* (BFGS) algoritam. Sprovedena je automatska pretraga MLP i RBF regresionih neuronskih mreža, pri čemu je trenirano ukupno 100 mreža, a najbolja mreža je izabrana poređenjem performansi i grešaka u trening, test i validacionom setu. Kao funkcija greške (engl. *loss function*) korišćena je suma kvadrata grešaka (engl. *sum-of-squares*, SOS). Tokom treniranja testirane su sledeće aktivacione funkcije za skrivene i izlazne neurone: identitetska, logistička, hiperbolička tangentna, eksponencijalna i sinusna funkcija. Interval mogućeg broja skrivenih neurona je bio između 3 i 10.

Set podataka podeljen je na trening set ($n = 25$) i test set ($n = 9$) (Tabela 2.1). Trening set korišćen je za izradu modela, dok je test set korišćen za procenu njihove prediktivne sposobnosti. Test set je odabran tako da obuhvati različite tipove struktura i opseg vrednosti $\log P_e$. Za modelovanje ANN, trening set je dodatno podeljen na podset za treniranje, validacioni podset ($n = 4$) i interni test podset ($n = 5$).

Tabela 2.1. Trening i test setovi korišćeni za izradu QSPR modela

Trening set		Test set
Afatinib	Jedinjenje 2	Gefitinib
Aksitinib	Jedinjenje 4	RKI-1447
Dabrafenib	Jedinjenje 5	Ruksolitinib
Erlotinib	Jedinjenje 6	N-desmetil imatinib
Everolimus	Jedinjenje 7	Jedinjenje 1
Fasudil	Jedinjenje 9	Jedinjenje 3
Imatinib	Jedinjenje 11	Jedinjenje 8
Krizotinib	Jedinjenje 12	Jedinjenje 10
Lapatinib	Jedinjenje 14	Jedinjenje 13
Nilotinib	Jedinjenje 15	
Nintedanib	Jedinjenje 16	
Palbociklib	Jedinjenje 17	
Vemurafenib		

3.2.6. Validacija QSPR modela

Interna validacija razvijenih MLR, ANN i SVR modela sprovedena je izračunavanjem parametara R^2 , Q^2 i $RMSEE$. Vrednost Q^2 određena je primenom desetostruke unakrsne validacije.

Modeli su zatim podvrgnuti eksternoj validaciji [461], kojom je procenjena njihova prediktivna pouzdanost na osnovu parametara R_{pred}^2 i $RMSEP$. Za dodatnu procenu prediktivne sposobnosti izračunati su i parametri r-metrike: r_m^2 , $r_m^{1/2}$, $\overline{r_m^2}$ i Δr_m^2 [462]. Takođe je izračunat CCC parametar [463], radi dodatne procene slaganja između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti.

3.2.7. Domen primenljivosti

Za tačnu primenu QSAR modela neophodno je definisati njegov domen primenljivosti (AD), određen strukturama jedinjenja iz trening seta. *Leverage* pristup je primenjen u SPSS v.18.0 [464], kojim se procenjuje da li se aktivnost strukture može pouzdano predvideti, odnosno da li se jedinjenja nalaze u okviru hemijskog prostora obuhvaćenog trening setom jedinjenja.

3.3. **Elektrohemijsko i računarsko ispitivanje erlotiniba i njegove interakcije sa DNK**

3.3.1. Aparatura

Za voltametrijska merenja korišćen je μ -Autolab analizator sa GPES 4.9 softverom (Eco Chemie, Utrecht, Holandija). Kao radna elektroda korišćena je elektroda od staklastog ugljenika (GCE, $d = 3$ mm, CH Instruments, Inc., Austin, TX, SAD), dok su kao referentna i pomoćna elektroda korišćene Ag/AgCl (3,00 M KCl) i Pt elektroda, u okviru troelektrodne elektrohemijske ćelije. Pre svakog merenja GCE je pripremljena poliranjem na glatkoj podlozi za poliranje, sa vodenom suspenzijom Al_2O_3 praha (veličina čestica 0,05 μm). Nakon poliranja GCE je ultrazvučno tretirana po 2 minuta u dejonizovanoj vodi i apsolutnom etanolu. Ovo je rađeno u ultrazvučnom kupatilu „Iskra“ UZ 4R (Šentjernej, Slovenija). pH vrednosti su merene pomoću PHM 220 pH-metra sa kombinovanom elektrodom Radiometer GK2401B. Merenja mase vršena su na SCALTEC SBC 32 vagi.

3.3.2. Reagensi i rastvori

Dezoksiribonukleinska kiselina (natrijumova so, DNA teleta (engl. *calf thymus DNA*, ct-DNA), broj proizvoda D 1501) i erlotinib-hidrohlorid nabavljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich. Natrijum-citrat dihidrat i limunska kiselina (Fisher Scientific), natrijum-acetat, sirćetna kiselina, natrijum-hidrogenfosfat, natrijum-dihidrogenfosfat, amonijak i amonijum-hlorid (Sigma-Aldrich) korišćeni su kao hemikalije analitičke čistoće (*p.a.*).

Početni rastvor DNK koncentracije 73,95 µg/mL pripremljen je rastvaranjem u 0,1 M acetatnom puferu, pH 4,6. Sastav (eventualno prisustvo drugih nukleinskih frakcija pored dvolančane DNK), čistoća i stabilnost DNK uzorka ispitani su i potvrđeni u ranije objavljenom radu [465], primenom agarozne gel elektroforeze, UV-VIS spektrofotometrije i fluorimetrijskog Qubit BR dsDNA testa.

Početni rastvor erlotiniba (1×10^{-3} M) pripremljen je u metanolu i čuvan na 4 °C. Krajnji rastvori koncentracije 2×10^{-4} M pripremani su razblaživanjem početnog rastvora u različitim puferima, neposredno pre upotrebe. Korišćeni su citratni (pH 2,20 i 3,06), acetatni (pH 3,58, 4,64, 5,05 i 5,64), fosfatni (pH 5,89, 6,94 i 8,05) i amonijačni puferi (pH 8,51 i 8,90), svi sa jonskom jačinom 0,10 M (pripremljeni sa dejonizovanom vodom).

Eksperimenti su izvođeni na sobnoj temperaturi (25 °C). Radi uklanjanja rastvorenog kiseonika, visokoprečišćeni azot je propuštan kroz rastvore u ćeliji tokom 10 minuta pre svakog merenja, kao i iznad rastvora tokom samog merenja.

3.3.3. Priprema DNK-biosenzora

Višeslojni DNK-biosenzor je pripremljen nanošenjem tri kapi (po 5 µL) početnog rastvora DNK na prethodno pripremljenu GCE, pri čemu je svaka kap ostavljena da se suši 30 minuta u atmosferi azota. Nakon sušenja poslednje kapi, višak DNK uklonjen je ispiranjem površine senzora dejonizovanom vodom. Reproductivnost odziva senzora već je ispitana i potvrđena u prethodno objavljenom istraživanju [465]. Ovaj način pripreme senzora omogućio je potpunu pokrivenost površine DNK i sprečio nespecifično vezivanje erlotiniba.

3.3.4. Voltametrijska merenja

Za voltametrijska merenja korišćene su CV, DPV i SWV metode:

CV je sprovedena u opsegu potencijala od -1,6 V do +1,6 V (vs Ag/AgCl, 3 M KCl), počevši od 0 V, ka pozitivnim i negativnim potencijalima, sa brzinom promene potencijala od 0,01 V s⁻¹ do 0,10 V s⁻¹ i korakom potencijala od 0,005 V;

DPV je izvođena sa sledećim parametrima: korak potencijala 0,005 V, modulacija amplitude 0,05 V, vreme modulacije 0,05 s i interval 1 s;

SWV je izvođena pod sledećim uslovima: frekvencija 25 Hz, korak potencijala 0,001 V, efektivna brzina promene potencijala 0,025 V s⁻¹ i amplituda pulsa 0,005 V.

DPV i SWV voltamogrami su korigovani u odnosu na baznu liniju primenom metode pokretnih preseka sa prozorom od 0,005 V. Vrednosti vršnih struja određivane su iz originalnih voltamograma, dok su za grafički prikaz pikova voltamogrami zaglađivani *Savitzky-Golay* algoritmom (nivo 4). Sve analize vršene su korišćenjem GPES 4.9 softvera.

3.3.5. Molekulski doking

Pored voltametrijskih studija, sprovedena je i *in silico* analiza interakcije erlotiniba (ERL) sa DNA. Najpre je sproveden molekulski doking radi generisanja mogućeg ERL-DNK kompleksa. Slična *in silico* studija sprovedena je i od strane Chen i saradnika [466], gde je pokazano da se ERL vezuje za manji žljeb. Međutim, kako bi se dodatno istražila mogućnost različitih načina vezivanja, u okviru ove studije molekulski doking je izvršen i u manji žljeb i putem interkalacije. Kao referentno jedinjenje korišćen je lapatinib (LAP) [467], čija je interakcija sa DNA ranije ispitivana voltametrijski i spektroskopski [468].

Pre dokovanja, geometrijska optimizacija liganada izvršena je u programu Gaussian 09W [457], kombinovanjem semiempirijske PM3 metode i B3LYP/6-31G(d, p) energetske minimizacije.

Za doking su korišćene dve različite kristalne strukture dvolančane DNK iz PDB baze podataka (<https://www.rcsb.org/>): pdb: 1BNA za ispitivanje vezivanja za manji žljeb i pdb: 2D55 za ispitivanje interkalacije. Doking je sproveden pomoću softvera GOLD 2022.2 (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/software/gold/>). Prethodne studije (Srivastava i saradnici [469]) potvrdile su pouzdanost rezultata dobijenih korišćenjem GOLD softvera za proučavanje kompleksa liganda i nukleinskih kiselina.

Vezivni džep je definisan u radijusu od 8,0 Å od centralnog nukleotida, a GoldScore funkcija korišćena je za rangiranje predviđenih poza. Vizualizacija rezultata izvršena je pomoću Discovery Studio Visualizer 2021.

3.3.6. Molekulska dinamika

Radi dodatnog ispitivanja interakcije ERL sa DNK, kompleksi dobijeni molekulskim dokingom podvrgnuti su MD simulacijama. Generisanje ulaznih fajlova vršeno je na CHARMM-GUI serveru (<https://www.charmm-gui.org/>). Kompleksi su solvatisani u pravougaonoj simulacionoj kutiji molekula vode TIP3P modela sa 10 Å odstojanja od ivica. Natrijumovi i hloridni joni dodati su metodom Monte Karla radi neutralizacije sistema i postizanja konačne koncentracije od 0,15 M.

CHARMM36m [470] polje sila je korišćeno za DNK molekul, a CGenFF je upotrebljen za generisanje topologija i parametara [471] za ERL i LAP. Pre simulacija izvršena je minimizacija (10 000 koraka). Nakon toga sprovedena je NVT ekvibracija u trajanju od 250 ps, pri čemu je sistem zagrejan do 310,15 K. Zatim je sprovedena produkciona NPT simulacija u trajanju od 50 ns. Za proračun nevezanih interakcija korišćene su granična udaljenost odsecanja interakcija, udaljenost početka izgladivanja potencijala i udaljenost liste parova, koje su iznosile 12 Å, 10 Å i 16 Å, redom. Parametri 1–4 interakcija primenjeni su u skladu sa korišćenim poljem sila.

Za simulacije su korišćeni PBC uslovi, dok je za obračun dugodosežnih elektrostatičkih interakcija korišćen PME metod. Za kontrolu temperature korišćena je Langevin metoda sa koeficijentom trenja od 1 ps⁻¹, dok je za kontrolu pritiska korišćen Langevin-piston metod (Nosé-Hoover Langevin piston), sa periodom klipa od 50 fs i vremenom opadanja od 25 fs. Vremenski korak simulacije iznosio je 2 fs.

Simulacije su izvedene u softveru NAMD 2.14, dok je neophodna analiza izvršena u softveru VMD 1.9.3 (<https://www.ks.uiuc.edu/>).

Dobijene NAMD trajektorije korišćene su za izračunavanje slobodne energije vezivanja primenom MM/PBSA metode. Pre izvođenja proračuna, svi molekuli rastvarača i naelektrisani joni uklonjeni

su iz MD trajektorija. Za proračun slobodne energije vezivanja korišćeni su snimci iz poslednjih 1 ns trajektorija.

Proračun je izveden pomoću CaFE 1.0 dodatka [472] u VMD softveru. Metoda se sastoji iz tri komponente – MM (molekulska mehanika za gasno-faznu energiju – ΔG_{gas}), PB (*Poisson-Boltzmann* za polarnu energiju solvatacije – ΔG_{sol}^{polar}) i SA (površinska oblast za nepolarnu energiju solvatacije – $\Delta G_{sol}^{nonpolar}$). Razlika gasno-fazne energije kompleksa i odvojenih DNA i liganda izračunata je pomoću NAMD softvera, dok je za proračun polarne energije solvatacije korišćen APBS 3.4.1 softver (<https://server.poissonboltzmann.org/apbs>). Za računanje PB komponente korišćene su vrednosti dielektrične konstante od 4 za unutrašnju i 80 za spoljašnju sredinu. Nakon toga, nepolarna energija solvatacije izračunata je pomoću VMD softvera.

Jednačina za dobijanje slobodne energije vezivanja glasi:

$$\Delta G_{bind} = \Delta H - T\Delta S = \langle \Delta G_{gas} + \Delta G_{sol}^{polar} + \Delta G_{sol}^{nonpolar} - T\Delta S \rangle \quad (68)$$

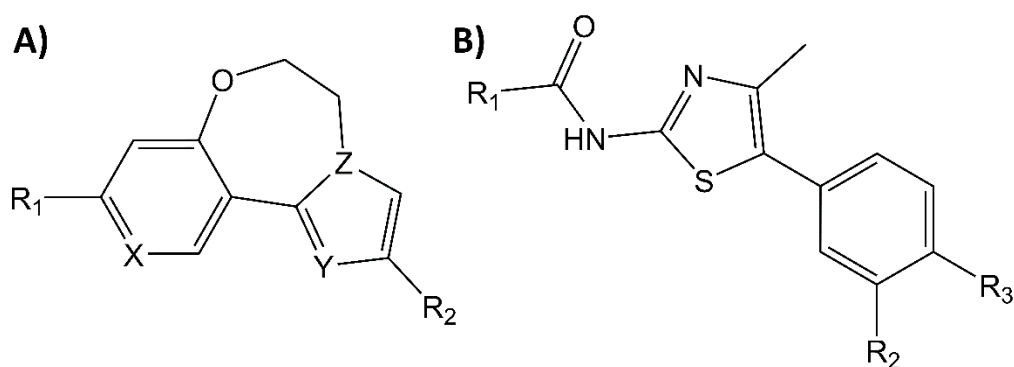
CaFE 1.0 softverski dodatak isključuje entropijski član iz proračuna zbog netačnosti aproksimacija i dugotrajnosti proračuna.

3.4. Računarski dizajn i *in silico* karakterizacija potencijalno selektivnih PI3K α inhibitora

3.4.1. Priprema seta podataka i proteinskih struktura

Iz ChEMBL baze podataka (www.ebi.ac.uk/chembl/) prikupljeno je 37 inhibitora PI3K α , sa aktivnostima prema svakoj izoformi izraženim kao negativni logaritam konstante inhibicije ($pK_i = -\log K_i$). Set podataka obuhvata triciklične derivate benzoksazepina, označene kao Bzo klaster, uključujući taselisib (CHEMBL2387080) [23], kao i derivate tiazola, označene kao Thz klaster [24] (Slika 3.2). Opsezi pK_i vrednosti iznosili su 5,67–10,52 za izoformu PI3K α , 5,70–8,32 za PI3K β , 5,24–9,19 za PI3K γ i 5,44–9,92 za PI3K δ .

Strukture ispitivanog seta jedinjenja, zajedno sa njihovim pK_i vrednostima, date su u Prilozima, u Tabelama P1.1 i P1.2. Program MarvinSketch 24.3.2 (<http://www.chemaxon.com>) korišćen je za određivanje dominantnih formi jedinjenja pri fiziološkoj vrednosti pH od 7,4. Odabrane forme zatim su podvrgnute energetske minimizaciji primenom PM3 metode u softveru Gaussian 09W [457].



Slika 3.2. Opšte strukturne formule skeleta koji predstavljaju A) Bzo klaster i B) Thz klaster inhibitora PI3K α .

Kristalne strukture izoformi PI3K α , PI3K γ i PI3K δ su preuzete iz Protein Data Bank baze (<https://www.rcsb.org/>) (PDB ID: 5DXH, 6FH5 i 5DXU, redom), nakon čega su izdvojene odgovarajuće p110 podjedinice. Budući da rendgenska struktura humane izoforme PI3K β nije dostupna, za p110 podjedinicu ove izoforme konstruisan je homologni model, korišćenjem mišje PI3K β strukture kao šablona (PDB ID: 2Y3A). BLAST server (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) je korišćen za proveru poravnanja sekvenci humane i mišje p110 podjedinice PI3K β , kako bi se procenila opravdanost upotrebe izabrane šablon-strukture za homologno modelovanje.

3.4.2. Homologno modelovanje

Homologno modelovanje p110 subjedinice PI3K β , kao i dodavanje neterminalnih nedostajućih ostataka u strukturama drugih izoformi, izvedeno je u softveru MODELLER 10.1 [473], preko Chimera 1.17.3 GUI [474] servera. Korišćena su podrazumevana podešavanja pri kojim je omogućeno pomeranje jednog ostatka koji se nalazi neposredno uz nedostajući region. Za modelovanje petlji primenjen je DOPE-HR protokol [475]. Nakon generisanja 1000 modela, za dalji rad izabran je model sa najnižim zDOPE skorom. Validacija homolognog modela PI3K β sprovedena je pomoću alata PROCHECK [241], ERRAT [476] i ProSA [243].

Kristalne strukture PI3K α , PI3K γ i PI3K δ , kao i homologni model PI3K β , protonovani su pri fiziološkoj vrednosti pH od 7,4 korišćenjem PlayMolecule servera [477].

3.4.3. Simulacije molekulske dinamike

Molekulski doking najpre je sproveden radi dobijanja kompleksa pripremljenih izoformi PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ sa reprezentativnim jedinjenjima iz oba klastera, Bzo i Thz. Kao predstavnici ovih klastera izabrani su ChEMBL3770993 i ChEMBL2071338, odnosno derivati benzoksazepina i tiazola sa najvećom inhibitornom aktivnošću prema PI3K α , koji su u daljem tekstu označeni kao **B1** i **T1**. Ova dva jedinjenja dokovana su u sve četiri izoforme PI3K. Doking je izveden korišćenjem softvera GOLD 2023.3 [478]. Tokom postupka, ligandi i aminokiseline aktivnog mesta tretirani su kao rigidni. Vezivni džep definisan je u radijusu od 6,0 Å od liganda prisutnog u aktivnom mestu enzima, bez primene ograničenja. Za rangiranje predviđenih poza korišćena je ChemPLP funkcija. Validacija postupka izvršena je ponovnim dokovanjem kristalno vezanih liganada i poređenjem RMSD vrednosti teških atoma, čime je potvrđena ispravnost primenjene procedure [254].

Višestruke MD simulacije sprovedene su radi optimizacije homolognog modela PI3K β , kao i radi dobijanja više proteinskih konformacija za sve komplekse PI3K-inhibitora: PI3K α -B1, PI3K α -T1, PI3K β -B1, PI3K β -T1, PI3K γ -B1, PI3K γ -T1, PI3K δ -B1 i PI3K δ -T1. Priprema simulacija izvršena je na CHARMM-GUI serveru [479,480]. Kompleksi su solvatisani u pravougaonom boksu TIP3P vode, uz rastojanje od 8 Å od ivica boksa. Za neutralizaciju sistema dodati su Na⁺ i Cl⁻ joni Monte Karlo metodom, do konačne koncentracije od 0,15 M. Za generisanje topologija i parametara proteina korišćeno je CHARMM36m polje sila [470,480], dok je za ligande korišćen CGenFF [471].

Pre početka simulacija sprovedena je minimizacija u 10 000 koraka. NVT ekvilibracija trajala je 250 ps, uz zagrevanje sistema do 310,15 K. Produkciona NPT simulacija trajala je 50 ps. Za proračun nevezanih interakcija korišćene su granična udaljenost odsecanja interakcija, udaljenost početka izgladivanja potencijala i udaljenost liste parova, koje su iznosile 12 Å, 10 Å i 16 Å, redom. Parametri 1–4 interakcija primenjeni su u skladu sa korišćenim poljem sila. Korišćeni su periodični granični uslovi, dok je PME metod primenjen za dugodosežne elektrostatičke interakcije. Temperatura je kontrolisana Langevin-ovim termostatom, uz koeficijent trenja od 1 ps⁻¹, a pritisak Langevin-piston metodom, uz period klipa od 50 fs i vreme opadanja od 25 fs. Vremenski korak simulacije iznosio je 2 fs, a snimci su čuvani na svakih 10 ps.

Simulacije su izvedene u programu NAMD 2.14 [481], dok su analize sprovedene u VMD 1.9.3 softveru (<https://www.ks.uiuc.edu/>) i pomoću MDAnalysis Python biblioteke [482,483]. Konformaciona stanja enzima iz stabilnog dela produkcione faze, nakon 30 ns simulacije, klasterovana su u programu Chimera 1.17.3 [484] na osnovu *RMSD* vrednosti aminokiselinskih ostataka aktivnog mesta. Izabrani su centriodi pet najbrojnijih klastera. Dobijene konformacije analizirane su prema ostvarenim interakcijama i korišćene su za dalje ansambl doking studije.

3.4.4. Ansambl doking

Nakon MD simulacija sproveden je ansambl doking radi dobijanja kompleksa svih jedinjenja iz seta podataka sa svim PI3K izoformama. Za ovu analizu korišćeni su centriodi pet najbrojnijih klastera izdvojenih iz MD trajektorija. Tačnije, pet konformacija dobijenih iz simulacija kompleksa PI3K α -B1, PI3K β -B1, PI3K γ -B1 i PI3K δ -B1, označenih kao α Bzo1-5, β Bzo1-5, γ Bzo1-5 i δ Bzo1-5, korišćeno je za dokovanje Bzo jedinjenja (**B1–B19**). Na isti način, pet konformacija iz simulacija kompleksa PI3K α -T1, PI3K β -T1, PI3K γ -T1 i PI3K δ -T1, označenih kao α Thz1-5, β Thz1-5, γ Thz1-5 i δ Thz1-5, korišćeno je za doking Thz jedinjenja (**T1–T18**).

Ansambl doking izveden je u programu GOLD 2023.3 [478], pri čemu su ligandi i aminokiselinski ostaci aktivnog mesta tretirani kao rigidni. Doking je sproveden bez primene ograničenja, uz isto definisanje vezivnog džepa kao u prethodno opisanom postupku. Dobijene poze rangirane su pomoću ChemPLP funkcije.

Validacija ansambl dokovanja izvršena je računanjem *RMSD* vrednosti teških atoma referentnih liganada nakon ponovnog dokovanja. Za Bzo konformacije validacija je sprovedena dokovanjem liganda **B1** u konformacije PI3K α -B1, PI3K β -B1, PI3K γ -B1 i PI3K δ -B1, dok je za Thz konformacije sprovedena dokovanjem liganda **T1** u konformacije PI3K α -T1, PI3K β -T1, PI3K γ -T1 i PI3K δ -T1. Dokovane konformacije sa najvišim skorom i položajem koji se podudara sa referentnim položajem izabrane su za analizu interakcija i naredne 3D-QSAR studije. Rezultati su vizuelizovani u programu Discovery Studio Visualizer 2024 [485].

3.4.5. 3D-QSAR studija

3D-QSAR studije su sprovedene u programu Pentacle 1.07 [486], radi identifikacije strukturnih karakteristika koje utiču na aktivnost jedinjenja prema svakoj PI3K izoformi. Diskretizacija MIF-ova za izdvajanje najvažnijih regiona povoljnih interakcija izvedena je AMANDA algoritmom [314]. Za kodiranje MIF-ova primenjena je CLACC metodologija [487]. Širina prozora pri diskretizaciji rastojanja podešena je na podrazumevanu vrednost od 0,8, dok su granične vrednosti hemijskih probi takođe zadržane na podrazumevanim vrednostima. Kombinacijom AMANDA i CLACC pristupa dobijeni su GRIND-2 deskriptori, koji su korišćeni kao nezavisne varijable u 3D-QSAR modelovanju. Za svaku PI3K izoformu formiran je poseban PLS model, pri čemu su kao zavisne varijable korišćene odgovarajuće *in vitro* pK_i aktivnosti prema PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ . Za redukciju broja varijabli i izbor relevantnih korišćen je GOLPE-FFD algoritam (engl. *Generating Optimal Linear PLS Estimations – Fractional Factorial Design*) [488], koji je ponavlján dok se više nisu mogle poboljšati R^2 i Q^2 vrednosti.

Za 3D-QSAR modele koji predviđaju aktivnost prema PI3K α , PI3K γ i PI3K δ korišćeno je svih 37 jedinjenja, dok su za PI3K β korišćena 34 jedinjenja, zbog nedostatka definisanih K_i vrednosti za tri jedinjenja, **T3**, **T8** i **T13**. Setovi podataka podeljeni su na trening i test set u odnosu 2/3 : 1/3. Pri izboru test seta vodilo se računa da homogeno pokrije opseg pK_i vrednosti i da uključi jedinjenja iz oba klastera.

Trening set korišćen je za izgradnju PLS modela i internu validaciju, na osnovu eksperimentalnih i predviđenih vrednosti, dok je test set korišćen za eksternu validaciju. Trening setovi za PI3K α , PI3K γ i PI3K δ sadržali su po 25 jedinjenja, a trening set za PI3K β sadržao je 23 jedinjenja. Nad istim setovima formirano je više modela, pri čemu su kao finalni izabrani modeli sa najvećim Q^2 vrednostima.

3.4.6. Validacija 3D-QSAR modela

Razvijeni PLS 3D-QSAR modeli validirani su izračunavanjem internih i eksternih validacionih parametara. Interna validacija je sprovedena na osnovu parametara R^2 , Q^2 i $RMSEE$, pri čemu je Q^2 određen LOO metodom.

Eksterna validacija modela sprovedena je na test setu [461], a prediktivna sposobnost je procenjena na osnovu parametara R_{pred}^2 i $RMSEP$. Dodatno su izračunati parametri r- metrike: r_m^2 , $r_m^{1/2}$, $\overline{r_m^2}$ i Δr_m^2 [462], kao i CCC parametar [463].

3.4.7. Domen primenljivosti

Domen primenljivosti razvijenih 3D-QSAR modela procenjen je primenom *leverage* pristupa u softveru SPSS v.18.0 [464]. Na osnovu *leverage* vrednosti i standardizovanih reziduala ispitano je da li se jedinjenja nalaze u okviru hemijskog prostora obuhvaćenog trening setom i da li se njihove predikcije mogu smatrati pouzdanim.

3.4.8. Dizajn novih potencijalno selektivnih inhibitora PI3K α

Rezultati MD simulacija, molekulskog dokinga i 3D-QSAR analiza za izoforme PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ omogućili su identifikaciju ključnih strukturnih karakteristika značajnih za selektivnu inhibiciju PI3K α . Na osnovu dobijenih rezultata primenjeni su pristupi zamene osnovnog strukturnog skeleta, odnosno *scaffold hopping*, i zamene R-grupa, radi modifikacije vodećih jedinjenja i dizajna novih selektivnih inhibitora PI3K α .

Pretraga novih skeleta izvedena je u Cresset Spark 10.7.1 (<https://cresset-group.com/software/spark>), koji koristi XED 3 polje sila i ligand u definisanoj 3D konformaciji kao šablon [489]. Uvezen je i proteinski model kao „isključeni volumen“ radi detekcije sternih sudara i provere uklapanja u aktivno mesto. Struktura PI3K α inhibitora podeljena je na tri fragmenta: centralni fragment koji se vezuje za zglobni region, fragment koji se vezuje za afinitetni džep i fragment koji doprinosi selektivnosti (Slika 3.3).



Slika 3.3. Šematski prikaz inhibitora PI3K α i njihovih podstruktura, sa istaknutim regionima korišćenim za *scaffold hopping* i naknadnu zamenu R-grupa.

Baze ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>), SureChEMBL (<https://www.surechembl.org/>) i COD (engl. *Crystallography Open Database*, <https://www.crystallography.net/cod/>), integrisane u Spark u obliku 3D fragmenata, pretražene su radi pronalaženja zamena za izabrane skelete. Testirani skelet je zatim ponovo spajan sa neizmenjenim delom šablonskog molekula, minimizovan primenom XED polja i analiziran pomoću deskriptora tačaka polja [490]. Sličnost novodobijenog molekula sa šablonom procenjivana je na osnovu oblika i elektrostatičkih osobina. Svaki novi molekul je minimizovan, preklopljen sa šablonom, a zatim skorovan i rangiran. Rangiranje je sprovedeno na osnovu kombinovanog skora XED polja, koji obuhvata skor polja (engl. *Field Score*) i skor oblika (engl. *Shape Score*), uz primenu kazni za neispunjene farmakoforne uslove ili sternih sudara sa isključenim volumenom.

Dizajnirana jedinjenja pripremljena su na isti način kao i jedinjenja iz početnog seta podataka, određivanjem dominantnog protomera pri fiziološkoj vrednosti pH i minimizacijom primenom PM3 metode. Nakon toga sproveden je ansambl doking u četiri PI3K izoforme, radi analize interakcija i dobijanja bioaktivnih konformacija. Dobijene konformacije zatim su korišćene za predviđanje aktivnosti primenom razvijenih 3D-QSAR modela.

3.4.9. Strukturno zasnovan virtuelni skrining

Radi daljeg istraživanja hemijskog prostora potencijalnih α -selektivnih inhibitora PI3K, sproveden je SBVS u programu FLAP 2.2.2 (engl. *Fingerprints for Ligands and Proteins*) [491,492]. Skup poznatih PI3K α inhibitora preuzet je iz baze ChEMBL, pri čemu je za izbor najperspektivnijih jedinjenja primenjen stroži prag aktivnosti $IC_{50} < 100$ nM [493,494]. Inicijalni skup sadržao je 387 jedinjenja i razlikovao se od skupa korišćenog u 3D-QSAR i doking analizama. Ovaj skup dominantno je obuhvatao kinazne inhibitore zasnovane na hinazolinskim, triazinskim i benzimidazolnim strukturama, često sa heteroarilnim grupama povezanim sulfonamidom. Za ova jedinjenja su određeni protomeri pri fiziološkoj vrednosti pH od 7,4, a zatim su generisane i optimizovane 3D strukture pomoću programa OpenBabel [495]. Tautomeri su generisani primenom AMBIT generatora tautomera [496] u KNIME okruženju [497].

Za formiranje skupa neaktivnih molekula generisane su mamac-strukture na DUDE-Z serveru (<https://tldr.docking.org/start/dudez>) po 50 struktura za svako aktivno jedinjenje. Pri njihovom generisanju uzeti su u obzir protomeri pri fiziološkoj vrednosti pH i 3D konformacije, uz primenu preliminarne filtera $MW \geq 500$ i $\log P \leq 5$ [498]. Konačna baza pripremljena je u programu FLAP, pri čemu su duplikati uklonjeni. Za svaki ligand zadržano je do 25 minimizovanih konformera, uz definisanje minimalnog međusobnog RMSD-a. Završna SBVS baza sadržala je 318 aktivnih molekula i 2178 mamac-struktura.

3.4.10. Linearna diskriminantna analiza – SBVS modelovanje

LDA metodologija u programu FLAP omogućava izbor više šablonskih konformacija proteinskog vezivnog mesta, čime se uzima u obzir fleksibilnost enzima PI3K α . Ovaj pristup pronalazi kombinaciju šablona i statističkih skorova koja najbolje razlikuje aktivne od neaktivnih molekula [66]. U FLAP-u se mali molekuli i vezivna mesta opisuju pomoću farmakofornih otisaka, odnosno četvorki dobijenih iz GRID MIF-ova. Korišćene su četiri osnovne GRID probe: H za oblik, N1 za donore H-veze, O za akceptore H-veze i DRY za hidrofobnost, pri rezoluciji od 0,75 Å.

Za generisanje LDA-SBVS modela je korišćeno deset centroidnih struktura PI3K α , prethodno identifikovanih MD analizom iz simulacija PI3K α -B1 i PI3K α -T1, odnosno α Bz01–5 i α Thz1–5. Za LDA model je upotrebljena kombinacija tri šablona i dva skora, dok je za trening skup odabrano 100 aktivnih i 400 neaktivnih molekula. Performanse modela procenjene su konstruisanjem ROC (engl. *Receiver Operating Characteristic*) krive i izračunavanjem AUC vrednosti, kao i faktora obogaćenja

ROC (engl. *enrichment factor*, EF), odnosno EF 1%, EF 2% i EF 5%. Nakon toga je pretražena *Enamine kinase inhibitors library* iz Enamine baze (<https://enamine.net/>), koja sadrži 64 960 kompjuterski dizajniranih potencijalnih inhibitora kinaza, radi identifikacije potencijalno aktivnih PI3K α inhibitora.

Deset najbolje rangiranih jedinjenja zatim je podvrgnuto ansambl dokingu i 3D-QSAR predikciji aktivnosti prema PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ , primenom istog postupka koji je korišćen za početni skup podataka i dizajnirana jedinjenja.

3.4.11. Predikcija fizičko-hemijskih i ADMET karakteristika

Ispitivani set podataka, zajedno sa novodizajniranim strukturama i odabranim jedinjenjima iz SBVS analize, dodatno je okarakterisan pomoću softvera ADMET Predictor v12.0 [67] i SwissADME servera [68]. Ovi alati omogućavaju *in silico* fizičko-hemijsko, farmakokinetičko i toksikološko profilisanje ispitivanih struktura, sa ciljem identifikacije najperspektivnijih kandidata koji ne pokazuju nepovoljna farmakokinetička ili toksična svojstva.

3.4.12. Procena permeabilnosti kroz KMB primenom PAMPA-SVR QSPR modela i dodatna strukturna analiza dizajniranih PI3K α inhibitora

Pasivna permeabilnost kroz KMB dizajniranih PI3K inhibitora procenjena je primenom prethodno razvijenog PAMPA-SVR modela. Pouzdanost dobijenih predikcija je procenjena u odnosu na domen primenljivosti modela, čime je ispitano da li se analizirana jedinjenja nalaze u hemijskom prostoru obuhvaćenom trening setom.

Pored procene permeabilnosti kroz KMB, sprovedena je i dodatna strukturna analiza u cilju preliminarne procene mogućeg redoks ponašanja i potencijala za interakciju sa DNK. Analiza je zasnovana na poređenju strukturnih elemenata dizajniranih PI3K inhibitora sa erlotinibom, kompetitivnim inhibitorom EGFR tirozin-kinaze 4-anilinochinazolinog tipa, za koji su prethodno eksperimentalno ispitani elektrohemijsko ponašanje i interakcija sa DNK. Poređenje je obuhvatilo strukturne karakteristike koje su prisutne i kod erlotiniba i kod dizajniranih PI3K inhibitora, uključujući aromatične i heteroaromatične sisteme, atome azota i kiseonika kao potencijalne donore ili akceptore vodoničnih veza, kao i druge fragmente koji mogu biti relevantni za redoks ponašanje i interakcije sa DNK.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Rezultati i diskusija PAMPA-KMB QSPR studije

4.1.1. Rezultati PAMPA testa

PAMPA-KMB test je najpre sproveden za levodopu i haloperidol, u uslovima bez dodatka i sa dodatkom Tween-a 80, radi procene uticaja ovog surfaktanta na primenljivost modifikovanog postupka. Levodopa je hidrofilno jedinjenje za koje je poznato da prolazi kroz KMB dominantno putem aktivnog transporta, dok pasivnom difuzijom pokazuje nisku permeabilnost [499]. Nasuprot tome, haloperidol je izrazito lipofilno jedinjenje sa visokim afinitetom prema lipidima, zbog čega lako prolazi kroz ćelijske membrane, uključujući i KMB [500]. Budući da levodopa nije prelazila u akceptorske bunariće, dok je haloperidol pokazao uporedivu permeabilnost u oba ispitivana uslova, potvrđeno je da dodatak Tween-a 80 ne narušava primenljivost modifikovanog PAMPA-KMB postupka korišćenog u ovom radu.

Nakon toga, PAMPA-KMB test primenjen je radi procene efektivne permeabilnosti i pasivne difuzije registrovanih inhibitora kinaza kroz veštačku membranu koja modeluje KMB, kao i radi procene potencijalne permeabilnosti eksperimentalnih jedinjenja.

Na osnovu izračunatih eksperimentalnih vrednosti permeabilnosti ($\log P_e$), jedinjenja se generalno mogu klasifikovati u četiri grupe: nepermeabilna jedinjenja ($\log P_e < -6,14$), jedinjenja niske permeabilnosti ($-6,14 < \log P_e < -5,66$), jedinjenja srednje permeabilnosti ($-5,66 < \log P_e < -5,33$) i jedinjenja visoke permeabilnosti ($\log P_e > -5,33$) [39]. Dobijeni rezultati pokazali su da se ispitivani inhibitori kinaza razlikuju po permeabilnosti i pripadaju grupama jedinjenja niske, srednje i visoke permeabilnosti, kao što je prikazano u Tabeli 4.1.

Tabela 4.1. PAMPA-KMB rezultati za ispitivane inhibitore kinaza

Jedinjenje	P_e	$\log P_e$
Jedinjenje 2	$1,13 \times 10^{-6}$	-5,95
Vemurafenib	$1,17 \times 10^{-6}$	-5,93
Afatinib	$1,47 \times 10^{-6}$	-5,83
Nintedanib	$1,60 \times 10^{-6}$	-5,80
Jedinjenje 1*	$1,57 \times 10^{-6}$	-5,80
Jedinjenje 5	$1,63 \times 10^{-6}$	-5,79
Jedinjenje 16	$1,63 \times 10^{-6}$	-5,79
Jedinjenje 8*	$1,76 \times 10^{-6}$	-5,75
Jedinjenje 7	$1,99 \times 10^{-6}$	-5,70
Jedinjenje 14	$2,08 \times 10^{-6}$	-5,68
Jedinjenje 17	$2,29 \times 10^{-6}$	-5,64
Gefitinib*	$2,37 \times 10^{-6}$	-5,62
Nilotinib	$2,38 \times 10^{-6}$	-5,62
Jedinjenje 10*	$2,47 \times 10^{-6}$	-5,61
Jedinjenje 11	$2,52 \times 10^{-6}$	-5,60
Jedinjenje 13*	$2,57 \times 10^{-6}$	-5,59
Jedinjenje 9	$2,85 \times 10^{-6}$	-5,55
Jedinjenje 4	$2,94 \times 10^{-6}$	-5,53
Jedinjenje 6	$3,12 \times 10^{-6}$	-5,51
Jedinjenje 3*	$3,24 \times 10^{-6}$	-5,49
Crizotinib	$3,50 \times 10^{-6}$	-5,46
RKI-1447*	$3,74 \times 10^{-6}$	-5,43
Erlotinib	$3,79 \times 10^{-6}$	-5,42
Jedinjenje 12	$3,85 \times 10^{-6}$	-5,41
Imatinib	$4,73 \times 10^{-6}$	-5,32
Dabrafenib	$4,88 \times 10^{-6}$	-5,31
Lapatinib	$4,85 \times 10^{-6}$	-5,31
Jedinjenje 15	$5,31 \times 10^{-6}$	-5,28
N-desmethylimatinib*	$5,40 \times 10^{-6}$	-5,27
Fasudil	$6,72 \times 10^{-6}$	-5,17

Everolimus	$7,52 \times 10^{-6}$	-5,12
Ruxolitinib*	$7,59 \times 10^{-6}$	-5,12
Axitinib	$1,19 \times 10^{-5}$	-4,93
Palbociclib	$2,07 \times 10^{-5}$	-4,68

*Test set jedinjenja

Sprovedeno hijerarhijsko klasterovanje pokazalo je da većina klastera ima reprezentativne strukture u ispitivanom setu podataka, što ukazuje na to da jedinjenja korišćena u studiji obuhvataju širok spektar strukturnih karakteristika postojećih inhibitora kinaza (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Lista kinaznih inhibitora dobijenih iz Drugbank baze podataka i njihovi reprezentativni klasteri; inhibitori korišćeni u ovoj studiji su boldovani.

Naziv	Broj klastera	Naziv	Broj klastera	Naziv	Broj klastera
(Rp)-cAMPS	1	Entrektinib	2	Ikotinib	3
7-Hidroksistaurosporin	1	FF-10101-01	2	Neratinib	3
Akalabrutinib	1	Fedratinib	2	Pelitinib	3
Kobimetinib	1	Flumatinib	2	Rabusertib	3
Everolimus	1	GSK-2636771	2	Spebrutinib	3
Ibrutinib	1	Gedatolisib	2	Tesevatinib	3
Larotrekatinib	1	Gilteritinib	2	Vandetanib	3
Midostaurin	1	Imatinib	2	Alisertib	4
Nakotinib	1	Lorlatinib	2	Aksitinib	4
PF-06700841	1	MKC-1	2	Emodin	4
Ridaforolimus	1	Masitinib	2	Genistein	4
Ruksolitinib	1	Merestinib	2	MLN8054	4
Sirolimus	1	Momelotinib	2	Kabozantinib	5
Temsirolimus	1	Nemiralisib	2	MK-5108	5
Tofacitinib	1	Nintedanib	2	Dabrafenib	6
Upadacitinib	1	Olmutinib	2	Ilorasertib	6
Vortmanin	1	Osimertinib	2	Indirubin	6
Zanubrutinib	1	PF-03814735	2	Lapatinib	6
AKI-001	2	Palbociklib	2	Lenvatinib	6
AV-412	2	Ponatinib	2	Motesanib	6
AZD-0424	2	Kvizartinib	2	Nilotinib	6
AZD-8330	2	Rebastinib	2	Orantinib	6
Abemaciclib	2	Reversin	2	Pazopanib	6
Abivertinib	2	Ribociklib	2	RO-5126766	6
Acrizanib	2	Rimakalib	2	Regorafenib	6
Alektinib	2	Ripretinib	2	Rigosertib	6
Alvocidib	2	Rociletinib	2	Rivoceranib	6
Avapritinib	2	Sunitinib	2	SNS-314	6
Bafetinib	2	TAK-901	2	Semaksanib	6
Barasertib	2	Tepotinib	2	Sorafenib	6
Binimetinib	2	Trametinib	2	Tivozanib	6
Brigatinib	2	Vistusertib	2	Vemurafenib	6
Ceritinib	2	Voruciklib	2	Fasudil	7
Krizotinib	2	X-396	2	H-89	7
Danuseritib	2	Afatinib	3	Losmapimod	8
Dasatinib	2	Bosutinib	3	Pimasertib	8
Doramapimod	2	Cediranib	3	Selicklib	9

Naziv	Broj klastera	Naziv	Broj klastera	Naziv	Broj klastera
Dorsomorfin	2	Dakomitinib	3	Vatalanib	10
Enkorafenib	2	Erlotinib	3		
Ensartinib	2	Gefitinib	3		

Poređenjem kliničkih podataka sa dobijenim rezultatima, uzimajući u obzir strukturne karakteristike ovih jedinjenja, može se uočiti određeno slaganje (Tabela 4.1).

Dobijene $\log P_e$ vrednosti za dva BCR-ABL inhibitora tirozin kinaze ukazale su na srednju permeabilnost nilotiniba i visoku pasivnu permeabilnost imatiniba u PAMPA-KMB testu. U poređenju sa nilotinibom, imatinib je pokazao veću efektivnu permeabilnost u ovom modelu, što može ukazivati na povoljniji potencijal za pasivni prolazak kroz membranu koja modeluje KMB. Ipak, ovaj rezultat treba tumačiti uzimajući u obzir da *in vivo* prolazak kroz KMB može biti ograničen aktivnim efluksnim transporterima [501]. Niža permeabilnost nilotiniba mogla bi se delimično objasniti prisustvom voluminoznog trifluorometil supstituenta.

Među EGFR/HER inhibitorima kinaza, lapatinib je pokazao visoku permeabilnost, što bi se moglo povezati sa prisustvom lipofilnog supstituenta na 4-anilinohinazolinskom fragmentu. Nintedanib, kao VEGFR inhibitor, klasifikovan je kao jedinjenje niske permeabilnosti, što bi moglo biti posledica više strukturnih karakteristika, uključujući voluminozni supstituent u alfa položaju 1H-indolinona i prisustvo više amino grupa, koje mogu biti protonovane pri fiziološkoj vrednosti pH od 7,4.

Everolimus je lek za koji je poznato da može prolaziti kroz KMB [502], a rezultati dobijeni u ovom radu takođe su pokazali da se može klasifikovati kao jedinjenje visoke permeabilnosti. Pored toga, visoka permeabilnost u PAMPA-KMB testu predložena je i za fasudil, za koji je pokazano da ima dobar terapijski efekat kod neurodegenerativnih bolesti, jer povećava aktivnost neuronskih matičnih ćelija [503]. Takođe je prijavljeno da fasudil smanjuje disfunkciju KMB, poboljšava neurološke i kliničke ishode kod akutnog cerebralnog infarkta i ispoljava neuroprotektivne efekte [504].

Krizotinib u kliničkom kontekstu pokazuje ograničenu penetraciju u CNS, dok su rezultati ovog rada ukazali na njegovu umerenu pasivnu permeabilnost u PAMPA-KMB testu. Ovo neslaganje može se objasniti time što je krizotinib poznat supstrat P-gp transportera, pa njegov prolazak kroz KMB *in vivo* može biti ograničen aktivnim efluksom [505].

PAMPA-KMB rezultati za dodatna ispitivana jedinjenja pokazali su da su aril-2-aminopiridini, odnosno jedinjenja 1 i 2, klasifikovani kao jedinjenja niske permeabilnosti, dok su piridinski derivati tiazolil-hidrazona i selenazolil-hidrazona, odnosno jedinjenja 3–17, pripadali kategorijama niske, srednje i visoke permeabilnosti.

Pored eksperimentalno određene PAMPA-KMB permeabilnosti, ADMET Predictor je korišćen za predviđanje da li ispitivana jedinjenja predstavljaju supstrate P-gp transportera (Tabela 4.3). Za dabrafenib, erlotinib, fasudil, lapatinib, nilotinib i ruksolitinib, kao i za sva eksperimentalna jedinjenja, predviđeno je da nisu Pgp supstrati. Za preostala jedinjenja iz ispitivanog seta predviđeno je da mogu biti i Pgp supstrati i Pgp inhibitori, dok je jedini izuzetak bio RKI-1447, za koji je predviđeno da je samo Pgp supstrat.

Vezivanje za proteine plazme takođe je predviđeno pomoću ADMET Predictor-a, radi procene slobodne frakcije leka u plazmi koja je potencijalno dostupna za pasivnu difuziju kroz KMB. Za sva jedinjenja, osim fasudila, palbocikliba i ruksolitiniba, predviđeno je manje od 10%, ali više od 1% nevezane frakcije leka. Iako se uglavnom smatra da je za transport kroz KMB najrelevantnija slobodna, nevezana frakcija leka, studije su pokazale da i jedinjenja sa visokim stepenom vezivanja za proteine plazme mogu dospeti u CNS. To ukazuje da se odgovarajuća koncentracija leka u CNS-

u može postići i kod jedinjenja sa se u visokom procentu vezuju za proteine plazme, ukoliko poseduju odgovarajuću intrinzičnu pasivnu permeabilnost. U tom kontekstu, PAMPA-KMB test predstavlja koristan alat za rani skrining pasivne permeabilnosti jedinjenja kroz KMB [506].

Tabela 4.3. ADMET predictor rezultati za ispitivani set podataka.

Naziv	P-gp supstrat	P-gp inhibitor	Nevezana frakcija u humanoj plazmi, fup (%)
Afatinib	Da (94%)	Da (97%)	9,643
Aksitinib	Da (68%)	Da (97%)	3,265
Krizotinib	Da (78%)	Da (97%)	9,493
Dabrafenib	Ne (69%)	Da (55%)	4,298
Erlotinib	Ne (66%)	Da (97%)	4,810
Everolimus	Da (94%)	Da	7,818
Fasudil	Ne (57%)	Ne (96%)	67,049
Gefitinib	Da (83%)	Da (97%)	4,847
Imatinib	Da (83%)	Da (97%)	6,413
Lapatinib	Ne (59%)	Da (97%)	2,447
N-dezmetil imatinib	Da (83%)	Da (97%)	6,392
Nilotinib	Ne (66%)	Da (97%)	3,471
Nintedanib	Da (94%)	Da (97%)	7,913
Palbociklib	Da (94%)	Da (70%)	19,578
RKI-1447	Da (74%)	Ne (96%)	6,531
Ruksolitinib	Ne (72%)	Da (53%)	18,734
Vemurafenib	Ne (66%)	Da	2,601
Jedinjenje 1	Ne (54%)	Da (97%)	2,408
Jedinjenje 2	Ne (81%)	Da (84%)	2,551
Jedinjenje 3	Ne	Da	2,457
Jedinjenje 4	Ne	Da	2,916
Jedinjenje 5	Ne	Da	3,339
Jedinjenje 6	Ne	Da	3,427
Jedinjenje 7	Ne	Da	3,921
Jedinjenje 8	Ne	Da	3,709
Jedinjenje 9	Ne	Da	3,747
Jedinjenje 10	Ne	Da	4,264
Jedinjenje 11	Ne	Da	4,313
Jedinjenje 12	Ne (93%)	Da (51%)	4,416
Jedinjenje 13	Ne (93%)	Da (70%)	4,381
Jedinjenje 14	Ne (93%)	Da (97%)	4,964
Jedinjenje 15	Ne	Da	3,360
Jedinjenje 16	Ne	Da	3,541
Jedinjenje 17	Ne	Da	3,889

4.1.2. QSPR modelovanje

QSPR modelovanje sprovedeno je sa ciljem ispitivanja odnosa između molekulskih osobina ispitivanih inhibitora protein kinaza i srodnih jedinjenja, sa jedne strane, i njihove permeabilnosti kroz KMB, sa druge strane. Kao ulazne promenljive korišćeni su prethodno obrađeni molekulski deskriptori jedinjenja iz ispitivanog seta, dok je $\log P_e$ vrednost, izračunata na osnovu rezultata PAMPA-KMB testa, korišćena kao zavisna promenljiva. Na ovaj način omogućena je procena

doprinosa pojedinačnih molekulskih karakteristika pasivnoj permeabilnosti kroz membranu koja modeluje KMB.

Najpre je primenjeno *stepwise* MLR modelovanje, radi procene linearne zavisnosti između molekulskih deskriptora i $\log P_e$ vrednosti, kao i radi selekcije promenljivih sa najvećim značajem za opis i predviđanje pasivne permeabilnosti. Na osnovu kriterijuma „ F za uključivanje“ i „ F za uklanjanje“, MLR model je izdvojio četiri deskriptora. Dobijeni model zatim je podvrgnut internoj i eksternoj validaciji, uključujući r -metriku.

Nakon toga je sprovedeno SVR modelovanje, kako bi se ispitala mogućnost opisivanja potencijalnih nelinearnih odnosa između izabranih deskriptora i $\log P_e$ vrednosti. Za sve ispitivane funkcije jezgra optimizovani su hiperparametri C , ε i γ , u slučajevima kada su bili primenljivi. Nakon poređenja performansi dobijenih modela, za dalje modelovanje izabrana je RBF funkcija jezgra, koja je pokazala najpovoljnije validacione parametre. Kao optimalne vrednosti hiperparametara za RBF-SVR model izabrane su $C = 10$, $\varepsilon = 0,1$ i $\gamma = 0,25$.

Takođe su razvijani i ANN modeli. Kao neuronska mreža sa najboljim performansama tokom treniranja izabrana je troslojna MLP mreža konačne strukture 4-8-1, sa četiri ulazna neurona, osam neurona u skrivenom sloju i jednim izlaznim neuronom. Za skrivene neurone korišćena je sinusoidna aktivaciona funkcija, dok je za izlazni neuron primenjena logistička aktivaciona funkcija.

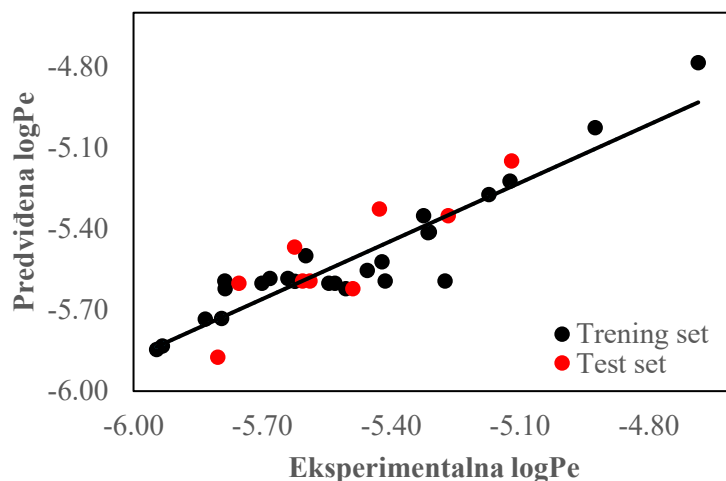
Sveobuhvatna interna i eksterna statistička validaciona analiza pokazala je da svi kreirani QSPR modeli imaju uporedive performanse (Tabela 4.4). Ipak, blaga prednost može se dati QSPR-SVR modelu (Slika 4.1), koji je zadovoljio sve ključne validacione parametre, što ga čini efikasnim alatom za predviđanje permeabilnosti novih analoga unutar definisanog domena primenljivosti. ANN model ima više vrednosti eksternih parametara, verovatno zbog manjeg broja jedinjenja u test setu. Eksperimentalne $\log P_e$ vrednosti, kao i vrednosti predviđene MLR, SVM i ANN modelima, prikazane su u Prilozima, u Tabeli P1.3.

Tabela 4.4. Rezultati validacionih parametara za kreirane QSPR modele.

	R^2	Q^2	RMSEE	R^2_{pred}	RMSEP	r^2_m	r'^2_m	Δr^2_m	$(r^2_m + r'^2_m)/2$	$(r'^2_m - r^2_m)/r^2_m$	k'	CCC
MLR	0,769	0,628	0,145	0,811	0,092	0,791	0,676	0,115	0,734	0,036	0,997	0,897
SVR	0,839	0,648	0,121	0,777	0,100	0,723	0,657	0,067	0,690	0,033	1,002	0,882
ANN	0,749	0,620	0,151	0,953	0,050	0,978	0,988	0,010	0,983	0,000	0,992	0,977
				0,999*	0,095*							
Limit	>0,7	>0,5		>0,5		>0,5	>0,5	<0,2	>0,5	<0,1	0,85< k' <1,15	>0,85

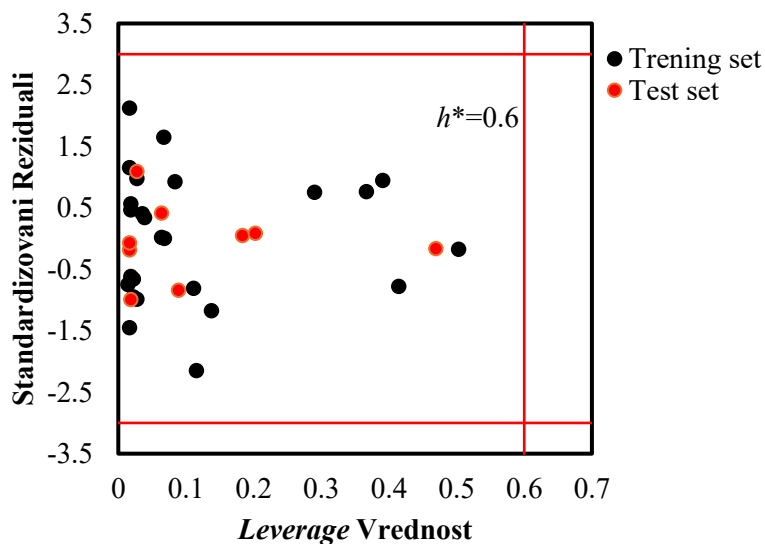
*Validacioni parametri verifikacionog seta

SVM modeli su korisni za izbegavanje problema preprilagođavanja, uz istovremeno obezbeđivanje tačnih rezultata i pri malom broju podataka. Iako ANN modeli imaju prednost u dobrom uklapanju setova podataka, to ponekad može ograničiti njihove performanse. Pored toga, za razliku od SVM modela, ANN modeli imaju tendenciju ka preprilagođavanju, čime se smanjuje njihova sposobnost generalizacije.



Slika 4.1. Grafik zavisnosti eksperimentalno određenih i predviđenih $\log P_e$ vrednosti za QSPR-SVM model.

Kreirani MLR, ANN i SVM modeli analizirani su radi određivanja njihovog domena primenljivosti korišćenjem izabranih molekulskih deskriptora. Granična *leverage* vrednost je izračunata pomoću jednačine 10 i iznosila je $h^* = 0,6$. *Williams*-ov dijagram prikazan na Slici 4.2 pokazao je da su jedinjenja i iz trening i iz test seta unutar definisanog domena primenljivosti. Stoga je kreirani SVM model pogodan za predviđanje permeabilnosti novih jedinjenja slične strukture kroz KMB. Ovo može biti posebno korisno pri optimizaciji novih liganada za razvoj efikasnijih i potentnijih jedinjenja usmerenih ka poremećajima CNS-a ili za sprečavanje potencijalnih neželjenih efekata na CNS.



Slika 4.2. Domen primenljivosti kreiranog QSPR-SVM modela.

4.1.3. Interpretacija QSPR modela

Molekulski deskriptori imaju ključnu ulogu u QSPR modelovanju, jer hemijsko-strukturne karakteristike molekula prevode u numerički oblik pogodan za statističku analizu i razvoj prediktivnih modela. U tom smislu, pouzdano izračunavanje i selekcija relevantnih deskriptora predstavljaju važne korake u formiranju QSPR modela. Kreirani i validirani MLR model analiziran je radi tumačenja odnosa između strukture jedinjenja i njihove permeabilnosti kroz KMB, pri čemu

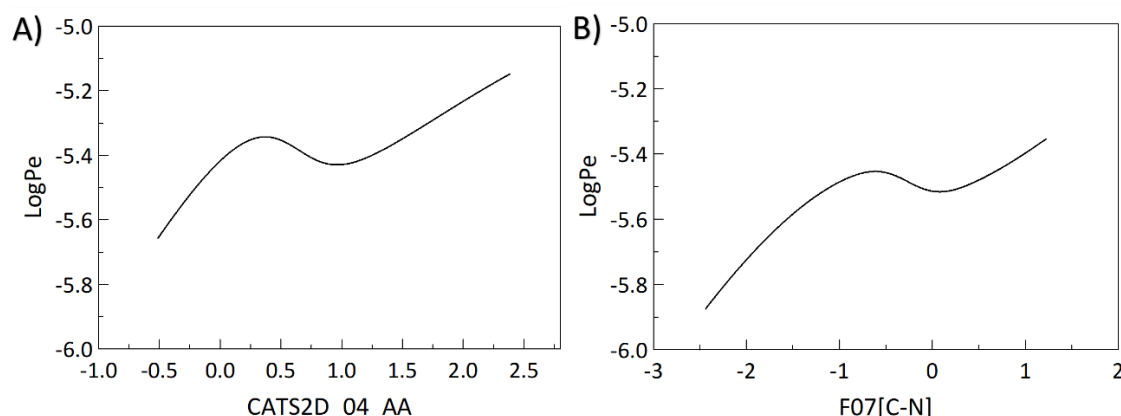
su identifikovane četiri promenljive sa značajnim doprinosom opisu $\log P_e$ vrednosti. Dobijena MLR jednačina za predikciju $\log P_e$ vrednosti imala je sledeći oblik:

$$\log P_e = -0,121 \text{ CATS2D_09_DA} + 0,171 \text{ CATS2D_04_AA} + 0,170 \text{ B04[N-S]} + 0,096 \text{ F07[C-N]} - 5,496 \quad (69)$$

pozitivan doprinos $\log P_e$ vrednosti. Pored toga, B04[N-S] i F07[C-N] takođe su identifikovani kao deskriptori koji pozitivno korelišu sa pasivnom permeabilnošću kroz KMB, dok je za CATS2D_09_DA uočen negativan uticaj.

ANN i SVM regresioni modeli razvijeni su radi ispitivanja mogućih nelinearnih odnosa između izabranih deskriptora i $\log P_e$ vrednosti. Relativni doprinos ulaznih deskriptora procenjen je globalnom analizom osetljivosti. Ova analiza procenjuje značaj pojedinačnih ulaznih promenljivih poređenjem greške mreže kada su sve promenljive uključene sa greškom dobijenom nakon izostavljanja pojedinačnog deskriptora. Veća osetljivost, odnosno veće povećanje greške nakon izostavljanja deskriptora, ukazuje na veći relativni doprinos tog deskriptora predikciji $\log P_e$ vrednosti. Nakon analize, kreirani ANN model pokazao je slične doprinose $\log P_e$ vrednosti kao i MLR model i CATS2D_09_DA je bio najuticajniji deskriptor na koeficijent permeacije kroz PAMPA veštačku membranu.

Grafici odziva za deskriptore CATS2D_04_AA i F07[C-N] (Slika 4.3) ukazali su na nelinearnu zavisnost od $\log P_e$ vrednosti u QSPR-SVM modelovanju. Preciznije opisivanje odnosa ovih deskriptora sa zavisnom promenljivom verovatno je razlog boljih performansi ovog QSPR modela (Slika 4.4).

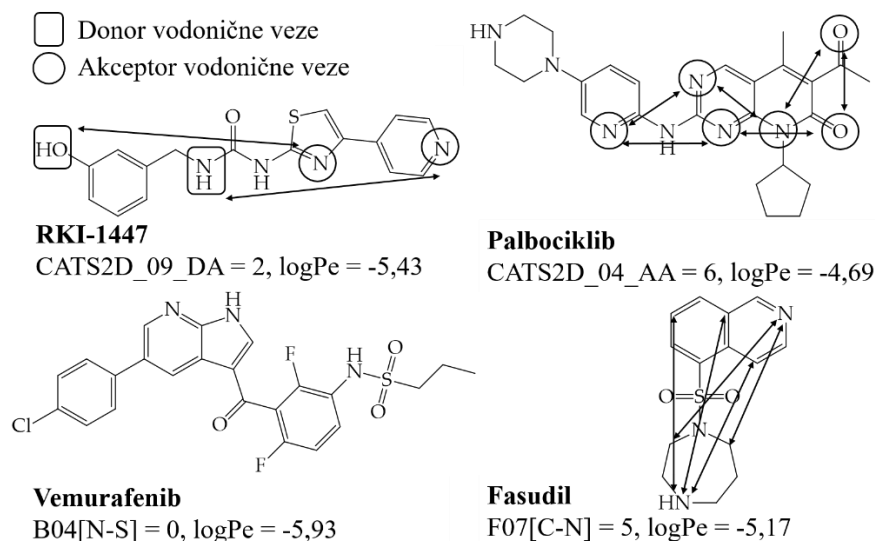


Slika 4.3. Grafici odziva za A) CATS2D_04_AA i B) F07[C-N] deskriptore iz QSPR-SVM modela.

Jedan od deskriptora sa pozitivnim doprinosom $\log P_e$ vrednosti jeste CATS2D_04_AA, koji pripada CATS2D deskriptorima i opisuje topološko rastojanje između različitih farmakofornih karakteristika [507]. Ovaj deskriptor definiše prisustvo dva akceptora vodonične veze na topološkom rastojanju od 4. Većina ispitivanih jedinjenja koja su imala nižu permeabilnost imala su vrednost ovog deskriptora 0. Jedinjenja sa višom permeabilnošću, kao što su palbociklib i ruksolitinib, imala su više vrednosti. S druge strane, koeficijent deskriptora CATS2D_09_DA imao je negativnu vrednost, što znači da donor i akceptor vodonične veze na topološkom rastojanju od 9 može doprineti smanjenju $\log P_e$ vrednosti. Ovo ukazuje da bi prisustvo donora vodoničnih veza u ovoj grupi jedinjenja smanjilo prolazak kroz KMB. Vemurafenib je jedno od jedinjenja iz seta podataka koje je imalo vrednost ovog deskriptora 2 i nižu $\log P_e$ vrednost.

Deskriptor atomskog para B04[N-S] [507] definiše prisustvo parova atoma N i S na topološkom rastojanju od 4. Njegov pozitivan doprinos $\log P_e$ vrednosti ukazuje da određeni prostorni, odnosno

topološki raspored atoma azota i sumpora u strukturi jedinjenja može biti povezan sa povoljnijom pasivnom permeabilnošću kroz KMB. Aksitinib je jedno od jedinjenja sa visokom permeabilnošću koje je pokazalo ovu osobinu. Pozitivan doprinos $\log P_e$ vrednosti pokazao je i deskriptor F07[C-N], koji opisuje frekvenciju parova atoma ugljenika i azota na topološkom rastojanju od 7. Veće topološko rastojanje između atoma azota i ugljenika, opisano ovim deskriptorom, može ukazivati na značaj produženih ugljeničnih fragmenata ili bočnih lanaca povezanih sa centralnim aromatičnim sistemima. Takve strukturne karakteristike mogu doprineti povećanju lipofilnosti i povoljnijoj pasivnoj permeabilnosti kroz membranu koja modeluje KMB.



Slika 4.4. Primeri ispitivanog seta jedinjenja i izabranih deskriptora.

Opisani deskriptori pružaju uvid u moguće pravce optimizacije pasivne permeabilnosti inhibitora kinaza i strukturno srodnih ispitivanih jedinjenja kroz KMB. Strukturne modifikacije usmerene ka smanjenju broja donora vodoničnih veza, poput zamene slobodnih vodonika alkil grupama, ili izosterne zamene određenih donorskih centara akceptorima vodoničnih veza, na primer atomom azota, mogu predstavljati potencijalne strategije za poboljšanje prolaska ovih struktura kroz membranu koja modeluje KMB. Pri tome bi takve modifikacije trebalo usmeriti na delove molekula koji nisu ključni za aktivnost ili selektivnost prema ciljnoj kinazi.

Kao primer takve optimizacije razmatran je derivat vemurafeniba, označen kao jedinjenje **V1**, kod kojeg je N-metil grupa uvedena u sulfonamidni deo strukture. Vemurafenib je u ispitivanom setu podataka imao drugu najnižu $\log P_e$ vrednost, a predložena modifikacija smanjuje broj donora vodoničnih veza, dok 7-azaindolski prsten, odgovoran za vezivanje za zglobni region aktivnog mesta BRAF kinaze, ostaje očuvan. Na osnovu razvijenog PAMPA-SVR modela, predviđena $\log P_e$ vrednost jedinjenja **V1** iznosi -5,35, što se nalazi na gornjoj granici opsega karakterističnog za jedinjenja srednje permeabilnosti. Ovaj rezultat ukazuje da bi navedena modifikacija mogla doprineti povećanju pasivne permeabilnosti kroz KMB.

4.1.4. Uporedna analiza rezultata studije sa podacima iz literature

Dobijeni PAMPA-KMB i QSPR rezultati mogu se tumačiti u okviru opštih principa koji određuju prolazak jedinjenja kroz KMB. Prethodne QSPR i studije CNS permeabilnosti pokazale su da ovaj proces zavisi od više međusobno povezanih osobina, među kojima su lipofilnost, polarna površina, molekulska masa, sposobnost formiranja vodoničnih veza i jonizacione karakteristike jedinjenja. Zhang i saradnici [508] su, pored lipofilnosti, polarne površine i osobina povezanih sa vodoničnim vezivanjem, ukazali i na značaj *E-state* i *van der Waals*-ovih površina. Slično tome, Barn i saradnici

[509] su kao važne parametre izdvojili polarnu površinu, molekulsku masu, lipofilnost i broj donora vodoničnih veza, dok su *Wager* i saradnici [510] razmatrali ulogu lipofilnosti, molekulske mase, topološke polarne površine, donora vodoničnih veza i pKa vrednosti u optimizaciji jedinjenja namenjenih delovanju u CNS-u. U skladu sa tim, modeli razvijeni u ovoj studiji prate opšte principe opisane u literaturi, ali istovremeno izdvajaju i specifične topološke i strukturne osobine koji mogu biti značajni za dizajn i optimizaciju inhibitora kinaza.

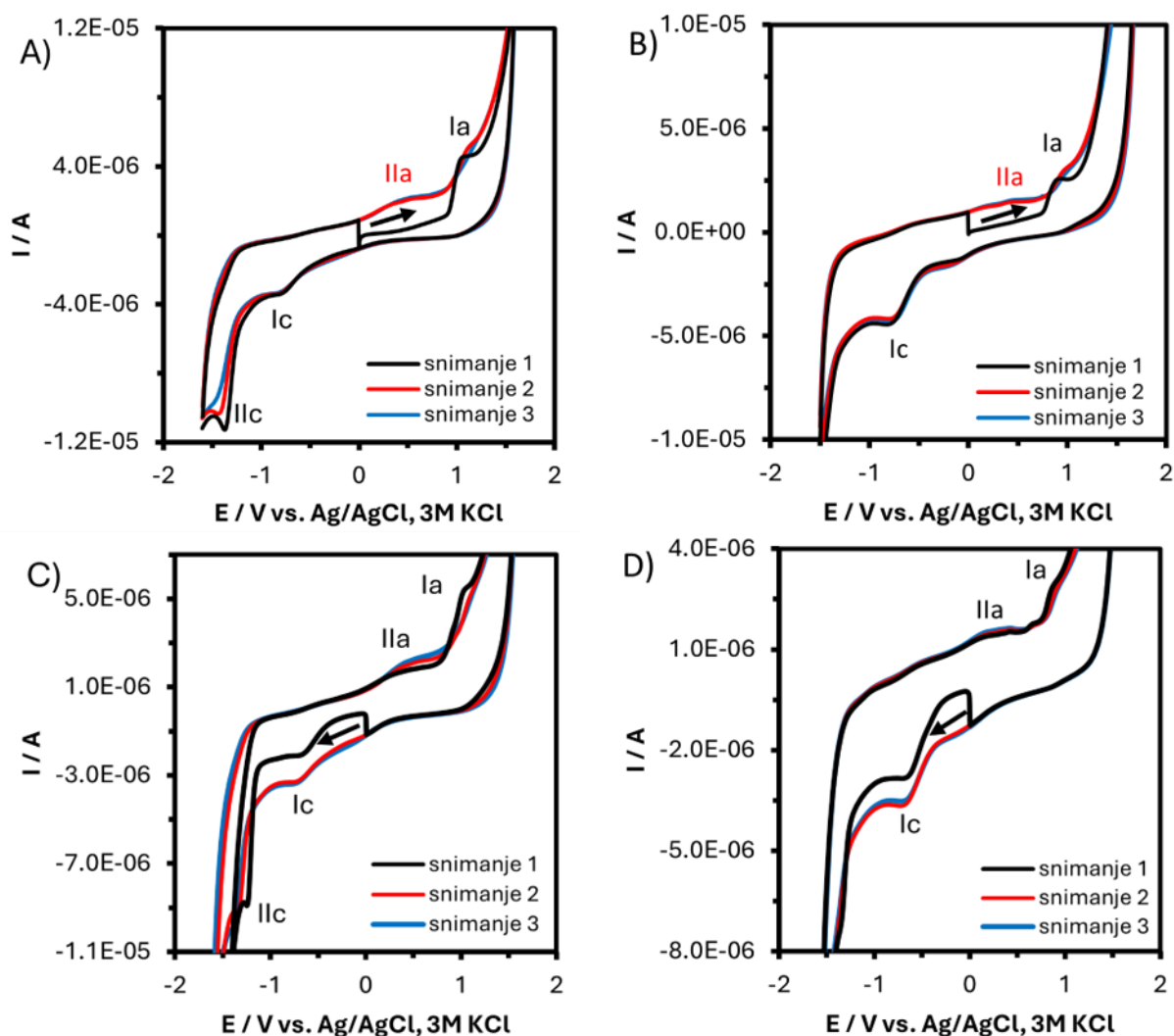
Za razliku od opštih modela CNS permeabilnosti, PAMPA-KMB QSPR modeli razvijeni u ovoj disertaciji zasnovani su na setu strukturno raznovrsnih inhibitora kinaza i njima srodnih jedinjenja. Zbog toga oni mogu pružiti dodatni uvid u karakteristike koje su posebno važne za ovu grupu struktura. Dobijeni deskriptori ukazuju da pasivna permeabilnost ne zavisi samo od prisustva polarnih ili lipofilnih grupa, već i od njihovog međusobnog topološkog rasporeda. To može ukazati da isti tip funkcionalnih grupa može imati različit uticaj na permeabilnost u zavisnosti od njihovog položaja u molekulu i odnosa prema drugim strukturnim centrima. Ovakvo tumačenje je posebno važno za kinazne inhibitore, kod kojih polarni heterociklični fragmenti često učestvuju u vezivanju za aktivno mesto enzima. Zbog toga optimizacija permeabilnosti kod ove grupe jedinjenja ne može biti posmatrana odvojeno od očuvanja afiniteta i selektivnosti prema ciljanoj kinazi.

4.2. Rezultati i diskusija elektrohemijske i računarske studije erlotiniba

4.2.1. Ciklična voltametrij a erlotiniba na nemodifikovanoj GCE

Oksidaciono i redukciono ponašanje ERL ispitivano je primenom CV metode u rastvorima koncentracije 2×10^{-4} M, pripremljenim u acetatnom puferu pH 4,64 i fosfatnom puferu pH 6,94. Izvedena su tri uzastopna snimanja (tri ciklusa) i započinjana su od potencijala 0,0 V, pri čemu su korišćena dva režima skeniranja radi ispitivanja međusobne nezavisnosti oksidacionih i redukcionih procesa. U prvom režimu potencijal je najpre skeniran ka pozitivnoj granici od +1,6 V, a zatim ka negativnoj granici od -1,6 V. U drugom režimu redosled skeniranja bio je obrnut, odnosno potencijal je najpre vođen ka negativnoj, a zatim ka pozitivnoj granici.

U prvom snimanju, pri skeniranju od 0,0 V ka pozitivnim vrednostima potencijala je u rastvorima obe pH vrednosti detektovan jedan anodni pik Ia (Slika 4.5A i B, crna linija). Pik Ia registrovan je na potencijalu $E_{pIa} = 1,035$ V pri pH 4,64, odnosno na $E_{pIa} = 0,879$ V pri pH 6,94. U rastvoru pH 4,64 uočena su dva katodna pika: Ic na $E_{pIc} = -0,771$ V i IIc na $E_{pIIc} = -1,357$ V (Slika 4.5A). Nasuprot tome, pri pH 6,94 registrovan je samo katodni pik Ic, na $E_{pIc} = -0,762$ V (Slika 4.5B).



Slika 4.5. CV krive ERL koncentracije 2×10^{-4} M snimljene od 0,0 V u: smeru pozitivnog potencijala pri A) pH 4,64 i B) pH 6,94; i smeru negativnog potencijala pri C) pH 4,64 i D) pH 6,94; prvo (—), drugo (—) i treće (—) snimanje; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Pri skeniranju potencijala od 0,0 V ka negativnim vrednostima E (Slika 4.5C i D), u prvom snimanju su pri pH 4,64 zabeležena dva katodna pika: Ic na $E_{pIc} = -0,664 \text{ V}$ i IIc na $E_{pIIc} = -1,235 \text{ V}$ (Slika 4.5C). U istom snimanju, pri ovoj pH vrednosti, detektovana su i dva anodna pika: Ia na $E_{pIa} = 1,035 \text{ V}$ i novi pik IIa na $E_{pIIa} = 0,283 \text{ V}$. Pri pH 6,94 (Slika 4.5D) registrovan je samo jedan katodni pik, Ic, na $E_{pIc} = -0,630 \text{ V}$, dok su nakon promene smera potencijala uočena dva slabo izražena anodna pika na manje pozitivnim potencijalima u odnosu na kiselijske uslove.

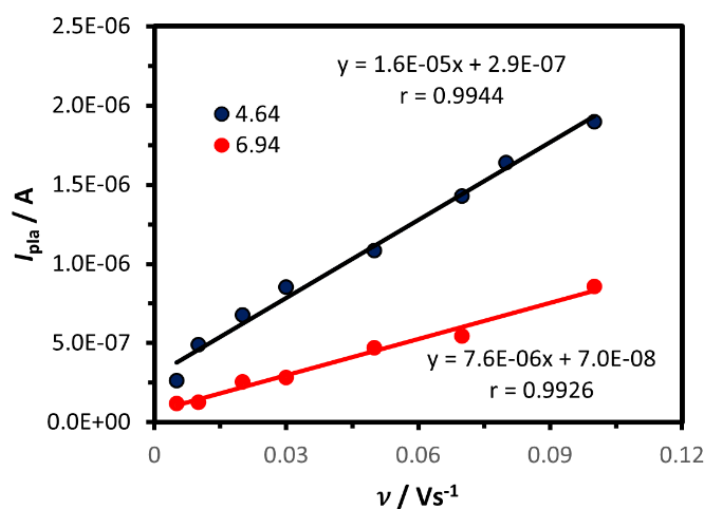
Pik IIa je u prvom CV snimanju bio prisutan samo u uslovima prikazanim na Slikama 4.5C i D, odnosno kada je skeniranje najpre izvođeno ka negativnim potencijalima. Nasuprot tome, u prvom snimanju pod uslovima prikazanim na Slikama 4.5A i B ovaj pik nije bio prisutan. U svim ostalim uzastopnim snimanjima pik IIa je postojao, što može ukazivati na to da nastaje oksidacijom redukcionog proizvoda ERL formiranog na površini elektrode nakon prethodne primene dovoljno negativnog potencijala. Visina pika IIa se pri obe ispitivane pH vrednosti blago povećavala u drugom i trećem snimanju.

U drugom i trećem snimanju mogu se uočiti i svi ostali pikovi, Ia, Ic i IIc, ali sa smanjenom strujom pika. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da opisani oksidacioni i redukcion procesi uključuju adsorpciju aktivnih vrsta na površini elektrode. Na osnovu oblika pikova i odsustva

odgovarajućeg signala u povratnim delovima ciklusa, može se zaključiti da su svi navedeni oksidacioni i redukcionni procesi ireverzibilni.

Radi daljeg ispitivanja oksido-redukcionih procesa ERL, voltamogrami su snimani pri različitim brzinama promene potencijala i pri dve koncentracije ERL: višoj, 2×10^{-4} M, i nižoj, 2×10^{-6} M. Uticaj brzine promene potencijala [447,511,512] ispitivan je pri pH 4,64 i 6,94, u opsegu od 5 do 100 mV s^{-1} .

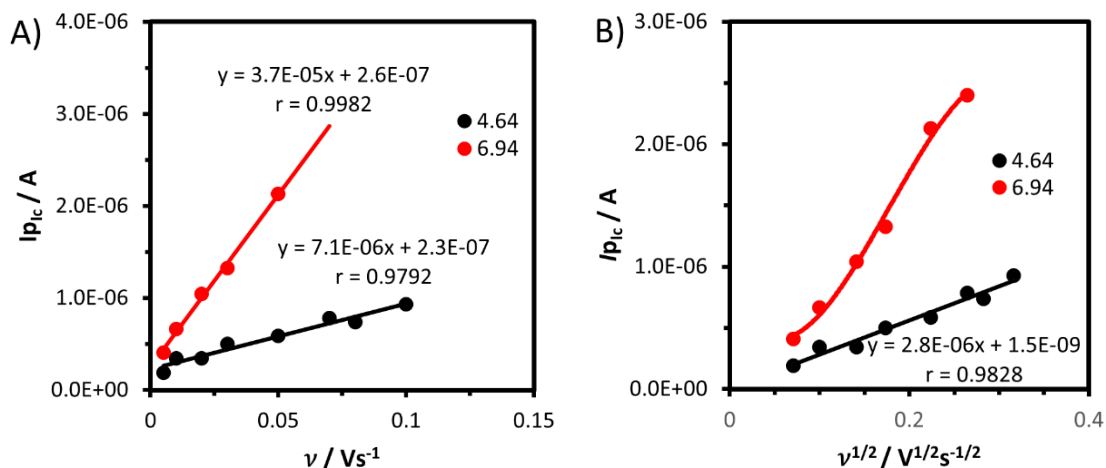
Za anodni pik Ia ERL koncentracije 2×10^{-4} M, pri pH 4,64 i 6,94, praćen je uticaj brzine promene potencijala (ν) na struju pika. Dobijena je linearna zavisnost I_p od ν (Slika 4.6, Tabela 4.5), što je karakteristično za procese kontrolisane adsorpcijom. Dodatno, vrednosti nagiba veće od 0,6 za zavisnosti $\log I_p$ od $\log \nu$ potvrđuju ovaj zaključak [511].



Slika 4.6. Uticaj brzine promene potencijala na intenzitet struje oksidacionog pika Ia; pH = 4,64 (—), pH = 6,94 (—).

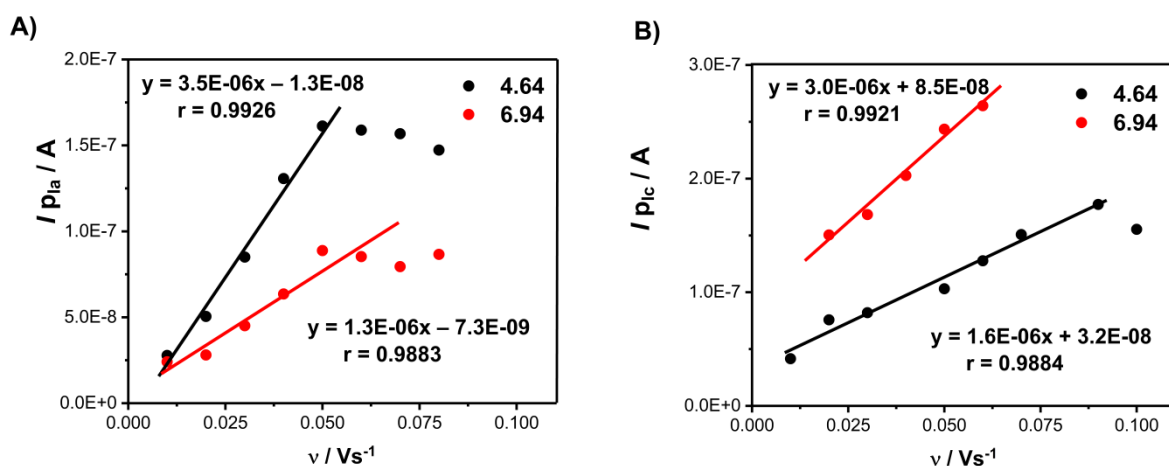
Redukcija ERL koncentracije 2×10^{-4} M pri pH 6,94 mogla je da se ispita samo u užem opsegu brzina skeniranja, od 10 do 80 mV s^{-1} , zbog narušavanja oblika pikova sa povećanjem ν . Katodni pik Ic pri pH 4,64 ukazao je na proces sa mešovitom difuziono-adsorpcionom kontrolom. Na to ukazuju približno jednako dobri linearni odnosi za obe zavisnosti, I_p od ν i I_p od $\nu^{1/2}$, sa koeficijentima korelacije (r) oko 0,98, kao i nagib zavisnosti $\log I_p$ od $\log \nu$, koji je iznosio 0,49. Ova vrednost nagiba poklapa se sa teorijskom vrednošću od 0,5, koja predstavlja granični kriterijum za razlikovanje difuzione i adsorpcione prirode procesa [511].

Pri pH 6,94, sa druge strane, adsorpcija postaje dominantna, na šta ukazuju linearna zavisnost I_p od ν i nagib zavisnosti $\log I_p$ od $\log \nu$ od 0,684. Sve navedene regresione jednačine, zajedno sa koeficijentima korelacije, prikazane su u Tabeli 4.5, dok su odgovarajući grafici prikazani na Slici 4.7.



Slika 4.7. Uticaj brzine promene potencijala na intenzitet struje redukcionog pika $I_{p/c}$. A) Zavisnost $I_{p/c}$ od v ; B) Zavisnost $I_{p/c}$ od $v^{1/2}$. pH = 4,64 (—), pH = 6,94 (—). Koncentracija ERL $c = 2 \times 10^{-4}$ M.

Radi potpunijeg razumevanja elektrohemijskog ponašanja ERL, uticaj brzine skeniranja ispitan je i pri nižoj koncentraciji ERL od 2×10^{-6} M. Pri ovoj koncentraciji, povećanje struje pika moglo je da se prati samo pri brzinama skeniranja manjim od 70 mV s⁻¹, dok je pri višim brzinama dolazilo do saturacije struje. Kao što je prikazano u Tabeli 4.5, adsorpcioni efekat potvrđen je za oksidacioni pik Ia (Slika 4.8A), dok je kod redukcionog pika Ic (Slika 4.8B) adsorpciona priroda bila nešto izraženija u poređenju sa višom koncentracijom ERL.



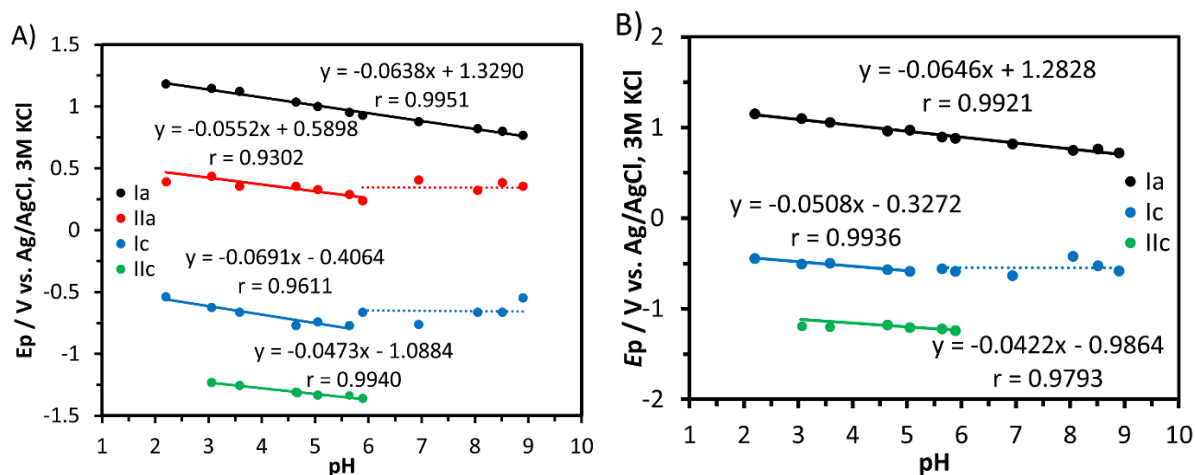
Slika 4.8. Zavisnost I_p od v za: A) oksidacioni pik Ia; B) redukcionu pik Ic pri pH = 4,64 (—) i pH = 6,94 (—). Koncentracija ERL $c = 2 \times 10^{-6}$ M.

Drugi katodni pik, I_{Ic} , javlja se samo pri pH 4,64 i to na veoma negativnim potencijalima. Budući da je slabo izražen i da se nalazi u blizini potencijala izdvajanja vodonika, precizno određivanje visine pika bilo je otežano. Zbog toga navedene zavisnosti nisu pokazale visoke vrednosti koeficijenta korelacije (Tabela 4.5), ali dobijeni rezultati ipak ukazuju na to da je proces pretežno kontrolisan difuzijom [512]. Pri nižoj koncentraciji ERL od 2×10^{-6} M, drugi katodni pik nije mogao biti detektovan.

Tabela 4.5. Regresione jednačine i koeficijenti korelacije linearnih zavisnosti $I_p = f(v)$, $I_p = f(v^{1/2})$ i $\log I_p = f(\log v)$, pri pH 4,64 i pH 6,94.

pH	Konc.	Pik	$I_p / A = f(v / V s^{-1})$	r	$I_p / A = f(v^{1/2} / V^{1/2} s^{-1/2})$	r	$\log I_p = f(\log v)$	r
(M)								
4,64	2×10^{-4}	Ia	$1,636 \times 10^{-5} v + 2,949 \times 10^{-7}$	0,9944	Nelinearno	/	$0,625 \log v - 5,113$	0,9950
		Ic	$7,110 \times 10^{-6} v + 2,265 \times 10^{-7}$	0,9792	$2,795 \times 10^{-6} v^{1/2} + 1,460 \times 10^{-9}$	0,9828	$0,489 \log v - 5,568$	0,9803
		IIc	nelinearno	/	$1,780 \times 10^{-6} v^{1/2} + 1,492 \times 10^{-7}$	0,9519	$0,352 \log v - 5,782$	0,9536
	2×10^{-6}	Ia	$3,473 \times 10^{-6} v - 1,311 \times 10^{-8}$	0,9926	Nelinearno	/	$0,982 \log v - 5,584$	0,9848
		Ic	$1,616 \times 10^{-6} v + 3,225 \times 10^{-8}$	0,9884	$6,436 \times 10^{-6} v - 2,480 \times 10^{-8}$	0,9804	$0,592 \log v - 6,171$	0,9792
		IIc	nelinearno	/	Nelinearno	/	Nelinearno	/
6,96	2×10^{-4}	Ia	$7,600 \times 10^{-6} v + 6,976 \times 10^{-8}$	0,9926	Nelinearno	/	$0,667 \log v - 5,477$	0,9814
		Ic	$3,726 \times 10^{-5} v + 2,574 \times 10^{-7}$	0,9982	Nelinearno	/	$0,684 \log v - 4,815$	0,9957
		IIc	nelinearno	/	Nelinearno	/	Nelinearno	/
	2×10^{-6}	Ia	$1,310 \times 10^{-6} v - 7,309 \times 10^{-9}$	0,9883	Nelinearno	/	$0,717 \log v - 6,228$	0,9477
		Ic	$3,025 \times 10^{-6} v + 8,488 \times 10^{-8}$	0,9921	$1,163 \times 10^{-6} v - 2,089 \times 10^{-8}$	0,9851	$0,539 \log v - 5,926$	0,9763
		IIc	nelinearno	/	Nelinearno	/	Nelinearno	/

Uticaj pH vrednosti sredine na redoks reakcije erlotiniba ispitan je u različitim puferским rastvorima, u pH opsegu od 2,0 do 9,0, praćenjem promena struje pika (I_p) i potencijala pika (E_p). Pik Ia javlja se pri svim ispitivanim pH vrednostima, pri čemu se sa porastom pH njegov potencijal pomera sa +1,2 V na +0,8 V. Pikovi IIa i Ic takođe se mogu detektovati pri svim pH vrednostima. Njihovi potencijali se značajno pomeraju u kiselim rastvorima, dok se u neutralnoj i baznoj sredini ne uočava izražena promena potencijala. Izostanak promene potencijala pika u ovim uslovima može se objasniti time što protoni ne učestvuju u redoks procesima, već se odvija samo prenos elektrona. Pik IIc javlja se u užem pH opsegu, od 3,0 do 6,0, uz pomeranje potencijala pika ka negativnijim vrednostima sa porastom pH. Uticaj pH na potencijale svih CV pikova ERL prikazan je na Slici 4.9A.



Slika 4.9. Uticaj pH na potencijale pikova ERL koncentracije 2×10^{-4} M dobijene pomoću A) CV i B) DPV; ● – pik Ia, ● – pik IIa, ● – pik Ic and ● – pik IIc.

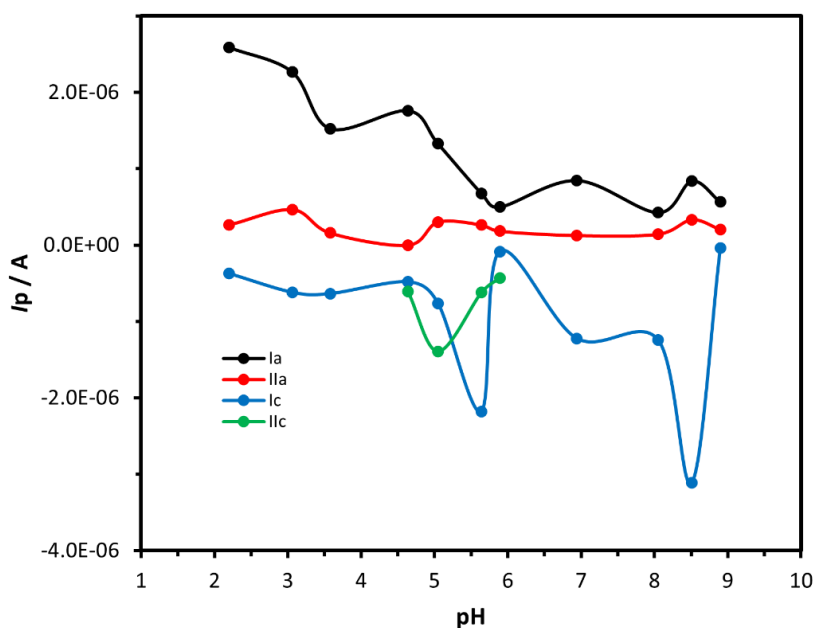
Za pik Ia, nagib od 63,8 mV/pH, dobijen u celom ispitivanom pH opsegu, blizak je teorijskoj vrednosti od 59 mV/pH [447]. Ova vrednost ukazuje na to da je u koraku koji određuje brzinu oksidacionog procesa uključen jednak broj protona i elektrona. Iako je linearna zavisnost dobijena sa visokim koeficijentom korelacije ($r > 0,99$), detaljnija analiza omogućava izdvajanje dva odvojena

linearna segmenta. Vrednosti nagiba ovih segmenata, 71,5 mV/pH i 53,4 mV/pH, potvrđuju učešće istog broja elektrona i protona u oba pH područja. Iz preseka ovih pravih može se na X-osi odrediti $pK_a = 5,8$, koja se može povezati sa protonovanjem/deprotonovanjem sekundarne aromatične amino grupe, što je u dobroj saglasnosti sa vrednošću prijavljenom za ERL u literaturi ($pK_a = 5,4$ [513]).

Potencijal pika IIa pokazao je pH zavisnost samo u kiseljoj sredini. Pomeraj potencijala pika od 55 mV po pH jedinici ukazuje da se i u ovom oksidacionom procesu prenosi jednak broj protona i elektrona. U neutralnim i baznim rastvorima prenos protona nije uključen, što se može zaključiti na osnovu odsustva uticaja pH na E_{pIIa} .

Katodni pik Ic pokazao je rezultate kvalitativno slične anodnom piku IIa. Nagib zavisnosti E_p od pH iznosio je 69 mV/pH pri $pH < 6,0$, dok pri $pH > 6$ nije uočen uticaj pH na potencijal pika. Ovakvo ponašanje ponovo ukazuje na učešće jednakog broja protona i elektrona u redukcionom procesu u kiseljoj sredini, kao i na odsustvo prenosa protona u neutralnim i alkalnim rastvorima. Rezultati $\Delta E_p/\Delta pH$ ukazuju da se i u redukcionom procesu karakterisanom pikom IIc, kao i u prethodnim slučajevima, troši jednak broj protona i elektrona, pri čemu nagib zavisnosti E_{pIIc} od pH iznosi približno 47 mV/pH u opsegu $3,0 < pH < 6,0$.

Razlika između potencijala pika i potencijala na polovini visine pika izračunata je u celom ispitivanom pH opsegu za sve ispitivane pikove primenom jednačine 47 iz podpoglavlja 1.9.2.1. za ireverzibilne elektrodne procese [445]. Izračunate vrednosti za pik Ia iznosile su 64 mV pri pH 4,6 i 70 mV pri pH 7,0, dok su pikovi Ic i IIa bili značajno širi i posledično pokazali vrednosti $|E_p - E_{p1/2}|$ između 100 i 120 mV, pa čak i više u alkalnim rastvorima. Imajući u vidu da za ireverzibilan proces vrednost koeficijenta prenosa treba da bude ≤ 1 , odnosno u praksi između 0,3 i 0,7, proizilazi da bi korak koji određuje brzinu procesa trebalo da uključuje prenos jednog elektrona u svim navedenim procesima. U kiseljoj sredini, pri $pH \leq 3$, razlika između potencijala pika i potencijala na polovini visine pika za pik Ia pokazala je niže vrednosti (30–50 mV), što ukazuje na otpuštanje dva elektrona, u skladu sa znatno većim intenzitetima pikova pod ovim uslovima. U slučaju pika IIc, potencijal koji odgovara njegovoj širini bio je manji od 40 mV, što ukazuje na učešće dva elektrona u redukciji. Struja pika za sve anodne i katodne pikove u različitim pH sredinama prikazana je na slici 4.10.

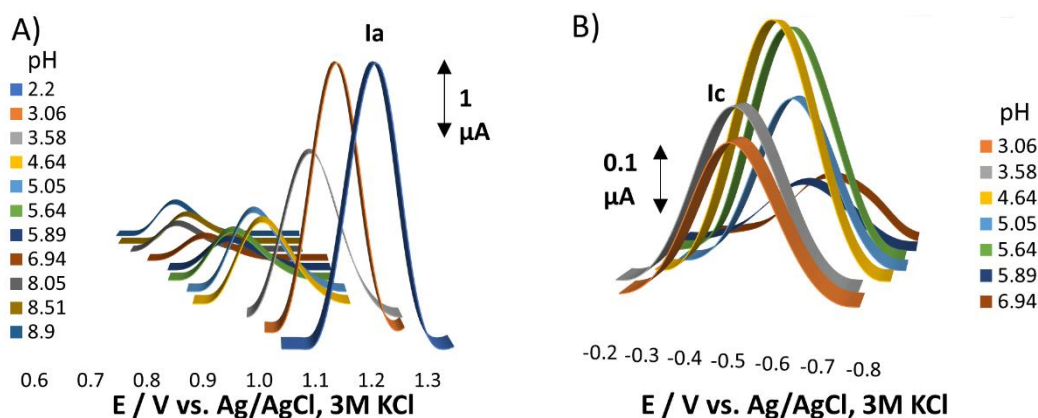


Slika 4.10. Uticaj pH na intenzitet struje pikova u CV voltamogramima ERL koncentracije 2×10^{-4} M; ● – pik Ia, ● – pik IIa, ● – pik Ic i ● – pik IIc.

4.2.2. DPV i SWV analiza erlotiniba na nemodifikovanoj GCE

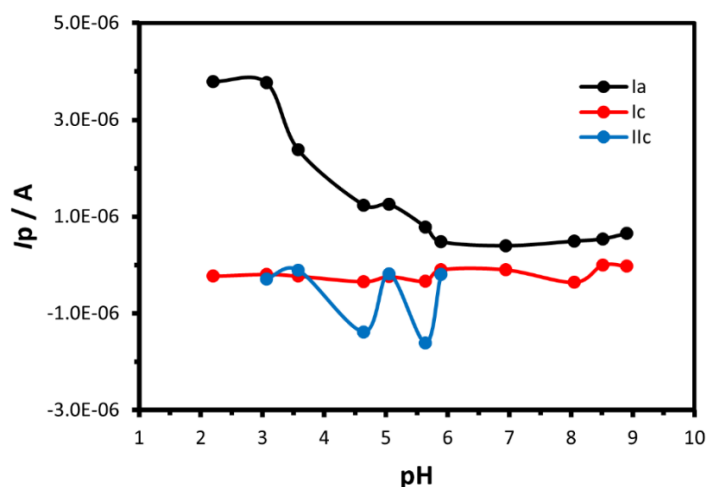
DPV metoda je dodatno korišćena za ispitivanje elektrohemijskog ponašanja ERL u prethodno opisanom pH opsegu. Pri skeniranju potencijala u pozitivnom smeru, jedan anodni pik registrovan je u celom ispitivanom pH području, pri čemu se E_p pomerao od +1,2 V do +0,7 V (Slika 4.11A). Ovaj pik odgovara piku Ia, prethodno opisanom na CV snimcima. Zavisnost E_p od pH bila je linearna (Slika 4.9B) i opisana jednačinom $E_{pIa} = -0,0646\text{pH} + 1,2828$. Nagib ove zavisnosti, blizak teorijskoj vrednosti, potvrđuje da je u proces uključen jednak broj protona i elektrona. Drugi oksidacioni pik, IIa, nije detektovan primenom DPV metode.

Pri DPV snimanjima u smeru ka negativnim potencijalima uočena su dva redukciona pika. Prvi pik odgovarao je piku Ic (Slika 4.11B), a njegov E_p se, u zavisnosti od pH vrednosti pufera, pomerao od -0,45 V do -0,64 V. U pH opsegu 2,2–6,0 zavisnost E_p od pH bila je linearna (Slika 4.9B) i opisana jednačinom $E_{pIc} = -0,0508\text{pH} - 0,3272$. Dobijena vrednost $\Delta E_p / \Delta \text{pH}$ potvrđuje da u ovom procesu učestvuje jednak broj elektrona i protona.



Slika 4.11. 3D prikaz odabranih DP voltamograma ERL koncentracije 2×10^{-4} M snimljenih pri različitim pH vrednostima: A) oksidacioni pik Ia; B) redukcioni pik Ic.

Drugi katodni pik, IIc, detektovan je u pH opsegu 3–6. Za ovaj pik uočen je nešto manji pomerao potencijala, od 47 mV/pH, ali dobijena vrednost i dalje ukazuje na učešće jednakog broja elektrona i protona u redukcionom procesu. Uticaj pH na struje DPV pikova prikazan je na Slici 4.12.

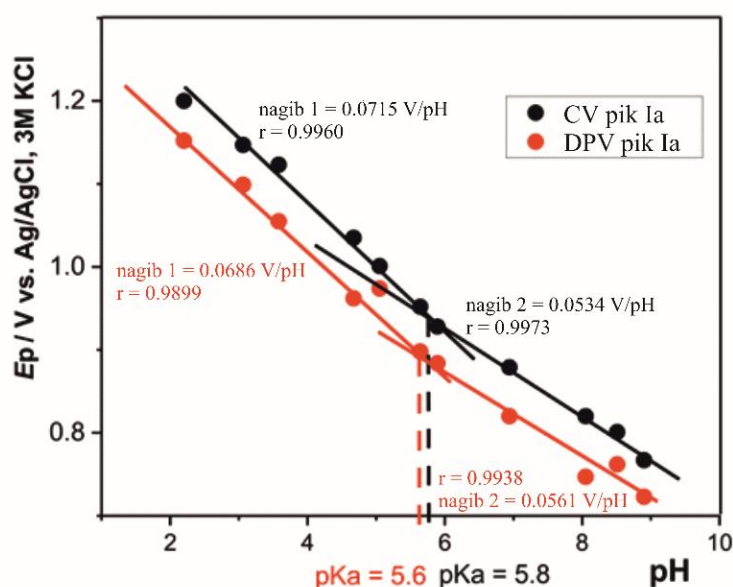


Slika 4.11. Uticaj pH na intenzitet struje pikova u DPV voltamogramima ERL koncentracije 2×10^{-4} M; ● – pik Ia, ● – pik Ic i ● – pik IIc.

Širina DPV pika na polovini visine ($W_{1/2}$) analizirana je radi procene broja elektrona uključenih u oksidacione i redukcionne procese. Poznato je da ireverzibilni sistemi imaju šire pikove u odnosu na reverzibilne sisteme [443]. U skladu sa tim, izračunate vrednosti $W_{1/2}$ od približno 120 mV za pik Ia i 200 mV za pik Ic dodatno potvrđuju zaključak izveden na osnovu CV rezultata, prema kojem se u oba procesa razmenjuje jedan elektron.

Slično rezultatima dobijenim primenom CV metode, DPV pikovi Ia u kiselim rastvorima ($\text{pH} \leq 3$) bili su oštiri, sa vrednostima $W_{1/2} \approx 80\text{--}90$ mV, što ukazuje na mogući prenos dva elektrona u ovim uslovima. Isti zaključak o učešću dva elektrona može se izvesti i za pik IIc, na osnovu vrednosti $W_{1/2}$ koje su se nalazile u opsegu 45–65 mV.

Uticaj pH na potencijal DPV pika Ia dodatno je analiziran, kao i kod prethodno prikazanih CV rezultata. Na osnovu ove zavisnosti određena je vrednost $\text{pK}_a = 5,6$ sekundarne aromatične amino grupe (Slika 4.13), što pokazuje dobro slaganje sa literaturnim podacima.



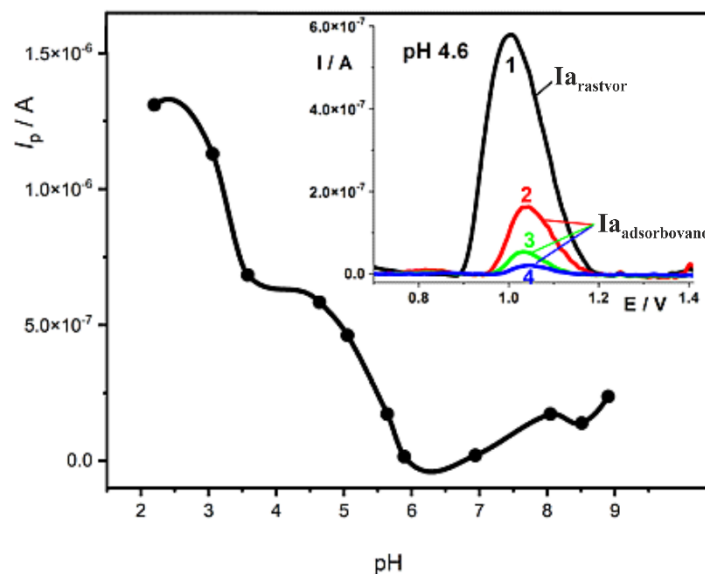
Slika 4.13. Zavisnost E_p od pH za oksidacioni pik Ia ERL koncentracije 2×10^{-4} M, dobijena primenom ● – CV i ● – DPV metode.

SWV metoda je takođe primenjena za ispitivanje elektrohemijškog ponašanja ERL. Dobijeni rezultati bili su slični rezultatima dobijenim primenom DPV metode i dodatno su potvrdili ireverzibilnost elektrodnih procesa, kao i broj razmenjenih elektrona i protona. Posebna pažnja bila je usmerena na SWV oksidacioni pik Ia. Uticaj pH na potencijal ovog pika opisan je jednačinom $E_{pIa} = -0,0623\text{pH} + 1,3057$; $r = 0,9928$, dok je uticaj pH na visinu pika Ia prikazan na Slici 4.14.

Iako je maksimalna struja pika dobijena pri $\text{pH} \leq 3$, najbolja stabilnost i reproduktivnost pika postignute su u opsegu $3,5 \leq \text{pH} \leq 5,0$. Pri $\text{pH} > 5,5$, pik ERL dobijen SWV metodom bio je relativno slabo izražen. Budući da je ovaj oksidacioni proces prethodno identifikovan kao proces kontrolisan adsorpcijom, dodatno je provereno ponašanje adsorbovanog ERL snimanjem SW voltamograma.

U tu svrhu, GCE je uronjena u rastvore ERL različitih koncentracija tokom 30 minuta, zatim je izvađena i isprana dejonizivanim vodom kako bi se uklonio višak neadsorbovanog ERL, preneti u elektrohemijšku ćeliju koja je sadržala acetatni pufer pH 4,64 i snimljen je voltamogram. Kao što se vidi iz umetnutog prikaza na Slici 4.14, adsorbovani ERL dao je niže struje pika i nešto pozitivnije potencijale za pik Ia u poređenju sa pikom dobijenim direktno iz rastvora, bez prethodne adsorpcije.

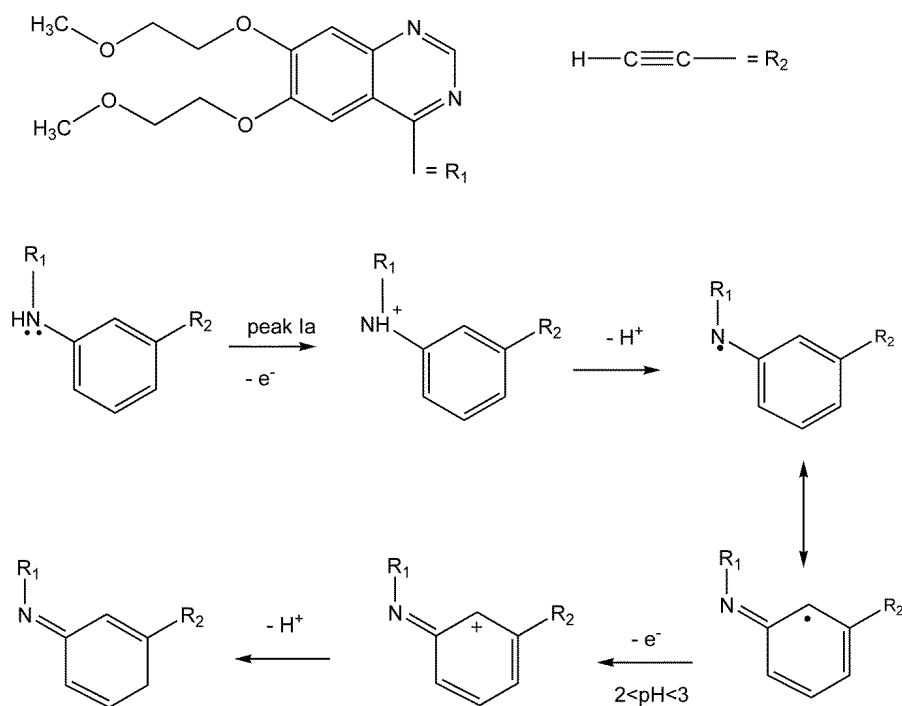
Ovakva zapažanja bila su očekivana za jedinjenje koje se lako adsorbuje, posebno pri primeni tehnike prenosa.



Slika 4.14. Grafik zavisnosti I_p od pH za oksidacioni pik Ia dobijen SWV metodom; umetnuti prikaz: pik Ia dobijen SWV metodom pri pH 4,64 za ERL koncentracije: 2×10^{-4} M u rastvoru (1), i nakon 30 min adsorpcije iz rastvora ERL koncentracije 2×10^{-4} M (2), 2×10^{-5} M (3) i 2×10^{-6} M (4).

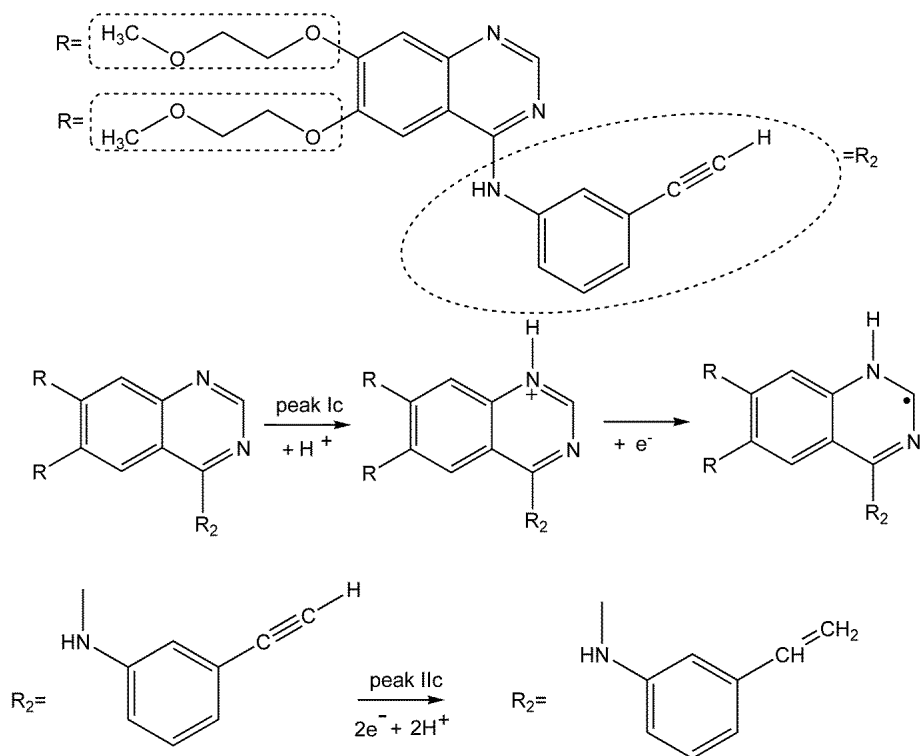
4.2.3. Mehanistička analiza reakcija oksidacije i redukcije erlotiniba

Na osnovu CV i DPV rezultata, oksidacioni proces ERL, karakterisan pikom Ia, zahteva prenos jednog protona i jednog elektrona, osim u kiseloj sredini, gde se oksidacija odvija uz razmenu 2 elektrona i 2 protona. Može se pretpostaviti da je oksidacija ERL povezana sa sekundarnom aromatičnom amino grupom, koja nakon deprotonovanja i gubitka jednog elektrona daje nitrenijum radikal. U kiseloj sredini ovaj proces može se nastaviti otpuštanjem drugog elektrona i formiranjem karbokationa, uz njegovu stabilizaciju do konjugovanog imina. Predloženi mehanizam, koji je u skladu sa već objavljenim literaturnim podacima [468,514], prikazan je na slici 4.15.



Slika 4.15. Predloženi mehanizam oksidacije ERL.

Redukcija ERL predstavljena pikom Ic, prema rezultatima CV i DPV, odvija se uz primanje jednog elektrona i jednog protona od strane atoma azota u hinazolinskom prstenu. Pik Ilc je najverovatnije posledica redukcije terminalne acetilenske grupe u R_2 bočnom lancu, koja se odvija pri $\text{pH} < 6,0$, uz potrošnju dva elektrona i dva protona prema mehanizmu prikazanom na slici 4.16.



Slika 4.16. Predloženi mehanizam redukcije ERL.

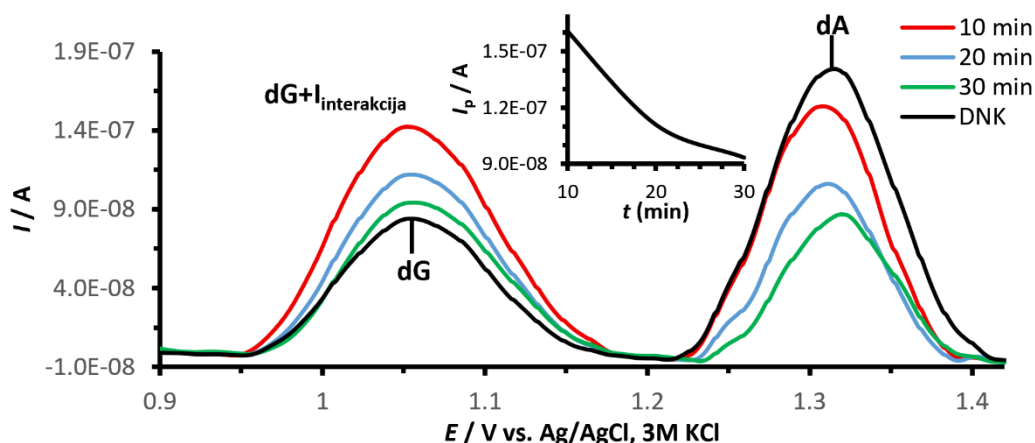
4.2.4. Elektrohemijsko ispitivanje interakcije erlotiniba sa DNK

Za ispitivanje interakcije između ERL i DNK korišćen je višeslojni elektrohemijski DNK-biosenzor, dok su merenja izvedena primenom SWV metode. Ova metoda je prethodno korišćena u našem timu za ispitivanje oksidacije DNK i pokazala se pogodnijom u odnosu na DPV, zbog veće brzine merenja, bolje ponovljivosti, jasnije razdvojenih voltamograma i smanjenog trovanja površine elektrode [465,515]. Merenja su izvedena u acetatnom puferu pH 4,64, jer su pri ovoj pH vrednosti dobijeni viši i bolje oblikovani oksidacioni pikovi DNK nego u neutralnom fosfatnom puferu. Sabilnost heliksa DNK pri pH 4,64 prethodno je potvrđeno u drugim studijama [516], kao i u ranije objavljenom radu koji je metodološki povezan sa ovom studijom [465].

Interakcija je praćena nakon inkubacije DNK-biosenzora u rastvorima ERL različitih koncentracija, pripremljenim u acetatnom puferu pH 4,64, tokom 30 minuta. Kao kontrola korišćen je DNK biosenzor inkubiran tokom istog vremenskog perioda u acetatnom puferu pH 4,64. Na voltamogramu kontrolnog DNK-biosenzora detektovana su dva oksidaciona pika: pik na +1,05 V, koji odgovara oksidaciji dezoksiguanozina (dG), i pik na +1,31 V, koji odgovara oksidaciji dezoksiadenozina (dA) (Slika 4.17) [515].

Interakcija malih molekula sa površinski imobilisanom DNK može izazvati promene oksidacionih pikova dG i dA, kao posledicu promena u morfologiji DNK [517]. Kod višeslojnog biosenzora površina elektrode je prekrivena DNK slojem, čime se smanjuje mogućnost nespecifične adsorpcije interagujućih molekula. Zbog toga odgovor biosenzora potiče prvenstveno od jedinjenja ugrađenog u DNK sloj, bez značajnog doprinosa slobodnog jedinjenja iz rastvora [517]. Nakon inkubacije biosenzora u rastvoru ERL, registrovana su dva SWV pika: prvi, označen kao $dG + I_{\text{interakcija}}$, koji potiče od preklapljenih oksidacionih struja dezoksiguanozina i ERL unutar DNK sloja, i drugi, koji odgovara dA piku. Zbog složene prirode prvog pika, on nije korišćen za procenu interakcije, pa su kao informativne praćene promene visine i položaja dA pika.

Početno ispitivanje izvedeno je sa ciljem utvrđivanja optimalnog vremena inkubacije. U tu svrhu, DNK-biosenzor je inkubiran u rastvoru ERL koncentracije 2×10^{-5} M tokom 10, 20 i 30 minuta, pri čemu je sa povećanjem vremena inkubacije registrovano smanjenje pika (Slika 4.17).



Slika 4.17. SWV voltamogrami DNK-biosenzora, korigovani u odnosu na baznu liniju, nakon inkubacije u rastvoru ERL koncentracije 2×10^{-5} M tokom različitih vremena inkubacije.

Smanjenje struje dA predstavljeno je kao normalizovana struja pika, koja označava procenat promene signala ($d(dA)$), a izračunata je prema jednačini 50 iz poglavlja 1.9.2.2.

Normalizovane vrednosti struje pika i promene potencijala dA pika za različita vremena inkubacije DNK-biosenzora u rastvoru ERL koncentracije 2×10^{-5} M prikazane su u Tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Normalizovane struje pikova (d(dA) %) i potencijali pikova ($E_{p,dA}$) dobijeni nakon različitog vremena inkubacije DNK biosenzora u rastvoru ERL koncentracije 2×10^{-5} M.

Vreme (min)	d(dA) (%)	$E_{p,dA}$ (V)	ΔE_p (V)
			($E_{p-DNK} = 1,315$ V)
10	87,50	1,308	-0,007
20	60,33	1,311	-0,004
30	50,76	1,319	0,004

Smanjenje I_p između 20. i 30. minuta inkubacije bilo je znatno manje nego između 10. i 20. minuta, dok je vrednost d(dA) nakon 30 minuta iznosila približno 50%. Ovakav rezultat ukazuje da je inkubacija od 30 minuta bila dovoljna za dobijanje kvantitativnog odgovora koji odgovara formiranoj interakciji između ERL i DNK.

Uticaj koncentracije ERL na interakciju sa DNK ispitan je korišćenjem serije rastvora ERL u koncentracionom opsegu od 2×10^{-7} M do 5×10^{-5} M, pri vremenu inkubacije od 30 minuta. SWV merenja su pokazala da se sa povećanjem koncentracije ERL smanjuje visina dA pika na +1,3 V (Slika 4.18A), što se može povezati sa vezivanjem ERL za DNK i ometanjem oksidacionog procesa dezoksiadenozina. Normalizovane vrednosti struje pika, kao i promene potencijala dA pika pri različitim koncentracijama ERL, prikazane su u Tabeli 4.7. Smanjenje struje dA pika do 30% početne vrednosti ukazuje na izraženu interakciju ERL sa DNK.

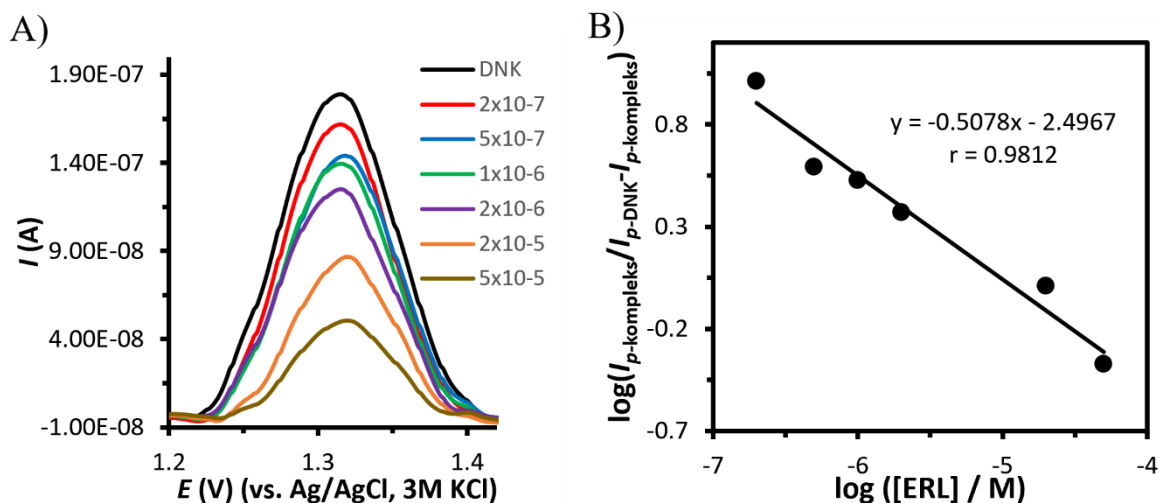
Tabela 4.7. Normalizovane struje i potencijali pika dA dobijeni primenom SWV metode na DNK biosenzoru inkubiranom u rastvorima različitih koncentracija ERL.

Koncentracija ERL (M)	d(dA) (%)	E_p (V)	ΔE_p (V)
			($E_{p-DNK} = 1,315$ V)
2×10^{-7}	91,13	1,315	0
5×10^{-7}	79,56	1,318	0,003
1×10^{-6}	77,07	1,315	0
2×10^{-6}	70,09	1,315	0
2×10^{-5}	50,48	1,319	0,004
5×10^{-5}	29,66	1,319	0,004

Smanjenje dA struje u prisustvu ERL u opsegu od 2×10^{-7} M do 5×10^{-5} M dodatno je ispitano kako bi se izračunala konstanta vezivanja (K) ERL za DNK. Imajući u vidu da je koncentracija DNK adsorbovane na površini elektrode bila konstantna, dok se koncentracija ERL tokom eksperimenta povećavala, K je dobijena iz odsečka linearne zavisnosti opisane jednačinom 64 u podpoglavlju 1.9.2.2. (Slika 4.18B):

$$\log \left(\frac{I_{p-kompleks}}{I_{p-DNK} - I_{p-kompleks}} \right) = -2,4967 - 0,5078 \log[ERL] \quad (70)$$

Izračunata vrednost iznosila je $K = 8,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

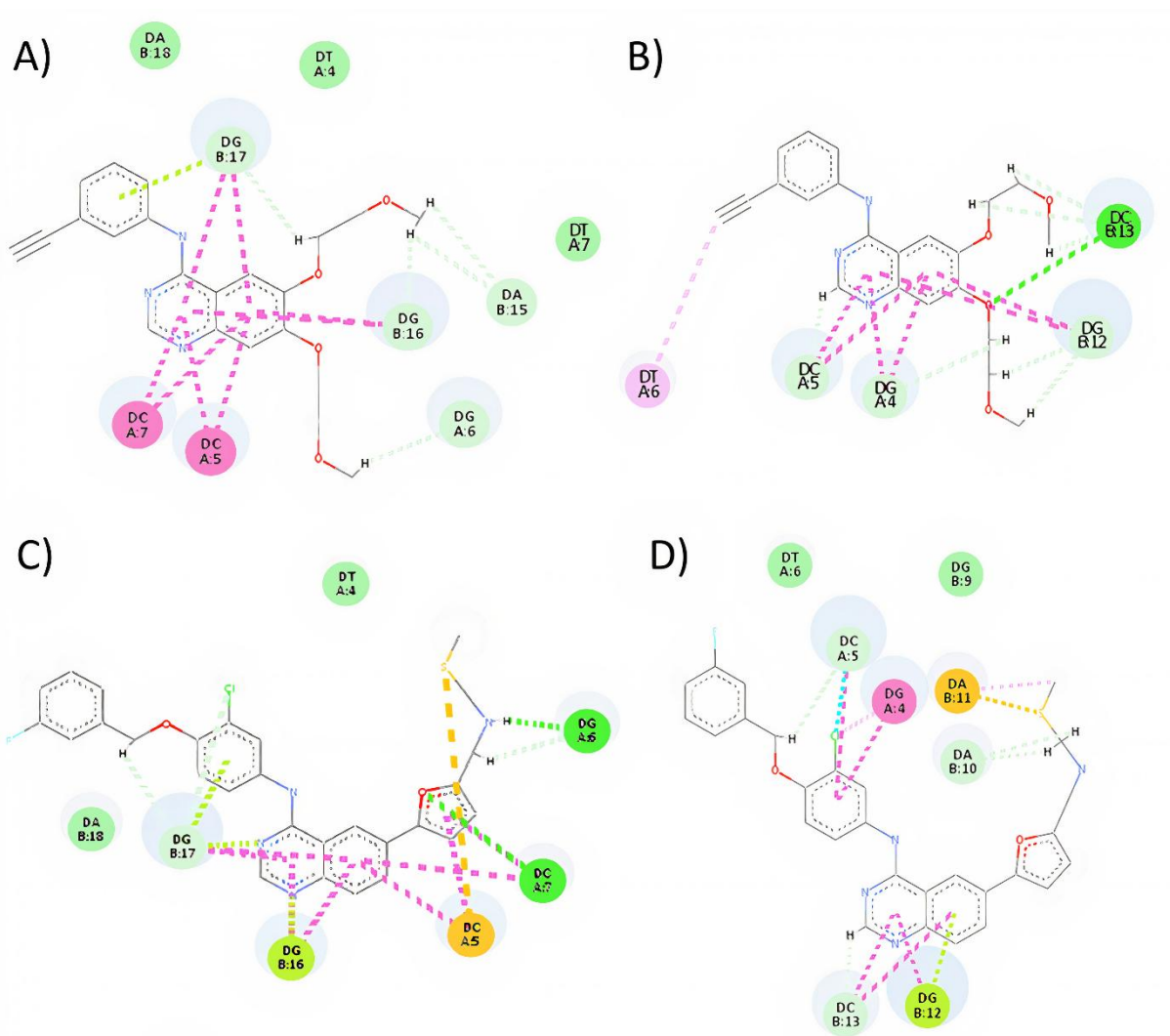


Slika 4.18. A) SWV voltamogrami korigovani u odnosu na baznu liniju, koji prikazuju pik dA DNK-biosenzora inkubiranog u seriji rastvora ERL; B) Zavisnost of $\log\left(\frac{I_{p-kompleks}}{I_{p-DNK} - I_{p-kompleks}}\right)$ od $\log [ERL]$, korišćena za određivanje konstante vezivanja ERL za DNK.

Dobijena vrednost K , zajedno sa malim pomerajem E_p vrednosti, može ukazivati na delimično interkalacioni način vezivanja ERL za DNK i/ili na moguće vezivanje u žleb DNK [518]. Vrednost nagiba dobijene jednačine ($n = 0,5078 \approx 0,5$) ukazuje na to da se između ERL i DNK formira asocijacioni kompleks u odnosu 2:1. Promena Gibsove slobodne energije je potom izračunata na osnovu određene konstante vezivanja kompleksa DNK–ERL, primenom jednačine 65 iz podpoglavlja 1.9.2.2. Dobijena vrednost $\Delta G = -28,05 \text{ kJ mol}^{-1}$ ukazuje na spontanost procesa vezivanja i stabilnost formiranog adsorbovanog kompleksa.

4.2.5. Računarsko modelovanje interakcije erlotiniba sa DNK

Molekulskim dokingom dobijene su vezivne poze ERL i referentnog jedinjenja LAP u obe korišćene DNK strukture, što ukazuje na mogućnost vezivanja oba jedinjenja i putem interkalacije i u manji žleb DNK. ERL i LAP ostvaruju različite interakcije sa nukleinskim bazama u odgovarajućim sekvencama, a njihove predviđene poze prikazane su na Slici 4.19.



Slika 4.19. 2D interakcije: A) ERL vezan za mali žleb (1BNA); B) interkalirani ERL (2D55); C) LAP vezan za mali žleb (1BNA) i D) interkalirani LAP (2D55); tamnozeleno – konvencionalne vodonične veze, svetlozeleno – ugljenik-vodonične veze, srednje zeleno – *van der Waals*-ove interakcije, limeta-zeleno – π -usamljeni elektronski par interakcije, ljubičasto – π -sigma interakcije, roze/magenta – π - π naslagane interakcije, svetloroze – alkil i π -alkil interakcije, narandžasto – π -sumpor interakcije, tamnonarandžasto – π -anjonske interakcije, dok žuto-narandžasto označava sumpor-X interakcije.

Kao što je prikazano na Slici 4.19, pri dokovanju u mali žleb DNK, hinazolinski prsten ERL formira hidrofobne interakcije sa ispitivanom DNK sekvencom. Hidrofobne interakcije ostvaruju se i preko benzenovog prstena, kao i preko obe metoksi grupe. U slučaju interkalacije, ERL ostvaruje hidrofobne kontakte preko hinazolinskog prstena, oba 2-metoksietoksi supstituenta i etinil grupe. Pored toga, kiseonik jednog metoksietoksi supstituenta formira vodoničnu vezu sa dezoksicitidinom (DC B:13).

Kada je LAP dokovan u mali žleb DNK, dve vodonične veze formiraju se preko furanskog prstena, sa dezoksicitidinom (DC A:7), i preko sekundarne amino grupe povezane sa furanom, sa dezoksiguanozinom (DG A:6). Hlorbenzenski prsten, hinazolinski prsten i metilsulfoniletil supstituent dodatno učestvuju u različitim hidrofobnim interakcijama sa DNK. U interkaliranoj pozi, LAP formira brojne hidrofobne kontakte, koji uključuju hinazolinski prsten, hlorbenzenski prsten i metilsulfoniletil supstituent.

Dobijene GoldScore vrednosti (Tabela 4.8) ukazuju na veći afinitet LAP prema obe DNK strukture u poređenju sa ERL. Ipak, za potpunije razmatranje mogućih načina vezivanja bila je potrebna dodatna analiza.

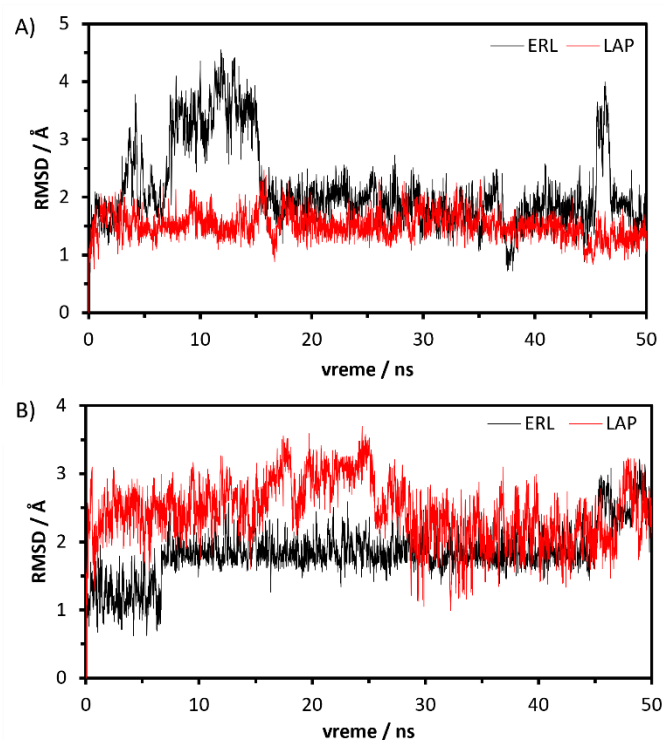
Tabela 4.8. GoldScore vrednosti dobijene u doking studijama.

Način vezivanja	ERL	LAP
Vezivanje za manji žljeb (1BNA)	72,75	95,13
Interkalacija (2D55)	75,06	86,57

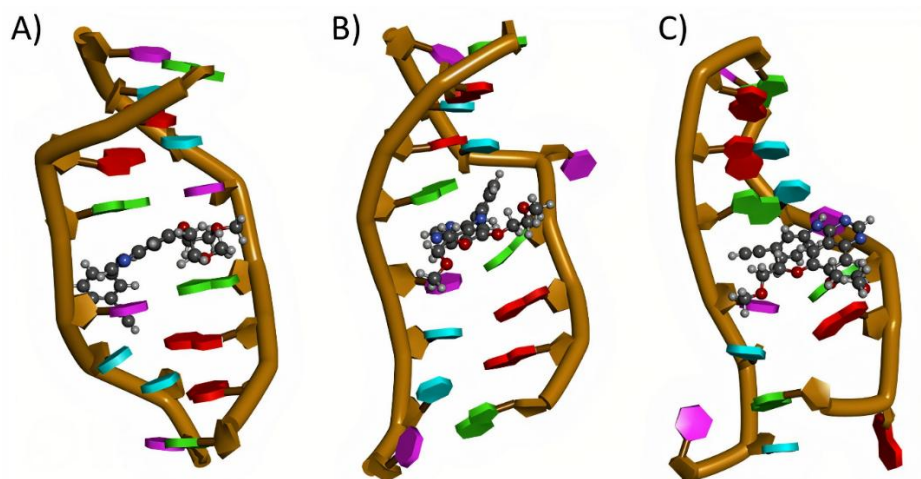
Kompleksi ERL i LAP podvrgnuti su MD simulacijama radi procene stabilnosti dobijenih kompleksa. Tokom produkcijske faze MD simulacije pokazano je da se i ERL i LAP odvajaju iz malog žljeba DNK u prvih 10 ns, dok interkalirani ligandi ostaju vezani za korišćenu DNK strukturu. Budući da je tokom simulacije primećeno odmotavanje DNK strukture, što je karakteristično za interkalaciju, stabilnost interakcije između liganada i DNK dodatno je procenjena praćenjem promena *RMSD* vrednosti nukleotida u okviru vezivnog mesta.

U kompleksima koji odgovaraju vezivanju za mali žljeb, fluktuacije *RMSD* vrednosti nukleotida u vezivnom mestu bile su veće od 2 Å u pojedinim delovima simulacije, dok su ligandi još uvek bili vezani za DNK. Nasuprot tome, u interkalacionim kompleksima ERL i LAP, *RMSD* vrednosti nukleotida u vezivnom mestu nakon 20 ns uglavnom su oscilovale ispod 2 Å, što ukazuje na relativno stabilnu interakciju između liganada i DNK. Ipak, kod ERL kompleksa ova granica je pređena u nekoliko snimaka MD trajektorije, što može ukazivati na nešto izraženije fluktuacije, odnosno na nešto manju stabilnost u poređenju sa LAP kompleksom (Slika 4.20).

Ovi rezultati, zajedno sa voltametrijskim ispitivanjima, ukazuju da bi interkalacija mogla biti dominantniji način vezivanja ERL za DNK u odnosu na vezivanje za mali žljeb. Veće fluktuacije *RMSD* vrednosti u slučaju LAP kompleksa mogu biti posledica prisustva većih strukturnih delova ovog molekula koji ne ostvaruju interakcije sa DNK, zbog čega se tokom simulacije slobodnije kreću.



Slika 4.20. *RMSD* tokom faze produkcije MD simulacije za A) nukleinske kiseline iz vezivnog mesta i B) ligande u interkalacionim kompleksima ERL-DNK i LAP-DNK.



Slika 4.21. 3D prikaz interkalacionog kompleksa ERL-DNK: A) dobijen dokingom; B) nakon 10 ns faze produkcije MD simulacije; C) nakon 50 ns faze produkcije MD simulacije.

MM/PBSA proračuni izvedeni su radi dobijanja dodatnih informacija o afinitetu ERL i LAP prema DNK (Tabela 4.9). Izračunata vrednost slobodne energije vezivanja za ERL iznosila je $-146,93$ kJ/mol, dok je za LAP dobijena vrednost od $-214,40$ kJ/mol. Dobijene vrednosti energije su niže u poređenju sa eksperimentalnim vrednostima dobijenim u ovom radu i u ranije objavljenom radu za LAP [468], što se može objasniti time što su za proračun korišćeni snimci delova MD trajektorije sa stabilnim *RMSD* fluktuacijama. Razlika između izračunatih i eksperimentalnih vrednosti može biti posledica i činjenice da je u MD simulacijama korišćena samo jedna DNK sekvenca, sa ciljem ispitivanja prirode nespecifičnog vezivanja ERL za DNK. Ipak, odnos dobijenih MM/PBSA vrednosti sličan je odnosu eksperimentalnih vrednosti, što dodatno podržava pretpostavljeni tip interakcije ERL sa DNK.

Tabela 4.9. Slobodne energije vezivanja ERL i LAP.

Metoda	ERL	LAP
MM/PBSA (kJ/mol)	$-146,93$	$-214,40$
Voltametrijski (kJ/mol)	$-28,05$	$-32,98^*$

* Izračunato na osnovu prijavljene konstante vezivanja ($K = 6,03 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) [468], korišćenjem jednačine 65 iz podpoglavlja 1.9.2.2.

4.2.6. Uporedna analiza rezultata studije sa podacima iz literature

Dobijeni rezultati ukazuju da erlotinib ostvaruje interakciju sa DNK, pri čemu interkalacija predstavlja najverovatniji dominantni način vezivanja u uslovima primenjenog elektrohemijaskog biosenzora. Ovakav nalaz je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za lapatinib, kod koga je kombinacijom elektrohemijaskih i spektroskopskih metoda potvrđeno da može da interkalira u dsDNK heliks. Za lapatinib su određene konstante vezivanja reda veličine 10^4 – 10^5 M^{-1} , a autori su na osnovu promena voltametrijaskih, UV–Vis i fluorescencionih parametara zaključili da je interkalacija najverovatniji način interakcije sa dsDNK [519]. S druge strane, za ibrutinib je takođe pokazano da interaguje sa dsDNK, ali je molekulskim dokingom kao dominantan način vezivanja predloženo vezivanje u žljeb, uz dominantan doprinos vodoničnih veza [520]. Ovi podaci ukazuju da se kod strukturno različitih inhibitora tirozin-kinaza ne mora očekivati jedinstven način vezivanja za DNK, već da aromatičnost, planarnost, fleksibilnost molekula, protonaciono stanje i eksperimentalni uslovi mogu usmeriti interakciju ka interkalaciji, vezivanju u žljeb ili spoljašnjoj elektrostatičkoj interakciji.

Rezultati ove studije razlikuju se od spektroskopske studije koje su izveli *Chen* i saradnici, u kojoj je predloženo da se erlotinib vezuje u manji žljeb DNK bogat A-T parovima [466]. U toj studiji je određena relativno niža konstanta vezivanja, $2,37 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ na 298 K, a kao dominantna sila interakcije predložene su hidrofobne interakcije, uz očuvanje B-forme DNK. Razlika u odnosu na rezultate ove studije može se objasniti pre svega razlikama u eksperimentalnom modelu. Spektroskopska ispitivanja prate interakciju ERL sa DNK u rastvoru, bez prisustva elektrodne površine, dok kod ispitivanja korišćenjem elektrohemijskog biosenzora na elektrohemijski odgovor mogu uticati i orijentacija DNK na površini, dostupnost baza, pH vrednost, vreme inkubacije i adsorpcija ERL ili ERL–DNK kompleksa na elektrodnoj površini [521].

Prethodna elektrohemijska ispitivanja ERL bila su uglavnom usmerena na njegovo oksidaciono ponašanje i voltametrijsko određivanje. *Bakirhan* i saradnici su ispitivali oksidaciju ERL na β -ciklodekstrin-modifikovanoj GCE primenom CV, DPV i SWV, pri čemu je pokazano da se oksidacioni potencijal pomera sa promenom pH vrednosti. Dobijeni nagibi zavisnosti E_p od pH ukazali su na učešće jednakog broja elektrona i protona u oksidaciji ERL. U skladu sa tim, autori su predložili oksidacioni mehanizam koji uključuje azot sekundarne aromatične amino grupe, uz nastanak radikalske, a zatim karbokatjonske forme. Ovi rezultati su u saglasnosti sa ovom studijom, posebno u delu koji se odnosi na pH-zavisnost oksidacije ERL i predloženu oksidaciju amino grupe [514].

Slični zaključci su dobijeni i u radu *Rahmanian* i saradnici, u kome je pokazano da se oksidacioni potencijal ERL pomera ka negativnijim vrednostima sa porastom pH. Nagib ove zavisnosti bio je blizak Nernstovoj vrednosti za proces u kome učestvuje jednak broj elektrona i protona, a kao moguće mesto oksidacije takođe je predložen azot sekundarne aromatične amino grupe. Na taj način, rezultati *Bakirhan* i *Rahmanian* dodatno podržavaju zaključak ove studije da je oksidacija ERL pH-zavisna proces povezan sa amino grupom [466].

Nasuprot tome, rezultati ove studije nisu u potpunosti u saglasnosti sa elektrohemijskom studijom *Bayraktepe* i saradnici, u kojoj je za ERL predloženo vezivanje u žljeb ili elektrostatička interakcija sa DNK [522]. U toj studiji je korišćen DNK/AuPt/poli-L-metionin biosenzor, a interakcija je praćena preko promena oksidacionih signala guanina i adenina. Razlika u odnosu na rezultate ove studije može se objasniti drugačijom konstrukcijom biosenzora, jer je poli-L-metionin korišćen kao polimerna matrica za vezivanje DNK i metalnih nanočestica, dok AuPt nanočestice doprinose poboljšanju elektrohemijskog odgovora. Moguć razlog za ovu razliku je drugačija konstrukcija biosenzora, jer elektrohemijski odgovor DNK može zavisiti od osobina elektrodne površine, načina imobilizacije DNK i dostupnosti elektroaktivnih baza [521].

Važno je istaći da za redukciono ponašanje ERL u prethodnoj literaturi nije bilo dovoljno podataka, jer su ranija ispitivanja uglavnom bila usmerena na njegovu oksidaciju i analitičko određivanje. Zbog toga, paralelno ispitivanje oksidacionih i redukcionih procesa u ovoj studiji predstavlja prednost, jer omogućava potpuniji uvid u elektrohemijsko ponašanje ERL na GCE. Takav pristup može biti značajan i za dalja mehanistička ispitivanja, jer pruža mogućnost da se prate ne samo primarni oksidacioni i redukcion procesi, već potencijalno i naknadne transformacije njihovih proizvoda, poput redukcije oksidacionih proizvoda ili oksidacije redukcionih proizvoda. Time se dobija šira osnova za razumevanje redoks ponašanja ERL i za tumačenje promena koje nastaju pri njegovoj interakciji sa DNK.

4.3. Rezultati i diskusija dizajna selektivnih PI3K α inhibitora

4.3.1. Homologno modelovanje

Homologno modelovanje PI3K β izoforme je bilo neophodno kako bi se obezbedila trodimenzionalna struktura humane p110 β podjedinice pogodna za dalji molekulski doking i MD simulacije, budući da

odgovarajuća eksperimentalno određena struktura humane PI3K β izoforme nije bila dostupna u PDB bazi. Mogućnost formiranja homolognog modela PI3K β je procenjena poređenjem FASTA aminokiselinskih sekvenci humane i mišje izoforme pomoću BLAST servera. Dobijeno podudaranje sekvenci je iznosilo 96%, što potvrđuje opravdanost korišćenja mišje PI3K β strukture kao šablona za homologno modelovanje humane p110 β podjedinice. BLAST skor za kristalnu strukturu 2Y3A je iznosio 2073 i ona je primenjena kao šablon struktura. Poravnanje humane i mišje PI3K β sekvence prikazano na Slici 4.21.

```

Target MCFSFIMPPAMADILDIWAVDSQIASDGSIPVDFLLPTGIYIQLEVPREATISYIKQMLWKQVHNPYPMFNLLMIDSYMFACVNTAVYEELEDETRRLCDVRPF 105
2y3a.1.A ----- AVDSQIASDG I VDEI LPTGI IQLEV PREA I SYIKQMLWKQVHNPYPMFNLLMIDSYMFACVNTAVYEELEDETRRLCDVRPF 127

Target LPVLKLVTRSCDPGEKLDISKIGVLIGKGLHEFDSLKDPEVNEFRMRKFSEEEKILSLVGLSWMDWLKQTYPEHEPSIPENLEDKLYGGKLVAVHFENCQDV 210
2y3a.1.A LPVLKLVTRSCDPAEK LDKIGVL IGKGLHEFD LKDP EVNEFRMRKFSE EEEKILSLVGLSWMDWLKQTYPEHEPSIPENLEDKLYGGKLVAVHFENCQDV 232

Target SFQVSPNMNPIKVNELAIQKRLTIHGKEDVSPYDYLQVSGRVEYVFGDHPLIQFYIRNCVMNRALPHFILVECCIKKKHYEQEMIAIEAANRNSSNLPLPL 315
2y3a.1.A SFQVSPNLPNPIKVNELAIQKRLTIHGKEDVSPYDYLQVSGRVEYVFGDHPLIQFYIRNCVMNRALPHFILVECCIKKKHYEQEMIAIEAANRNSSNLPLPL 337

Target PPKKTRIIISHVWENNPFQIVLVKGNKLNTEETVKVHVRAGLFHGTTELLCKTIVSSEVSGKNDHIWNEPLEFDINICDLPRMARLCFAVYAVLDKVKTKKSTKI 420
2y3a.1.A PPKKTRIIISHVWENNPFQIVLVKGNKLNTEETVKVHVRAGLFHGTTELLCKTIVSSEVSGKNDHIWNEPLEFDINICDLPRMARLCFAVYAVLDKVKTKKSTKI 442

Target NPSKYQTIKAGKVHYVAVWNTMVFDFKGLRTGDIILHSWSSFPDELEMLNPMGTQVNTNYPYENATALHVKFPENKKQPYPPFDKIEKAAEIASDSSAN 525
2y3a.1.A NPSKYQTIKAGKVHYVAVWNTMVFDFKGLRTGDIILHSWSSFPDELEMLNPMGTQVNTNYPYENATALHVKFPENKKQPYPPFDKIEKAAEIASDSSAN 547

Target VSSRGKKFLPVLKEILDRDPLSQLCENEMDLIWLTRQDCREIFPQSLPKLLSIKWNKLEDVAQLQALLQIWPKLPPREALELDFNYPDQYVREYAVGCLRQM 630
2y3a.1.A VSSRGKKFLPVLKEILDRDPLSQLCENEMDLIWLTRQDCREIFPQSLPKLLSIKWNKLEDVAQLQALLQIWPKLPPREALELDFNYPDQYVREYAVGCLRQM 652

Target SDELSQYLQLVQLVLYEPFLDCALSRFLERAGNRRIGQFLFWHLRSEVHPAVSVQFVILEAYCRGSGVGHMKVLSKQVEALNKLTLNSLIKLNAVKNLR 735
2y3a.1.A SDELSQYLQLVQLVLYEPFLDCALSRFLERAGNRRIGQFLFWHLRSEVHPAVSVQFVILEAYCRGSGVGHMKVLSKQVEALNKLTLNSLIKLNAVKNLR 757

Target AKGKEAMHTCLKQSAAREALSQPLNCPVILSELYVEKCKYMSDKMKPLWLVYNNKVFGEVSVIFKNGDDLQDMLTLQMLRLMDLLWKEAGDLRLMLPYG 840
2y3a.1.A AKGKEAMHTCLKQSAAREALSQPLNCPVILSELYVEKCKYMSDKMKPLWLVYNNKVFGEVSVIFKNGDDLQDMLTLQMLRLMDLLWKEAGDLRLMLPYG 862

Target CLATGDRSGLTIEVVTSEIADIQLNSSNVAATAAFNKDALLNLWKEYNSGDDLDRAIEEFTLSCAGYCVASYVLGIGDRHSDNIMVKKTGQLFHIDFGHILGNF 945
2y3a.1.A CLATGDRSGLTIEVVTSEIADIQLNSSNVAATAAFNKDALLNLWKEYNSGDDLDRAIEEFTLSCAGYCVASYVLGIGDRHSDNIMVKKTGQLFHIDFGHILGNF 967

Target KSKFGIKRERVPFILTYDFIHVQQGKTGNTKFGFRQCCEDAYLILRRHGNLFTLFAUMLTAGLPELTSVKDIQYLDKSLALGKSEEEALKQFKQKFDEALR 1050
2y3a.1.A KSKFGIKRERVPFILTYDFIHVQQGKTGNTKFGFRQCCEDAYLILRRHGNLFTLFAUMLTAGLPELTSVKDIQYLDKSLALGKSEEEALKQFKQKFDEALR 1072

Target ESWTTKVNWMHTVRKDYRS 1070
2y3a.1.A ESWTTKVNWMHTVRKDYRS 1092

```

Slika 4.21. Poravnanje aminokiselinskih sekvenci humanog i mišjeg PI3K β enzima.

Kvalitet generisanih homolognih modela je procenjen na osnovu više parametara. Kao najbolji model je izabran onaj sa *zDOPE* (engl. *Z-score normalized Discrete Optimized Protein Energy*) skorom od -0,46. Procenjena *RMSD* vrednost C α atoma u odnosu na referentnu strukturu je za odabrani model iznosila 1,396, dok je procenjeni udeo C α atoma koji se nakon superpozicije rigidnog tela nalaze unutar 3,5 Å od odgovarajućih atoma u nativnoj strukturi iznosio 0,935. Dodatna validacija homolognog modela je sprovedena nakon MD simulacije kompleksa homolognog modela sa jedinjenjem **B1**.

4.3.2. Simulacije molekulske dinamike i molekulski doking

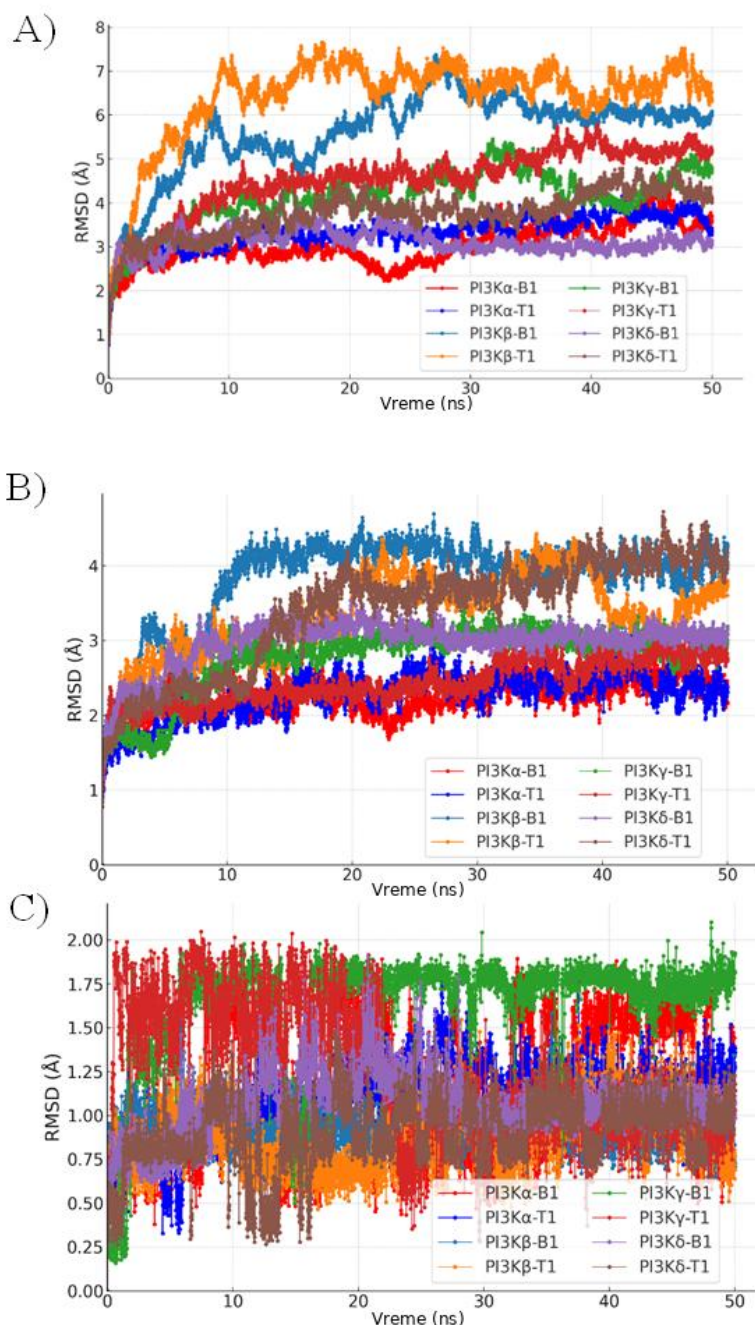
U ovoj studiji je najpre sproveden molekulski doking reprezentativnih liganada iz oba klastera (**B1** i **T1**), nakon čega su pripremljeni kompleksi za osam različitih MD simulacija. Pouzdanost procedure dokinga je procenjena ponovnim dokovanjem kokristalizovanih liganada. Dobijene *RMSD* vrednosti iznosile su 0,518 Å, 1,049 Å, 0,857 Å i 0,258 Å za PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ , redom. S obzirom na to da su sve vrednosti bile ispod granične *RMSD* vrednosti od 2 Å, izvedena procedura molekuskog dokinga je ocenjena kao pouzdana.

Produkcione faze MD simulacija su zatim analizirane praćenjem *RMSD* vrednosti proteinske okosnice p110 subjedinica, *RMSD* vrednosti aminokiselina aktivnog mesta i *RMSD* vrednosti liganada. Grafici *RMSD* vrednosti u zavisnosti od vremena simulacije prikazani su na Slici 4.22.

Odstupanje *RMSD* vrednosti proteinske okosnice je ispitano za svaku simulaciju posebno (Slika 4.22A). Na osnovu dobijenih grafika može se uočiti da su sistemi u proseku dostigli stabilizovano stanje nakon 30 ns vremena faze produkcije. PI3K α , PI3K β i PI3K δ kompleksi su se stabilizovali pre 25 ns, dok *RMSD* vrednosti liganada nisu prelazili vrednost od 2 Å. Nakon 30 ns, kompleks PI3K α -

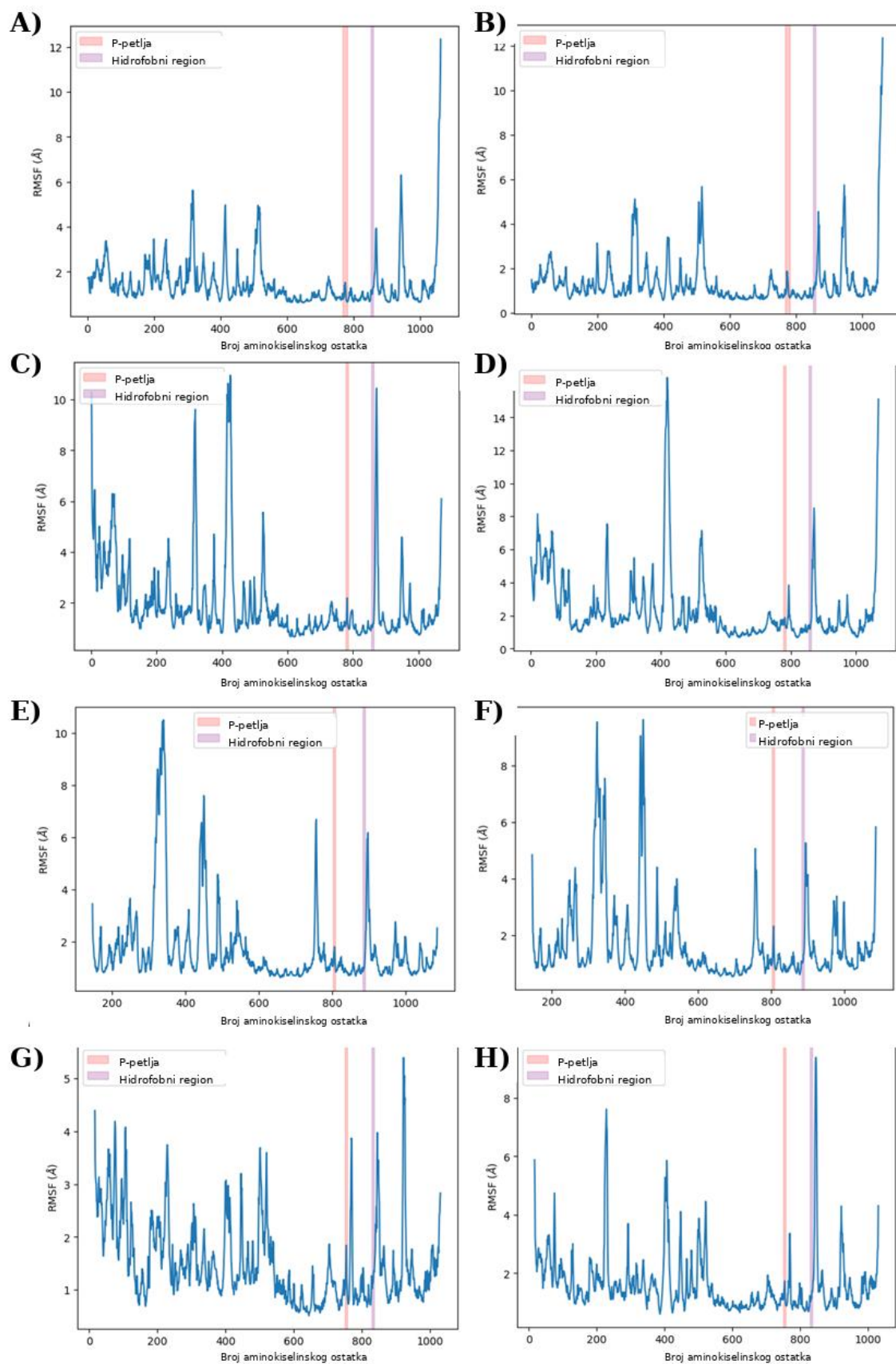
B1 je pokazao prosečnu *RMSD* vrednost proteinske okosnice od 3,498 Å ($\pm 0,301$ Å), dok je za kompleks PI3K α -T1 dobijena nešto viša prosečna vrednost od 3,642 Å ($\pm 0,187$ Å). Kod PI3K β izoforme, prosečna *RMSD* vrednost proteinske okosnice iznosila je 6,105 Å ($\pm 0,212$ Å) za kompleks PI3K β -B1 i 6,693 Å ($\pm 0,292$ Å) za kompleks PI3K β -T1. Za γ izoformu, kompleks PI3K γ -B1 je imao prosečnu *RMSD* vrednost od 4,528 Å ($\pm 0,388$ Å), dok je za kompleks PI3K γ -T1 dobijena vrednost od 5,124 Å ($\pm 0,241$ Å). Najniže prosečne *RMSD* vrednosti proteinske okosnice uočene su kod PI3K δ -B1 kompleksa, 3,033 Å ($\pm 0,115$ Å), dok je kompleks PI3K δ -T1 pokazao vrednost od 4,103 Å ($\pm 0,324$ Å). Analiza *RMSD* vrednosti ostataka aktivnog mesta pokazala je sličan trend kao analiza proteinske okosnice, što dodatno podržava stabilnost formiranih kompleksa (Slika 4.22B).

RMSD vrednosti liganada analizirane su na osnovu grafika prikazanih na Slici 4.22C. Kompleks PI3K α -B1 je dostigao vrednost od 1,288 Å ($\pm 0,377$ Å), dok je kompleks PI3K α -T1 pokazao nešto stabilnije ponašanje, sa *RMSD* vrednošću od 1,182 Å ($\pm 0,118$ Å). Za PI3K β -B1 i PI3K β -T1 komplekse dobijene su slične vrednosti *RMSD* liganada, 0,932 Å ($\pm 0,113$ Å) i 0,942 Å ($\pm 0,292$ Å), redom. U slučaju PI3K γ izoforme, kompleks PI3K γ -B1 je pokazao višu *RMSD* vrednost liganada, 1,632 Å ($\pm 0,327$ Å), dok je kompleks PI3K γ -T1 bio stabilniji, sa vrednošću od 0,999 Å ($\pm 0,140$ Å). Na kraju, *RMSD* vrednost liganada u kompleksu PI3K δ -B1 iznosila je 1,034 Å ($\pm 0,065$ Å), dok je za kompleks PI3K δ -T1 dobijena slična vrednost od 0,974 Å ($\pm 0,134$ Å).



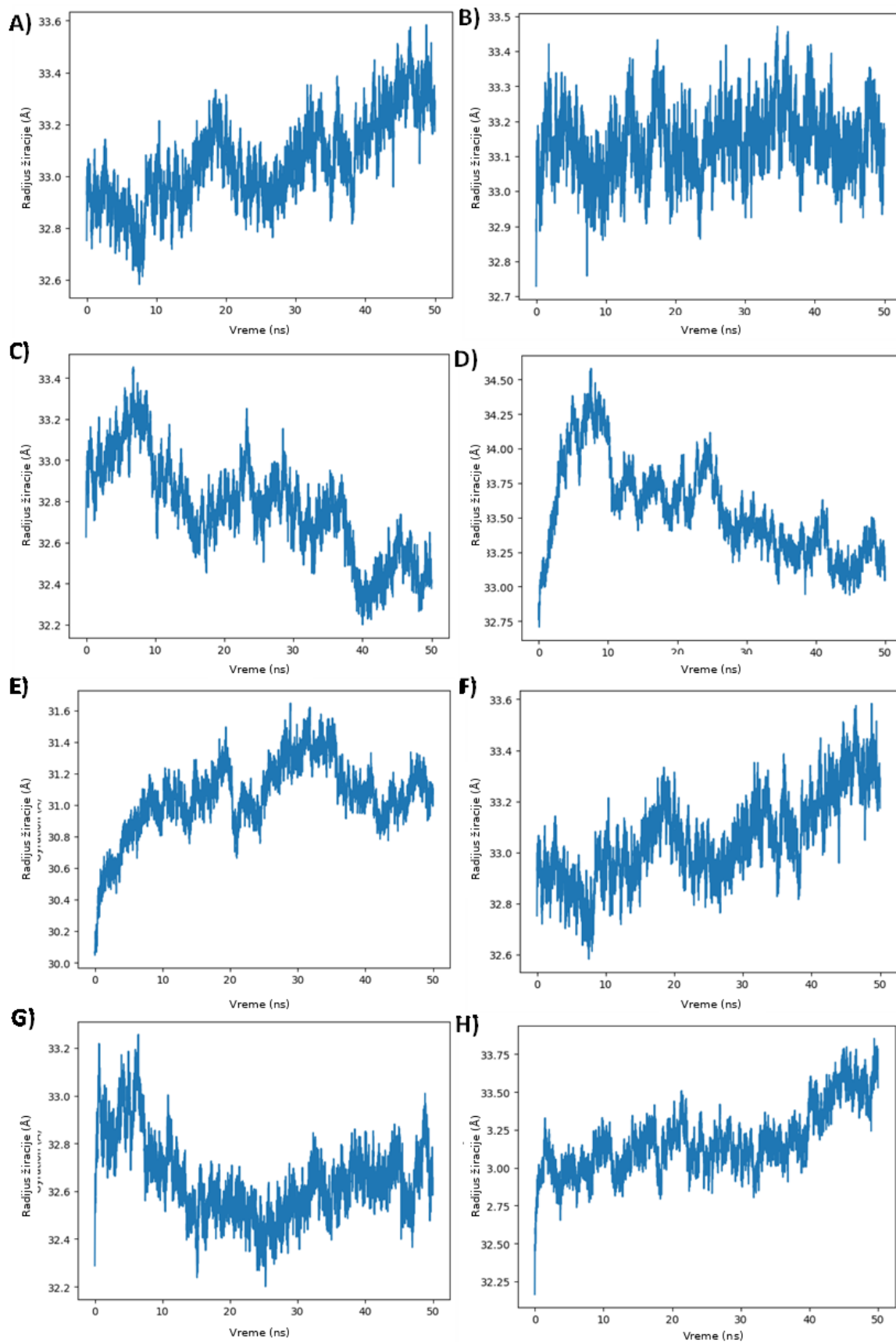
Slika 4.22. Grafici *RMSD* vrednosti u funkciji vremena za: A) proteinsku okosnicu, B) aminokiselinske ostatke aktivnog mesta i C) ligande u MD simulacijama.

RMSF vrednosti su izračunate za proteinsku okosnicu svih kompleksa, radi identifikacije regiona koji najviše doprinose lokalnim fluktuacijama i ukupnim promenama u strukturi proteina (Slika 4.23). Dobijeni obrasci ukazuju da su aminokiseline koje čine petlje povezane sa većim fluktuacijama u poređenju sa uređenijim strukturnim segmentima, kao što su α -heliksi i β -ploče. Nasuprot tome, region aktivnog mesta, uključujući i hidrofobni region, pokazao je manje fluktuacije, što ukazuje na stabilnije interakcije unutar aktivnog mesta. Stabilne *RMSF* fluktuacije aminokiselina P-petlje ukazuju da P-petlja održava džep specifičnosti zatvorenim u svim izoformama, čime se ograničava potentnije vezivanje inhibitora za PI3K β , PI3K γ i PI3K δ .



Slika 4.23. Grafici *RMSF* vrednosti za simulacione komplekse: A) PI3K α -B1, B) PI3K α -T1, C) PI3K β -B1, D) PI3K β -T1, E) PI3K γ -B1, F) PI3K γ -T1, G) PI3K δ -B1 i H) PI3K δ -T1.

r_{Gyr} vrednosti su izračunate radi procene promena kompaktnosti proteina i njegovog savijanja tokom simulacije. Ponašanje savijanja proteina u svim sistemima je prikazano na Slici 4.24. Na osnovu dobijenih podataka može se zaključiti da su svi analizirani kompleksi dostigli kompaktno stanje.



Slika 4.24. Grafici vrednosti poluprečnika žiracije za simulacione komplekse: A) PI3K α -B1, B) PI3K α -T1, C) PI3K β -B1, D) PI3K β -T1, E) PI3K γ -B1, F) PI3K γ -T1, G) PI3K δ -B1 i H) PI3K δ -T1.

MD trajektorije dobijene u ovom radu su korišćene za procenu lokalne stabilnosti i ključnih međumolekulskih interakcija u ATP-vezujućem džepu PI3K α . Analize *RMSD*, *RMSF* i *rGyr* vrednosti ukazale su na postizanje ravnoteže u ispitivanom vremenskom intervalu, što pokazuje da je uzorkovani konformacioni prostor bio odgovarajući za ciljeve ove studije.

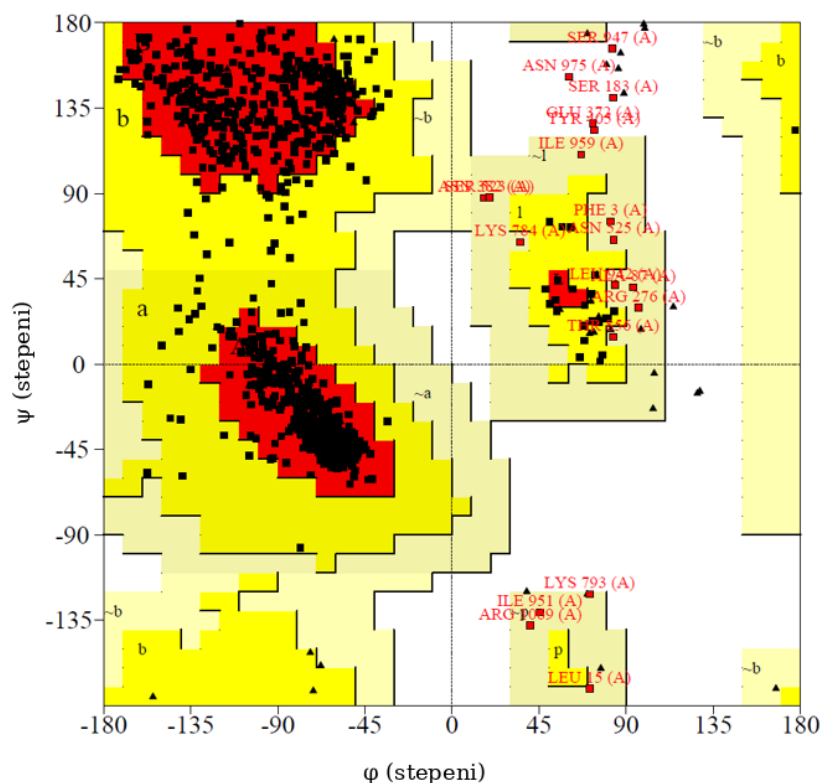
Na osnovu ovih rezultata, za dalju analizu je korišćen prag od 30 ns. Konformacije izoformi iz poslednjih 20 ns produkcionog vremena su klasterovane radi generisanja proteinskih poza za molekularni doking celog seta podataka. Reprezentativni snimci centroida klastera, uzorkovani na svakih 10 ps, zajedno sa brojem snimaka najbrojnijih klastera, prikazani su u Tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Reprezentativni snimci centroida klastera sa brojem snimaka najbrojnijih klastera dobijenih iz simulacionih kompleksa PI3K α -B1, PI3K α -T1, PI3K β -B1, PI3K β -T1, PI3K γ -B1, PI3K γ -T1, PI3K δ -B1 i PI3K δ -T1.

Izoforma	Bzo klaster				Thz klaster			
	Klaster konformacija	Ime centroida	MD snimak centroida	Broj članova klastera	Klaster konformacija	Ime centroida	MD snimak centroida	Broj članova klastera
PI3K α	1	α Bzo1	3318	52	1	α Thz1	3996	50
	2	α Bzo2	3072	51	2	α Thz2	3445	47
	3	α Bzo3	4347	49	3	α Thz3	4357	44
	4	α Bzo4	3357	46	4	α Thz4	3182	44
	5	α Bzo5	4278	45	5	α Thz5	4246	43
PI3K β	1	β Bzo1	4233	66	1	β Thz1	4357	93
	2	β Bzo2	4961	60	2	β Thz2	4487	58
	3	β Bzo3	3857	53	3	β Thz3	3824	54
	4	β Bzo4	4141	48	4	β Thz4	3195	52
	5	β Bzo5	3398	44	5	β Thz5	4958	49
PI3K γ	1	γ Bzo1	3424	106	1	γ Thz1	4608	189
	2	γ Bzo2	4097	75	2	γ Thz2	3182	62
	3	γ Bzo3	3555	69	3	γ Thz3	4168	61
	4	γ Bzo4	4637	65	4	γ Thz4	4351	45
	5	γ Bzo5	3818	60	5	γ Thz5	3159	44
PI3K δ	1	δ Bzo1	3175	151	1	δ Thz1	4747	103
	2	δ Bzo2	4143	72	2	δ Thz2	3187	88
	3	δ Bzo3	4702	69	3	δ Thz3	3869	75
	4	δ Bzo4	4573	59	4	δ Thz4	4082	65
	5	δ Bzo5	3274	52	5	δ Thz5	4887	52

Sve četiri izoforme pokazale su konzerviran način vezivanja, ali su se razlikovale u pojedinim interakcijama u zglobnom regionu i P-petlji. Kod PI3K α , stabilizacijom je dominiralo formiranje vodonične veze sa α Val851 preko kiseonika benzoksazepina ili azota uree, uz dodatni doprinos interakcija sa α Ser854. Amidna grupa je često učestvovala i u interakcijama sa α Gln859, a najizraženije u centroidu α Bzo2, gde je formirana vodonična veza. Ovaj centroid je pokazao najbogatiji profil interakcija među PI3K α -B1 konformacionim klasterima, zahvaljujući snažnom hidrofobnom usidrenju i dodatnim polarnim kontaktima sa α Asp810 i α Asp933. U konformacionim klasterima PI3K α -T1, centroid α Thz5 je predstavljao najstabilizovaniju konformaciju, jer je kombinovao vodonično vezivanje sa α Val851 u zglobnom regionu i brojne hidrofobne interakcije u zglobnom regionu i afinitetnom džepu. Kod ostalih izoformi, izabrani centroidi PI3K β , PI3K γ i PI3K δ pokazali su manje stabilne interakcije u zglobnom regionu i P-petlji u poređenju sa PI3K α .

Za dalju validaciju homolognog modela je korišćena centroidna konformacija najvećeg klastera homolognog modela PI3K β u kompleksu sa jedinjenjem **B1**, označena kao β Bzo1. *Ramachandran*-ov grafik dobijen pomoću programa PROCHECK prikazan je na Slici 4.25, dok su njegovi sumarni rezultati dati u Tabeli 4.11. Analiza 118 struktura rezolucije najmanje 2,0 Å i R-faktora ne većeg od 20% pokazuje da bi se više od 90% ostataka trebalo nalaziti u najpovoljnijim regionima kako bi se model smatrao kvalitetnim.



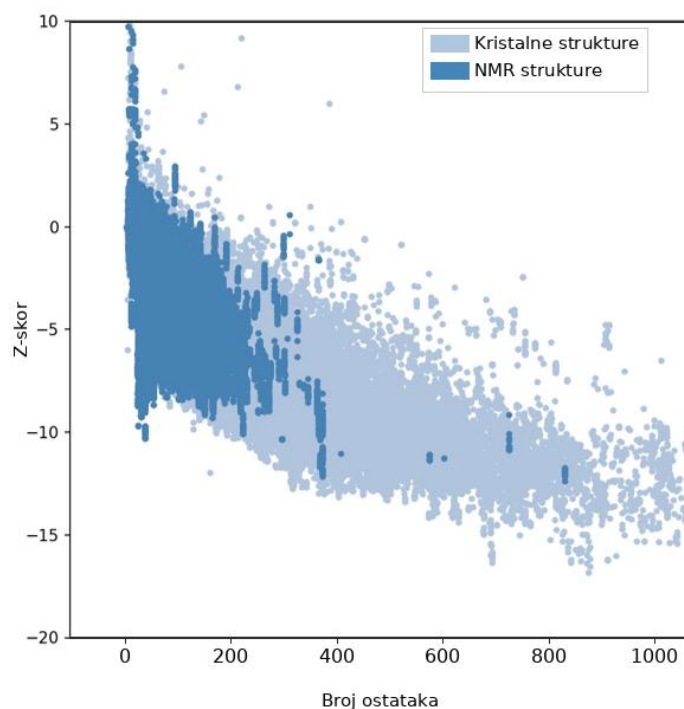
Slika 4.25. *Ramachandran*-ov grafik reprezentativnog homologog modela PI3K β u kompleksu sa jedinjenjem **B1**.

Tabela 4.11. Sumarni podaci *Ramachandran*-ovog grafika reprezentativnog homologog modela PI3K β u kompleksu sa jedinjenjem **B1**.

	Broj ostataka	Procenat
Najpovoljniji regioni [A, B, L]	872	90,2%
Dodatno dozvoljeni regioni [a, b, l, p]	76	7,9%
Šire dozvoljeni regioni [~a, ~b, ~l, ~p]	14	1,4%
Nedozvoljeni regioni [XX]	5	0,5%
Ostaci koji nisu glicin ni prolin	967	100,0%
Krajnji ostaci, izuzimajući <i>Gly</i> i <i>Pro</i>	3	
Ostaci glicina	50	
Ostaci prolina	51	
Ukupan broj ostataka	1071	

Ukupni Z-skor kvaliteta modela, procenjen pomoću ProSA-web servera, iznosio je $-13,68$, a njegov relativni položaj u poređenju sa eksperimentalnim strukturama prikazan je na Slici 4.26. Na osnovu Z-skor vrednosti može se videti da se dobijeni model nalazi u opsegu ispitivanih rendgenskih struktura. Program ERRAT je pokazao ukupni kvalitet modela od 92,308, pri čemu za ostatke

aktivnog mesta, u opsegu 770–942, nije uočena izračunata vrednost greške ispod granice odbacivanja od 95%.



Slika 4.26. Z-skorovi eksperimentalnih proteinskih struktura zasnovani na broju aminokiselina, dobijeni pomoću ProSA-web servera, i položaj reprezentativnog homologog modela PI3K β u kompleksu sa jedinjenjem **B1**.

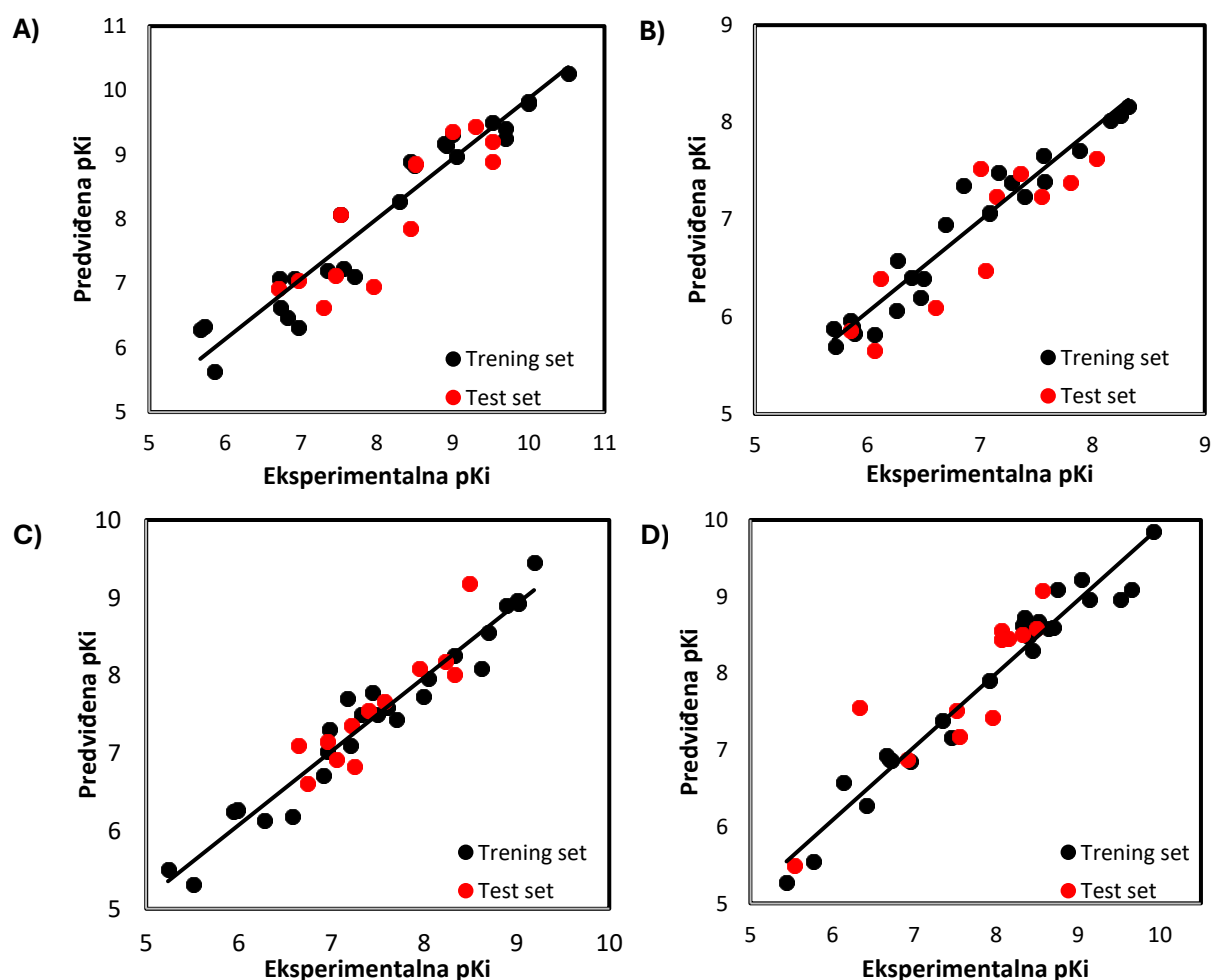
Procedura ansambl dokinga je dodatno validirana ponovnim dokovanjem referentnih liganada u centroide klastera dobijene iz molekulske dinamike. Sve *RMSD* vrednosti bile su ispod granične vrednosti i prikazane su u Tabeli 4.12.

Tabela 4.12. *RMSD* vrednosti ponovo dokovanih referentnih liganada u ansambl dokingu.

Izoforma	<i>RMSD</i> (Å)	
	Bzo klaster	Thz klaster
PI3K α	0,997	1.019
PI3K β	1,671	1.254
PI3K γ	1.549	1.104
PI3K δ	0.859	0.878

4.3.3. Validacija 3D-QSAR studije i definisani domeni primenljivosti

Predviđene bioaktivne konformacije jedinjenja iz skupa podataka, dobijene molekulskim dokingom u više reprezentativnih konformacija izoformi PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ , korišćene su za izračunavanje GRIND-2 deskriptora. Na osnovu ovih deskriptora izgrađena su četiri PLS modela, po jedan za svaku izoformu. Grafici eksperimentalnih aktivnosti u odnosu na predviđene su prikazani na Slici 4.27.



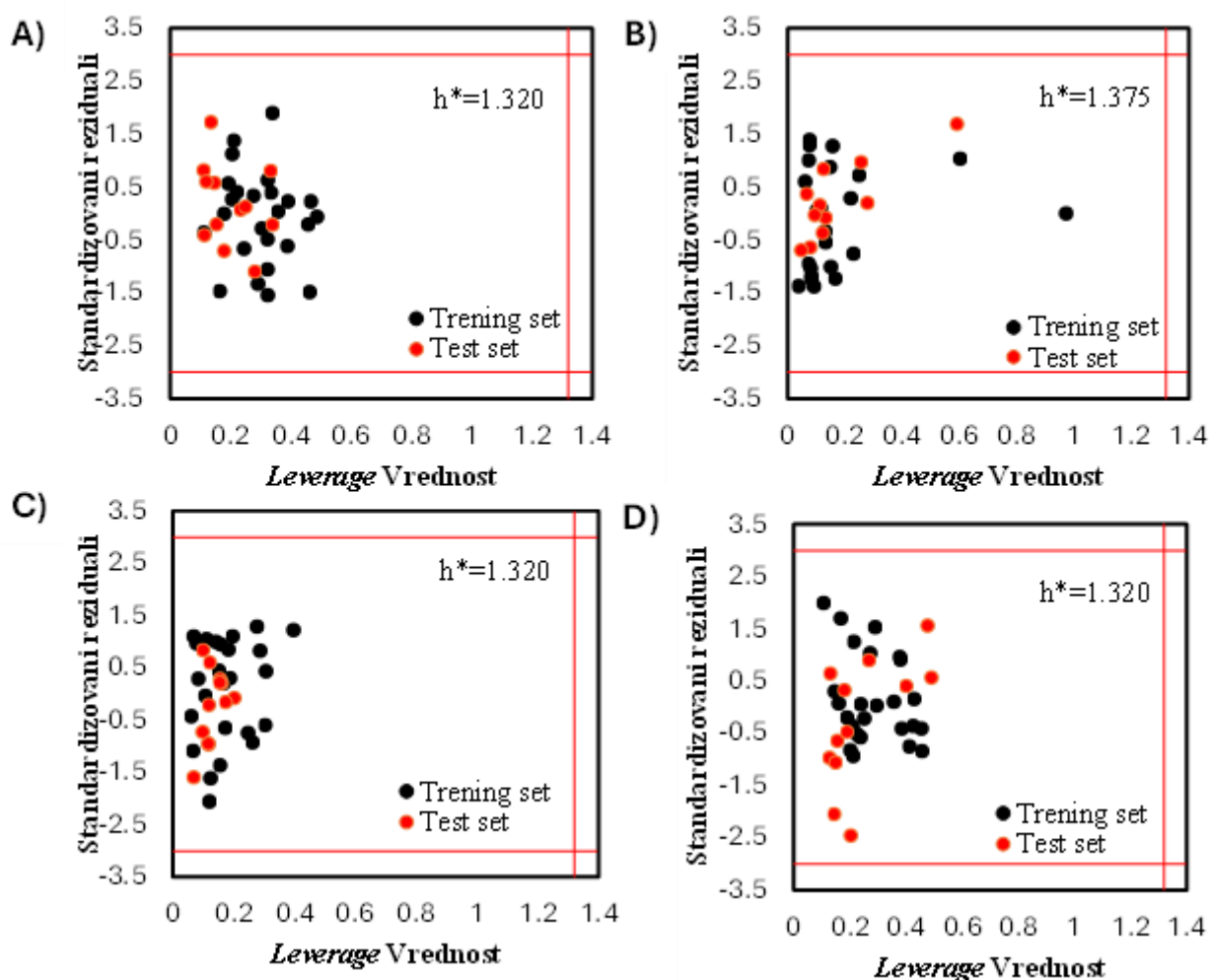
Slika 4.27. Grafik odnosa eksperimentalnih i predviđenih pKi vrednosti za 3D-QSAR modele: A) PI3K α , B) PI3K β , C) PI3K γ i D) PI3K δ .

Pouzdanost formiranih modela je proverena opsežnom statističkom validacijom. Parametri interne i eksterne validacije, uključujući i r-metrike, prikazani su u Tabeli 4.13.

Tabela 4.13. Validacija 3D-QSAR modela za izoforme PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ .

	R^2	Q^2	RMSEE	R^2_{pred}	RMSEP	r^2_m	$r^2_{m'}$	Δr^2_m	$(r^2_m + r^2_{m'})/2$	$(r^2_m - r^2_{m'})/r^2_m$	k'	CCC
PI3K α	0.93	0.82	0.38	0.73	0.50	0.63	0.76	0.13	0.70	0.00	0.98	0.88
PI3K β	0.94	0.82	0.21	0.71	0.38	0.65	0.69	0.04	0.67	0.01	0.98	0.86
PI3K γ	0.95	0.77	0.26	0.75	0.30	0.63	0.80	0.17	0.70	0.00	1.01	0.89
PI3K δ	0.96	0.88	0.27	0.71	0.48	0.66	0.74	0.08	0.70	0.01	1.02	0.87
Limit	>0.7	>0.5		>0.5		>0.5	>0.5	<0.2	>0.5	<0.1	$0.85 < k' < 1.15$	>0.85

Domen primenljivosti modela PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ je određen primenom *leverage* pristupa, uz korišćenje deset promenljivih sa najvišim PLS koeficijentima. Granična *leverage* vrednost, izračunata pomoću jednačine 41 iz podpoglavlja 1.7.4, iznosila je $h^* = 1,320$ za modele PI3K α , PI3K γ i PI3K δ , dok je za PI3K β model iznosila $h^* = 1,375$. *Williams*-ovi grafici, prikazani na Slici 4.28, pokazuju da se jedinjenja iz trening i test setova svih modela nalaze unutar definisanih domena primenljivosti.



Slika 4.28. Williams-ovi grafici, sa definisanim domenima primenljivosti, za 3D-QSAR modele PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ .

4.3.4. Analiza rezultata 3D-QSAR i molekuskog dokinga

GRIND deskriptori se izračunavaju na osnovu energija interakcije između molekula i molekulskih interakcionih polja, odnosno MIF-ova. Radi razumevanja njihovog uticaja na inhibitornu aktivnost prema pojedinačnim PI3K izoformama, odabrani GRIND deskriptori koji doprinose QSAR modelima su interpretirani i vizuelizovani. Ovi deskriptori daju numeričke vrednosti koje opisuju proizvode odgovarajućih interakcionih polja i rastojanja između najvažnijih parova čvorova, pri čemu ti parovi mogu imati pozitivan ili negativan doprinos inhibitornoj aktivnosti.

Izbor promenljivih za interpretaciju je izvršen na osnovu njihovih PLS koeficijenata. Za svaki model su prikazani grafici PLS koeficijenata, na kojima su posebno označene najvažnije promenljive. Sve promenljive dobijene iz pojedinačnih modela grafički su predstavljene u obliku korelograma, u kojima su proizvodi energija interakcije prikazani u funkciji rastojanja između odgovarajućih čvorova.

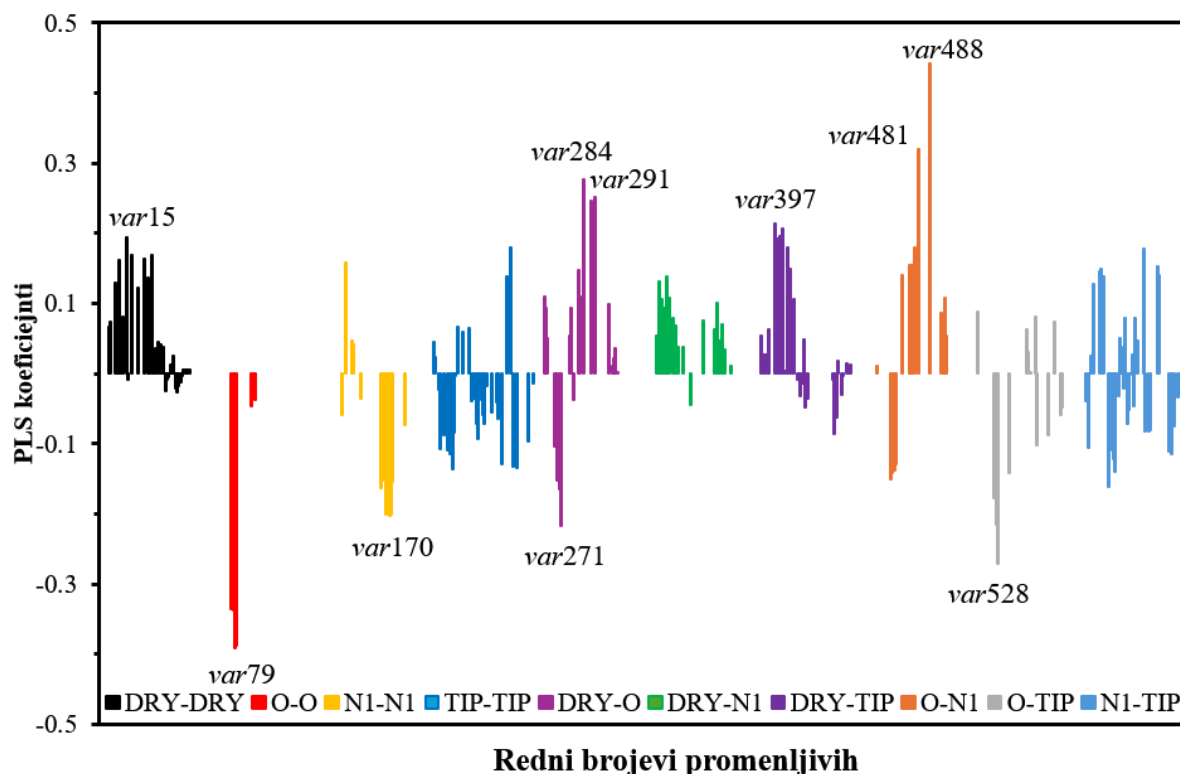
Na osnovu vrednosti energija interakcije dobijena su četiri autokorelograma, DRY–DRY, O–O, N1–N1 i TIP–TIP, koji se odnose na iste tipove MIF-ova, kao i šest ukrštenih korelograma, DRY–O, DRY–N1, DRY–TIP, O–N1, O–TIP i N1–TIP, koji opisuju odnose između različitih MIF-ova.

Razvijeni 3D-QSAR modeli su analizirani radi identifikacije ključnih strukturnih karakteristika koje utiču na inhibitornu aktivnost prema svakoj PI3K izoformi, odnosno PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ .

Posebna pažnja je usmerena na PI3K α model, budući da je osnovni cilj studije bio definisanje strukturnih karakteristika važnih za selektivnu inhibiciju ove izoforme.

4.3.4.1. PI3K α 3D-QSAR model

PI3K α model je obuhvatao 205 promenljivih, pri čemu je dimenzionalnost modela bila definisana pomoću dve latentne promenljive. Najvažnije promenljive ovog modela su prikazane na Slici 4.29 i u Tabeli 4.14.



Slika 4.29. Grafik PLS koeficijenata sa označenim najvažnijim promenljivim za PI3K α 3D-QSAR model.

Tabela 4.14. Sažetak najvažnijih varijabli PI3K α 3D-QSAR modela.

Promenljiva	PLS koeficijent	Rastojanje (Å)	Par MIF čvorova	Opis
var519	0,183	14,4–14,8	O–N1	Promenljiva sa najvećim PLS koeficijentom. Prisutna je kod pojedinih jedinjenja iz oba klastera i predstavlja rastojanje između donora vodonične veze (HBD) i akceptora vodonične veze (HBA) na suprotnim stranama molekula.
var350	0,161	2,0–2,4	DRY–N1	Prisutna je prvenstveno kod derivata Bzo klastera i opisuje rastojanje između hidrofobnog dela i prostorno bliskog akceptora vodonične veze (HBA).
var508	0,158	10,0–10,4	O–N1	Optimalno rastojanje između donora vodonične veze (HBD) i akceptora vodonične veze (HBA), izraženo kod većine jedinjenja Bzo klastera i nekoliko derivata Thz klastera.
var146	0,169	3,2–3,6	N1–N1	Rastojanje između dva akceptora vodonične veze (HBA), koje nije prisutno kod nekih manje aktivnih jedinjenja iz klastera.
var375	0,121	12,4–12,8	DRY–N1	Slična promenljivoj var350, ali je prisutna kod svih jedinjenja.

Promenljiva	PLS koeficijent	Rastojanje (Å)	Par MIF čvorova	Opis
<i>var11</i>	0,140	4,4–4,8	DRY–DRY	Rastojanje između dva hidrofobna dela, prisutno kod svih jedinjenja.
<i>var228</i>	0,115	8,4–8,8	TIP–TIP	Rastojanje između dva sterna regiona, prisutno kod svih jedinjenja.
<i>var282</i>	–0,123	2,4–2,8	DRY–O	Odsutna je kod aktivnijih jedinjenja i opisuje rastojanje između hidrofobnog regiona i prostorno bliskog donora vodonične veze (HBD).
<i>var291</i>	–0,130	6,0–6,4	DRY–O	Slična promenljivoj <i>var282</i> , ali je prisutna kod gotovo svih jedinjenja.
<i>var566</i>	–0,183	5,6–6,0	O–TIP	Opisuje negativan uticaj rastojanja između donora vodonične veze (HBD) i sternog centra u neposrednoj blizini. Ova promenljiva ima najveći negativan uticaj.

Gotovo sve promenljive u DRY–DRY korelogramu imaju pozitivan uticaj na inhibitornu aktivnost prema PI3K α . Promenljiva sa najvišim PLS koeficijentom je *var15* (6,0–6,4 Å), formirana između MIF-ova koji nastaju sa obe strane hidrofobnog dela molekula. Kod jedinjenja Bzo klastera, *var15* se formira oko 1,2,4-triazolskog prstena. Kod jedinjenja Thz klastera ova promenljiva se formira oko benzenovog prstena povezanog sa tiazolnim prstenom. Sva jedinjenja imaju izraženu *var15* promenljivu, pri čemu jedinjenja Bzo klastera imaju višu vrednost, iznad 0,6.

Promenljiva *var79* (6,0–6,4 Å), iz O–O korelograma, ima najveći negativni uticaj na aktivnost i opisuje rastojanja između MIF-ova koji interaguju sa dva donora vodonične veze. Prisutna je samo kod manje aktivnih tiazolnih derivata i formira se između vodonika uree i vodonika amidne grupe.

Promenljiva *var170* (16,8–17,2 Å) iz N1–N1 grupe formira se između dva MIF-a koji interaguju sa dva akceptora vodonične veze. Formira se kod pojedinih jedinjenja iz oba klastera. Benzoksazepinski derivati ispoljavaju ovu promenljivu između azota triazola i kiseonika amidne grupe, dok je tiazolni derivati pokazuju između kiseonika sulfona ili kiseonika imidazolskog prstena i kiseonika amidne grupe. Na primer, jedinjenja **B1** i **B19**, najaktivnije i najmanje aktivno jedinjenje Bzo klastera, kao i **T1** i **T18**, najaktivnije i najmanje aktivno jedinjenje Thz klastera, nemaju ovu promenljivu (Slika 4.30).

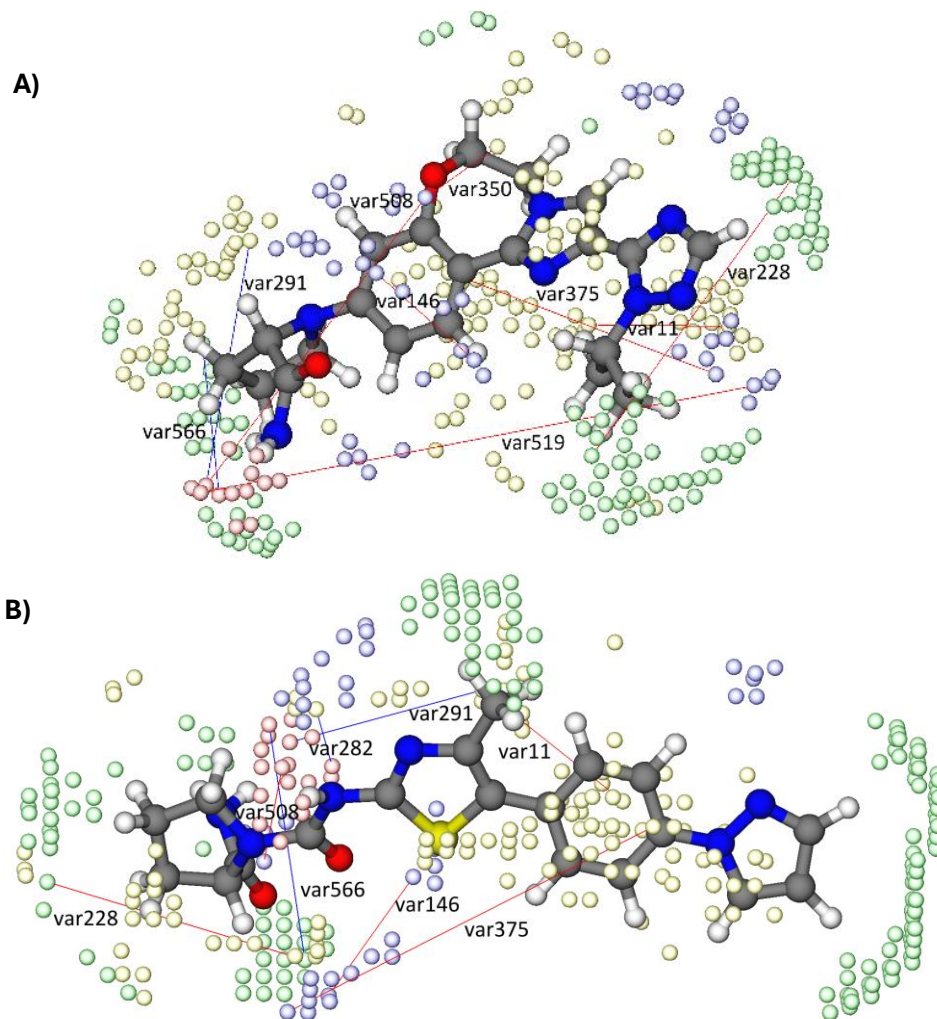
U DRY–O korelogramu se izdvajaju tri važne promenljive: *var271* (6,0–6,4 Å), *var284* (11,2–11,6 Å) i *var291* (14,0–14,4 Å). One opisuju rastojanje između različitih hidrofobnih struktura i vodonika amidne grupe, koji predstavlja donora vodonične veze. Kod jedinjenja Bzo klastera, *var271* opisuje nepovoljno rastojanje ovog vodonika od susednog hidrofobnog dela u R₁ supstituentu. Nasuprot tome, *var284* i *var291* ukazuju na pozitivan doprinos rastojanja između istog vodonika i drugih hidrofobnih delova molekula, odnosno kondenzovanog imidazolskog prstena i 1,2,4-triazola. Kod jedinjenja Thz klastera, *var271* povezuje amidni ili ureidni vodonik sa tiazolnim prstenom, dok *var284* i *var291* povezuju isti vodonik sa benzenovim prstenom.

DRY–TIP korelogram je sadržao promenljivu *var397*, u opsegu 5,2–5,6 Å, koja je imala pozitivan koeficijent. Ova promenljiva ukazuje da prisustvo sternog dela u blizini hidrofobnog dela molekula povoljno utiče na inhibitornu aktivnost prema PI3K α . Kod benzoksazepinskih derivata, opisani MIF-ovi su povezani sa 1,2,4-triazolskim prstenom i vodonikom ili metil grupom na položaju 3 tog prstena. Kod tiazolnih derivata promenljiva je izražena između tiazolnog prstena i susednog metil-supstituenta, uz nekoliko izuzetaka, pri čemu ova grupa jedinjenja generalno pokazuje niže vrednosti *var397*.

Promenljive *var481* (13,2–13,6 Å) i *var488* (16,0–16,4 Å) iz O–N1 korelograma imale su pozitivan uticaj na inhibitornu aktivnost. Obe promenljive opisuju odnos između donora i akceptora vodonične

veze. *var488* je imala najizraženiji pozitivan uticaj na aktivnost i bila je prisutna samo kod jedinjenja Bzo klastera. Ove promenljive odražavaju prisustvo vodonika amidne grupe i azota 1,2,4-triazola, dok *var481* povezuje vodonik amidne ili ureidne grupe sa azotom pirazolskog prstena ili kiseonikom sulfonske grupe.

O-TIP korelogram je sadržao promenljivu *var528*, u opsegu 6,4–6,8 Å, koja je pokazala značajan negativan uticaj na inhibitornu aktivnost. Ova promenljiva se formira u oba klastera između vodonika amidne grupe, kao donor vodonične veze, i sternog centra u njegovoj neposrednoj blizini. Kod jedinjenja **T18** ova promenljiva nije bila izražena.



Slika 4.30. Najvažnije pozitivne (crveno) i negativne (plavo) promenljive iz PI3K α 3D-QSAR modela za jedinjenja A) **B1** i B) **T1**; plave sfere predstavljaju N1 probe (donor vodonične veze), crvene sfere O probe (akceptor vodonične veze), žute sfere DRY probe (hidrofobni centri), a zelene sfere TIP probe (sterna žarišta).

4.3.4.2. Studija molekuskog dokinga PI3K α izoforme

Dobijene poze iz izvedene procedure dokinga analizirane su kako bi se dodatno ispitale moguće interakcije između inhibitora PI3K α i enzima. Sva jedinjenja Bzo klastera, osim **B9**, formiraju vodoničnu vezu sa α Val851, aminokiselinom zglobnog regiona za koju je poznato da se za nju vezuje većina ATP-kompetitivnih PI3K inhibitora. Kiseonik oksazepina predstavlja akceptora vodonične veze u ovoj interakciji. Ostale interakcije koje formira benzoksazepinski prsten su hidrofobne interakcije sa α Glu849, α Tyr836, α Met922, α Ile932 i α Val850 iz zglobnog regiona.

Benzenov prsten i supstituent pružaju se ka hidrofobnom regionu, gradeći različite interakcije u zavisnosti od supstituenta. Pojedina jedinjenja sa amidnom grupom formiraju vodonične veze sa α Arg852, α Ser854 i α Gln859. Imidazol i susedni 1,2,4-triazolni prsten vezuju se u afinitetni džep preko hidrofobnih kontakata sa ostacima α Leu932 i α Leu848. Izopropil grupa, prisutna kod gotovo svih derivata ovog klastera, pruža se dalje u džep i vezuje se sa aminokiselinama kao što su α Leu800 i α Tyr836, kao i sa ostacima P-petlje α Met772 i α Pro778.

Najaktivnije jedinjenje, **B1**, koje sadrži primarnu amidnu grupu, formira vodonične veze sa α Gln859, nekonzerviranom aminokiselinom. Još jedna vodonična veza formira se sa α Ser854. Interakcija sa serinom konzervirana je u okviru Bzo klastera. Kraći bočni lanci koji sadrže amidnu grupu teže formiranju vodoničnih veza sa α Arg852 ili α Asn853.

Jedinjenja Thz klastera formiraju dve vodonične veze sa α Val851 preko azota tiazolnog prstena, koji predstavlja akceptora vodonične veze, i susednog azota iz ureidne ili amidne grupe, koji predstavlja donora vodonične veze. Sulfonamidni derivati takođe formiraju vodoničnu vezu sa α Lys802. Benzenov prsten formira različite hidrofobne kontakte sa aminokiselinama u afinitetnom džepu, kao što su α Tyr836 i α Leu932, dok se susedni deo molekula, imidazol, sulfonamid itd., dalje pruža i interaguje sa afinitetnim džepom i ostacima P-petlje, ciljajući između ostalih α Leu848, α Glu849, α Trp780, α Asp933 i α Phe930. Neka jedinjenja, poput **T1**, koja sadrže (S)-pirolidin-karboksamidni deo, takođe formiraju vodoničnu vezu sa α Ser854 i hidrofobne interakcije sa α His855 i α Gln859 iz hidrofobnog regiona.

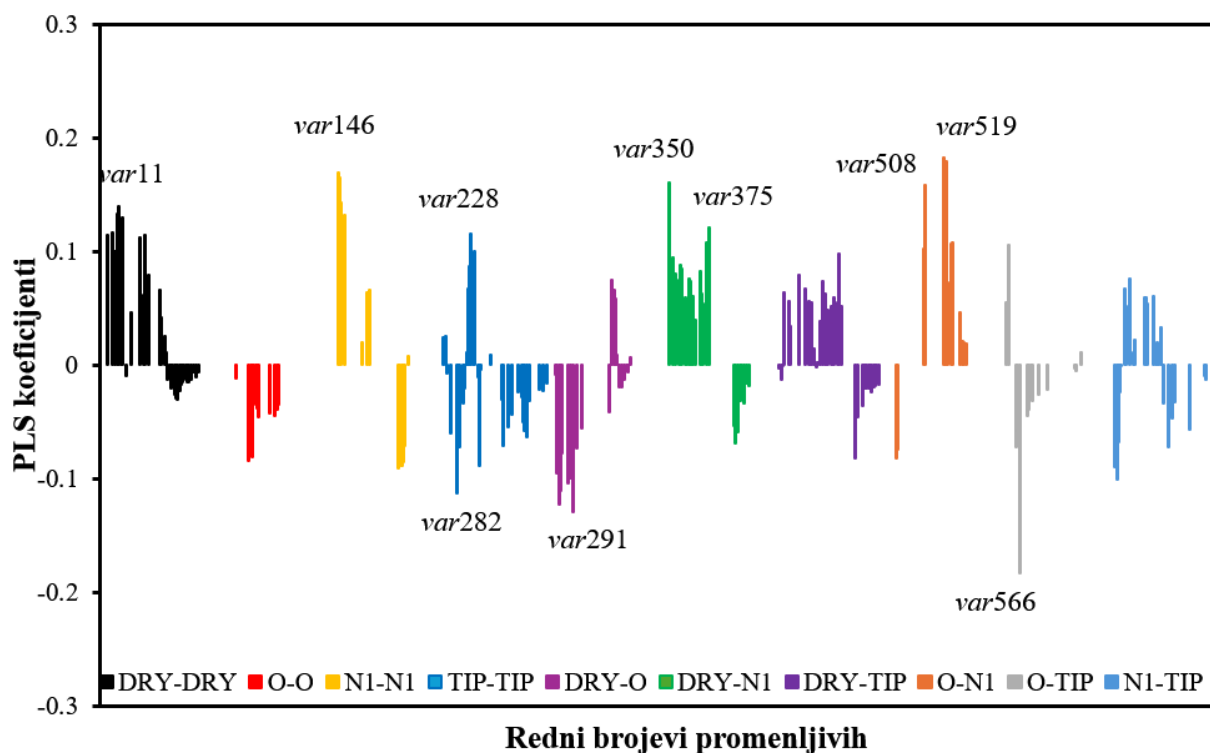
4.3.4.3. Uporedna analiza rezultata PI3K α izoforme

Povezivanjem rezultata dobijenih u doking studijama sa 3D-QSAR modelom može se uočiti da su ključne promenljive PI3K α modela, posebno *var15* (DRY–DRY), *var481* (O–N1) i *var488* (O–N1), ukazuju na značaj hidrofobnih kontakata i interakcija vodoničnim vezama za inhibitornu aktivnost. Rastojanje obuhvaćeno promenljivom *var15*, od 6,0–6,4 Å, odgovara prostornom razdvajanju koje je uočeno između α Tyr836 i α Leu932 u afinitetnom džepu. Sa druge strane, *var481* i *var488*, koje odgovaraju rastojanjima 13,2–13,6 Å i 16,0–16,4 Å, povezuju regione afinitetnog džepa, odnosno α Tyr836/ α Leu932, sa ostacima zglobnog regiona α Ser854 i α Gln859.

Dodatno, promenljiva *var284* iz DRY–O korelograma, u opsegu 11,2–11,6 Å, podržava značaj opisanih vodoničnih veza, ali istovremeno naglašava i značaj hidrofobnih osobina samog fragmenta koji se vezuje za zglobni region. Ova promenljiva odgovara rastojanju između donora vodonične veze, α Gln859, i hidrofobnog kontakta sa α Val850. Prema tome, efikasni PI3K α inhibitori trebalo bi da poseduju izražene hidrofobne karakteristike u fragmentu koji se vezuje za zglobni region i fragmentu koji se vezuje u afinitetni džep, kao i akceptore vodonične veze sposobne za interakcije prvenstveno sa α Val851, α Ser854 i α Gln859.

4.3.4.4. PI3K β 3D-QSAR model

PI3K β model je obuhvatao 231 promenljivu, dok je dimenzionalnost modela bila definisana pomoću dve latentne promenljive. Najvažnije promenljive ovog modela prikazane su na Slici 4.31 i u Tabeli 4.15.



Slika 4.31. Grafik PLS koeficijenata sa označenim najvažnijim promenljivim za PI3K β 3D-QSAR model.

Tabela 4.15. Sažetak najvažnijih varijabli PI3K β 3D-QSAR modela.

Promenljiva	PLS koeficijent	Rastojanje (Å)	Par MIF čvorova	Opis
var519	0.183	14,4–14,8	O–N1	Promenljiva sa najvećim PLS koeficijentom. Prisutna je kod pojedinih jedinjenja iz oba klastera i predstavlja rastojanje između donora vodonične veze (HBD) i akceptora vodonične veze (HBA) na suprotnim stranama molekula.
var350	0.161	2,0–2,4	DRY–N1	Prisutna je prvenstveno kod derivata Bzo klastera i opisuje rastojanje između hidrofobnog dela i prostorno bliskog akceptora vodonične veze (HBA).
var508	0.158	10,0–10,4	O–N1	Optimalno rastojanje između donora vodonične veze (HBD) i akceptora vodonične veze (HBA), izraženo kod većine jedinjenja Bzo klastera i nekoliko derivata Thz klastera.
var146	0.169	3,2–3,6	N1–N1	Rastojanje između dva akceptora vodonične veze (HBA), koje nije prisutno kod nekih manje aktivnih jedinjenja iz klastera.
var375	0.121	12,4–12,8	DRY–N1	Slična promenljivoj var350, ali je prisutna kod svih jedinjenja.
var11	0.140	4,4–4,8	DRY–DRY	Rastojanje između dva hidrofobna dela, prisutno kod svih jedinjenja.
var228	0.115	8,4–8,8	TIP–TIP	Rastojanje između dva sterna regiona, prisutno kod svih jedinjenja.
var282	–0.123	2,4–2,8	DRY–O	Odsutna je kod aktivnijih jedinjenja i opisuje rastojanje između hidrofobnog regiona i prostorno bliskog donora vodonične veze (HBD).
var291	–0.130	6,0–6,4	DRY–O	Slična promenljivoj var282, ali je prisutna kod gotovo svih jedinjenja.
var566	–0.183	5,6–6,0	O–TIP	Opisuje negativan uticaj rastojanja između donora vodonične veze (HBD) i sternog centra u neposrednoj blizini. Ova promenljiva ima najveći negativan uticaj.

U O–O korelogramu većina promenljivih pozitivno koreliše sa inhibitornom aktivnošću prema PI3K β . Jedna od najuticajnijih promenljivih bila je *var11*, koja odgovara rastojanju od 4,4–4,8 Å. Ova promenljiva opisuje značaj para hidrofobnih centara, odnosno imidazolskog i triazolskog prstena kod jedinjenja Bzo klastera, kao i tiazolnog i benzenovog prstena kod jedinjenja Thz klastera. Promenljiva *var11* je izražena kod svih jedinjenja, pri čemu sva jedinjenja sa pKi vrednošću većom od 7,0 imaju vrednost ove promenljive iznad 0,5.

Promenljiva *var146* iz N1–N1 korelograma, u opsegu rastojanja 3,2–3,6 Å, ima značajan pozitivan uticaj na aktivnost. Kod benzoksazepinskih derivata ona opisuje optimalno rastojanje između kiseonika benzoksazepina i susednog azota imidazola, dok kod drugih jedinjenja može opisivati odnos dva karbonilna kiseonika iz amidne i ureidne grupe. Ova promenljiva nije izražena kod pojedinih manje aktivnih jedinjenja Thz klastera.

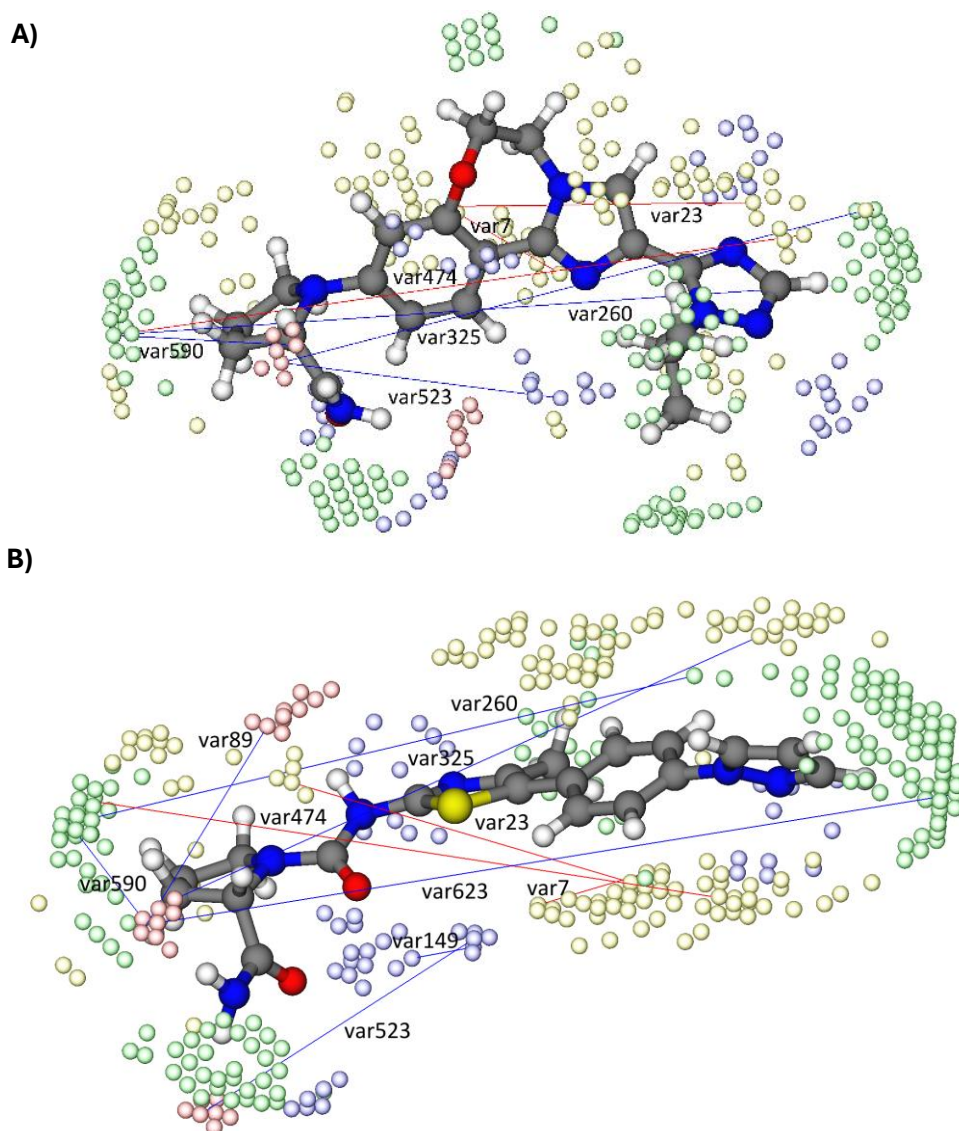
Pozitivan doprinos aktivnosti pokazuje i promenljiva *var228* iz TIP–TIP korelograma, koja odgovara rastojanju od 8,4–8,8 Å. Ona opisuje prisustvo dva sterna dela na optimalnom rastojanju. Kod benzoksazepinskih derivata *var228* se formira između triazolskog prstena i izopropil grupe, dok se kod tiazolnih derivata javlja između različitih strukturnih entiteta.

Za razliku od navedenih promenljivih, većina DRY–O promenljivih ima negativan uticaj na inhibitornu aktivnost prema PI3K β . Promenljive *var282* i *var291*, koje odgovaraju rastojanjima od 2,4–2,8 Å i 6,0–6,4 Å, opisuju odnos između MIF-ova koji interaguju sa donorom vodonične veze, kao što je amidni vodonik, i hidrofobnog dela molekula, bilo da je reč o hidrofobnom supstituentu ili aromatičnom prstenu. Promenljiva *var282* nije prisutna kod aktivnijih jedinjenja Bzo klastera, uključujući **B1** (Slika 4.32A).

Promenljive *var350* i *var375* iz DRY–N1 korelograma formiraju se između akceptora vodonične veze i hidrofobnog dela molekula. Promenljiva *var350*, u opsegu 2,0–2,4 Å, je prisutna kod gotovo svih jedinjenja Bzo klastera i kod manjeg broja jedinjenja Thz klastera, dok jedinjenje **T1** ne formira ovu promenljivu (Slika 4.32B). Kod benzoksazepinskih derivata, ove promenljive opisuju rastojanja između MIF-ova koji interaguju sa azotom imidazolskog prstena, u slučaju *var350*, ili azotom triazolskog prstena, u slučaju *var375*, i hidrofobnog oksazepinskog prstena. Kod jedinjenja Thz klastera, karbonilni kiseonik amidne grupe ili kiseonik sulfonske grupe nalazi se na rastojanju povoljnom za inhibitornu aktivnost prema PI3K β u odnosu na benzenov prsten ili drugi odgovarajući prsten.

Amidne grupe učestvuju u formiranju dve važne promenljive iz O–N1 korelograma. Promenljiva *var508*, u opsegu 10,0–10,4 Å, formira se između amidnog vodonika kao donora vodonične veze i azota imidazolskog ili tiazolnog prstena kao akceptora vodonične veze. Druga promenljiva, *var519*, u opsegu 14,4–14,8 Å, formira se između amidnog vodonika kao donora vodonične veze i triazolskog prstena ili azota uree kao akceptora vodonične veze.

Promenljiva *var566*, koja pripada O–TIP grupi i odgovara rastojanju od 5,6–6,0 Å, opisuje rastojanje između amidnog vodonika i susednog sternog centra. Kod jedinjenja **T1** ove dve promenljive nisu izražene.



Slika 4.32. Najvažnije pozitivne (crveno) i negativne (plavo) promenljive iz PI3K β 3D-QSAR modela za jedinjenja A) **B1** i B) **T1**; plave sfere predstavljaju N1 probe (donor vodonične veze), crvene sfere O probe (akceptor vodonične veze), žute sfere DRY probe (hidrofobni centri), a zelene sfere TIP probe (sterna žarišta).

4.3.4.5. Studija molekuskog dokinga PI3K β izoforme

Rezultati doking studije pokazuju da, za razliku od α izoforme, derivati Bzo klastera uglavnom ne formiraju vodoničnu vezu sa aminokiselinom zglobnog regiona β Val854. Ova interakcija je uočena samo kod nekoliko jedinjenja sa višom inhibitornom aktivnošću prema PI3K β . Pored toga, u pojedinim pozama su zabeležene vodonične veze sa β Ser799 i β Thr856, dok manje aktivna jedinjenja pokazuju tendenciju formiranja vodoničnih veza sa β Trp787.

Hidrofobne interakcije derivata Bzo klastera najčešće uključuju oksazepinski prsten i aminokiseline β Glu852, β Val853, β Met926 i β Phe934 u zglobnom regionu. Dodatne hidrofobne interakcije uočene su i između triazolskog prstena i izopropil-supstituenta sa aminokiselinama β Met779, β Pro785, β Ile803, β Lys805, β Ile851 i β Ile936.

Nasuprot tome, jedinjenja Thz klastera češće formiraju vodoničnu vezu sa β Val854, dok neka jedinjenja dodatno ostvaruju interakcije sa β Ser857 i β Glu858. Ipak, u poređenju sa jedinjenjima Bzo

klastera, kod Thz derivata je prisutan manji broj hidrofobnih interakcija. Ove interakcije su uglavnom usmerene ka zglobnom regionu, pri čemu tiazolni prsten ostvaruje kontakte sa $\beta\text{Tyr}839$, $\beta\text{Glu}852$, $\beta\text{Val}853$ i $\beta\text{Phe}934$.

4.3.4.6. Uporedna analiza rezultata PI3K β izoforme

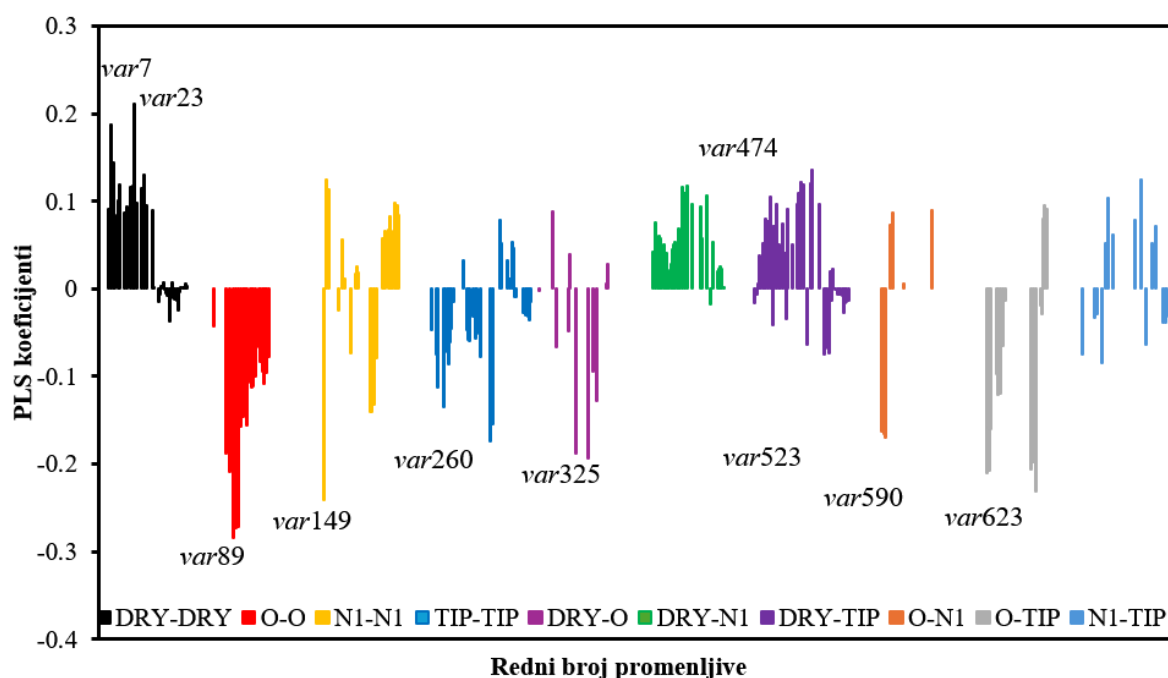
Povezivanjem rezultata dokinga sa PI3K β 3D-QSAR modelom može se uočiti da su promenljive *var11* (DRY–DRY) i *var228* (TIP–TIP) u korelaciji sa povoljnim hidrofobnim i sternim interakcijama. Rastojanje opisano promenljivom *var11*, od 4,4–4,8 Å, odgovara rastojanju između interakcija imidazola sa $\beta\text{Val}853$ i triazolskog prstena sa $\beta\text{Phe}934$. Sa druge strane, *var228*, u opsegu 8,4–8,8 Å, odgovara rastojanju između sternih delova, kao što su triazolski prsten i izopropil grupa, koji ostvaruju kontakte sa $\beta\text{Ile}803$ i $\beta\text{Ile}936$.

Pozitivne O–N1 promenljive, *var519* i *var508*, obuhvataju donor–akceptor rastojanja koja odgovaraju geometriji vodoničnih veza amidnih grupa sa ostacima zglobnog regiona $\beta\text{Val}854$, $\beta\text{Ser}799$ i $\beta\text{Thr}856$. Nasuprot tome, negativne promenljive *var291* (DRY–O: 6,0–6,4 Å) i *var566* (O–TIP: 5,6–6,0 Å) ukazuju na nepovoljno rastojanje između grupe donora vodonične veze i sternih ili hidrofobnih regiona. Ovo se može povezati sa odsustvom vodonične veze amidne grupe i suboptimalnim vezivanjem triazolskog prstena u džepu aktivnosti.

Sveukupno, efikasna inhibicija PI3K β povezana je sa izraženim hidrofobnim i sternim interakcijama u zglobnom regionu i afinitetnom džepu, uz dodatni doprinos vodoničnih veza sa $\beta\text{Val}854$, $\beta\text{Ser}799$ i $\beta\text{Thr}856$. Istovremeno, za povoljno vezivanje je važno izbegavanje sternih sudara i loše orijentisanih donora vodonične veze.

4.3.4.7. PI3K γ 3D-QSAR model

PI3K γ model sastoji se od 247 promenljivih, a dve latentne promenljive određuju njegovu dimenzionalnost. Slika 4.33 i Tabela 4.16 ističu najznačajnije promenljive.



Slika 4.33. Grafik PLS koeficijenata sa označenim najvažnijim promenljivim za PI3K γ 3D-QSAR model.

Tabela 4.16. Sažetak najvažnijih varijabli PI3K γ 3D-QSAR modela.

Promenljiva	PLS koeficijent	Rastojanje (Å)	Par MIF čvorova	Opis
<i>var23</i>	0,212	9,2–9,6	DRY–DRY	Najuticajnija pozitivna promenljiva; prisutna je kod svih jedinjenja i opisuje rastojanje između dva hidrofobna regiona.
<i>var11</i>	0,187	2,8–3,2	DRY–DRY	Rastojanje između dva prostorno bliska hidrofobna regiona u određenom regionu, prisutno kod svih jedinjenja.
<i>var260</i>	0,174	17,6–18,0	TIP–TIP	Prisutna je kod gotovo svih jedinjenja, između dva sterna regiona, i predstavlja rastojanje od jednog do drugog kraja jedinjenja.
<i>var474</i>	0,136	16,8–17,2	DRY–TIP	Rastojanje između sternog centra i hidrofobnog regiona na suprotnim stranama jedinjenja.
<i>var523</i>	–0,170	7,6–8,0	O–TIP	Slična promenljivoj <i>var592</i> ; opisuje rastojanje između donora vodonične veze (HBD) i sternog centra, koje nije formirano kod pojedinih jedinjenja sa najvišom aktivnošću.
<i>var149</i>	–0,241	2,0–2,4	N1–N1	Nepovoljno rastojanje između dva akceptora vodonične veze (HBA).
<i>var590</i>	–0,279	6,4–6,8	O–TIP	Nije prisutna kod najaktivnijeg jedinjenja; opisuje rastojanje između donora vodonične veze (HBD) i prostorno bliskog sternog centra.
<i>var89</i>	–0,284	6,8–7,2	O–O	Rastojanje između dva donora vodonične veze (HBD), formirano kod pojedinih jedinjenja iz oba klastera.
<i>var325</i>	–0,288	14,8–15,2	DRY–O	Opisuje rastojanje između donora vodonične veze (HBD) i hidrofobnog dela na suprotnoj strani jedinjenja, prvenstveno kod jedinjenja Bzo klastera.

Većina DRY–DRY promenljivih ima pozitivan uticaj na inhibitornu aktivnost prema PI3K γ . Promenljive *var7* (2,8–3,2 Å) i *var23* (9,2–9,6 Å) predstavljaju dve najuticajnije pozitivne promenljive i opisuju rastojanje između dva hidrofobna regiona. *var7* opisuje rastojanje između imidazola i triazola kod benzoksazepinskih derivata, ili između tiazolnog i benzenovog prstena kod tiazolnih derivata. *var23* obično opisuje rastojanje između piridinskog ili benzenovog prstena kondenzovanog sa oksazepanskim prstenom kao jednog entiteta i triazolskog prstena u Bzo klasteru kao drugog entiteta, ili između tiazolnog prstena i različitih entiteta u Thz klasteru. Najaktivnije jedinjenje, **B1** (Slika 4.34A), ima visoku vrednost ovog deskriptora, koji se formira između benzenovog i tiazolnog prstena.

Sve O–O promenljive negativno utiču na aktivnost. Najvažnija promenljiva iz ovog korelograma, *var89* (6,8–7,2 Å), izražena je samo kod nekoliko manje aktivnih jedinjenja Thz klastera. Ona opisuje rastojanje između vodonika uree i amidnog vodonika kao dva donora vodonične veze.

N1–N1 promenljiva, *var149* (2,0–2,4 Å), formira se kod nekoliko jedinjenja iz seta podataka i opisuje neoptimalno rastojanje između dva akceptora vodonične veze: kiseonika oksazepina i azota imidazola kod jedinjenja Bzo klastera, odnosno azota tiazola i karbonilnog kiseonika kod jedinjenja Thz klastera. Ova promenljiva nije prisutna kod jedinjenja **B1**, ali je prisutna kod **T1** (Slika 4.34B).

Jedna TIP–TIP promenljiva ima značajan negativan uticaj na inhibitornu aktivnost. *var260* (17,6–18,0 Å) formira se između terminalnih delova R₁ i R₂ supstituenta kod jedinjenja Bzo klastera, odnosno R₁ i R₃ supstituenta kod jedinjenja Thz klastera, opisujući sterna oblik samog jedinjenja. Promenljiva pokazuje negativan uticaj veličine jedinjenja na inhibitornu aktivnost prema PI3K γ .

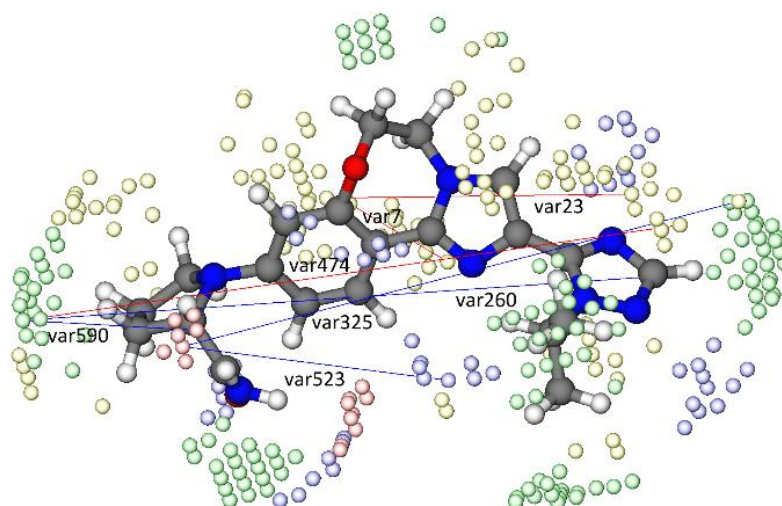
var325 (14,8–15,2 Å) iz DRY–O korelograma takođe negativno utiče na aktivnost. Promenljiva je izražena između hidrofobnog dela u R₁ supstituentima u oba klastera i amidnog ili ureidnog vodonika, koji predstavlja donora vodonične veze.

DRY–TIP korelogram sadrži *var474* (16,8–17,2 Å), koja se na sličan način formira kao promenljiva *var260*, ali sa R₁ supstituentom kao hidrofobnom strukturom, i ima pozitivan uticaj na aktivnost.

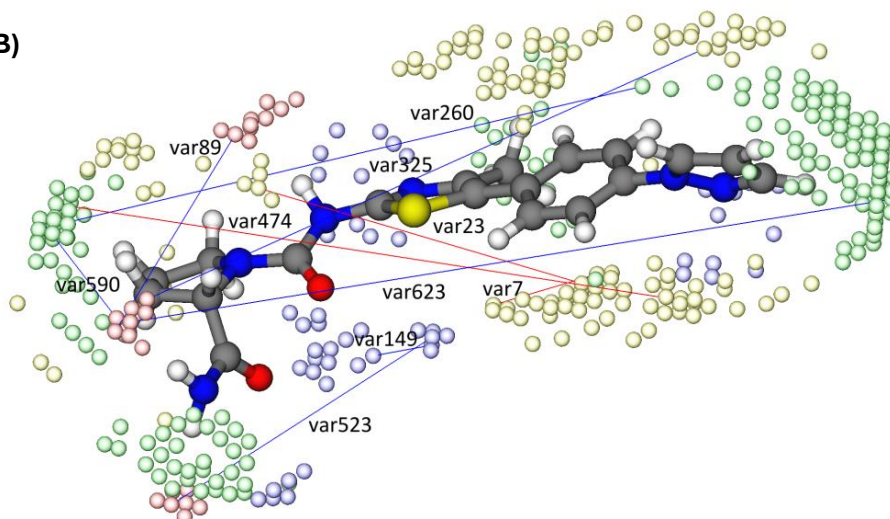
var523 (7,6–8 Å) iz O–N1 korelograma predstavlja rastojanje između donora i akceptora vodonične veze. Samo nekoliko najaktivnijih jedinjenja ne formira ovu promenljivu. Jedinjenja Bzo klastera formiraju promenljivu između azota diazola i vodonika amidne grupe, dok je kod jedinjenja Thz klastera prisutna između karbonilnog kiseonika uree i vodonikovog atoma ureidne grupe ili vodonikovog atoma amidne grupe.

O–TIP korelogram uključuje dve promenljive koje opisuju rastojanje između donora vodonične veze i hidrofobne strukture: *var590* (5,6–6,0 Å) i *var623* (18,8–19,2 Å). *var590* se formira između vodonika amidne grupe i različitih sternih delova u neposrednoj blizini i nije prisutna kod najaktivnijeg PI3Kγ jedinjenja **B31**. *var623* je dominantnije izražena kod manje aktivnih jedinjenja. Kod benzoksazepinskih derivata formira se između vodonika amidne grupe i R₃ supstituenta, bilo izopropil grupe na položaju 1 ili vodonika/metil grupe na položaju 3 1,2,4-triazola. U strukturi tiazolnih derivata, *var623* se formira između vodonika amidne grupe i različitih sternih centara u R₃ supstituentu.

A)



B)



Slika 4.34. Najvažnije pozitivne (crveno) i negativne (plavo) promenljive iz PI3K γ 3D-QSAR modela za jedinjenja A) **B1** i B) **T1**; plave sfere predstavljaju N1 probe (donor vodonične veze), crvene sfere O probe (akceptor vodonične veze), žute sfere DRY probe (hidrofobni centri), a zelene sfere TIP probe (sterna žarišta).

4.3.4.8. Studija molekuskog dokinga PI3K γ izoforme

Rezultati doking studije pokazali su da jedinjenja Bzo klastera formiraju vodoničnu vezu u zglobnom regionu sa γ Val882. Kod pojedinih jedinjenja azot triazolskog prstena dodatno formira vodoničnu vezu sa γ Lys833 u afinitetnom džepu. Druge vodonične veze mogu se ostvariti sa γ Asp884 i γ Ala885 iz hidrofobnog regiona. Hidrofobni kontakti uključivali su različite aminokiseline, među kojima su γ Tyr879, γ Ile879 i γ Ile963 u zglobnom regionu, γ Met804, γ Pro810, γ Leu838 i γ Ile879 u afinitetnom džepu, kao i γ Met953.

Kod aktivnijih jedinjenja Thz klastera takođe je uočeno formiranje vodonične veze sa γ Val882, i to preko azota tiazolnog prstena, dok kod manje aktivnih jedinjenja ova interakcija nije bila prisutna. Sulfonski derivati su dodatno formirali vodoničnu vezu sa γ Asp964. Hidrofobni kontakti obuhvatali su interakcije sa γ Glu880, γ Ile963 i γ Met953 u zglobnom regionu, zatim sa γ Leu845, γ Tyr867, γ Ile879 i γ Ile963 u afinitetnom džepu, kao i sa γ Met804 i γ Ser806.

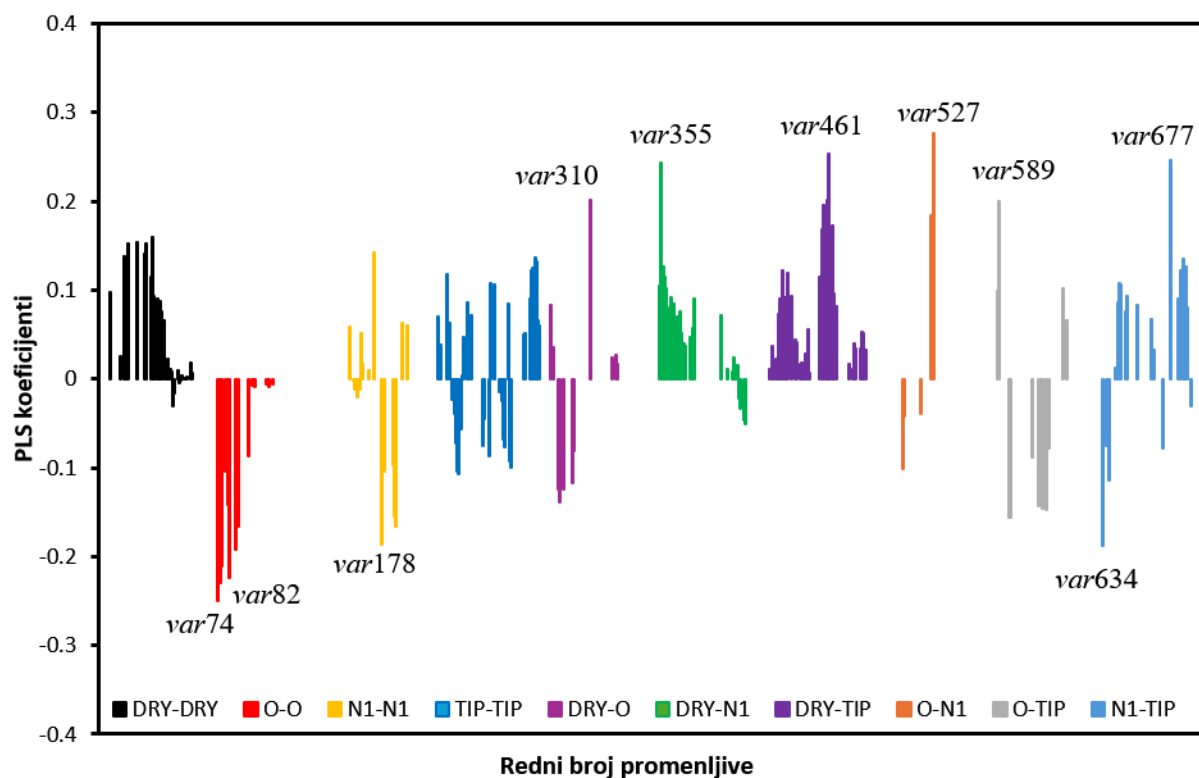
4.3.4.9. Uporedna analiza rezultata PI3K γ izoforme

Povezivanjem rezultata dokinga sa 3D-QSAR modelom PI3K γ može se uočiti da su promenljive *var7* i *var23* iz DRY–DRY korelograma, kao i *var260* iz TIP–TIP korelograma, povezane sa hidrofobnim rastojanjima i sternom ravnotežom važnom za aktivnost. *var7*, u opsegu 2,8–3,2 Å, odgovara kratkodometnim kontaktima između γ Tyr879 i γ Ile963, dok *var23*, u opsegu 9,2–9,6 Å, odgovara rastojanju između dve hidrofobne interakcije koje uključuju γ Ile879 i γ Val882. Promenljiva *var260*, u opsegu 17,6–18,0 Å, može se povezati sa sternim razmakom između grupa koje ostvaruju kontakte sa γ Lys833 u afinitetnom džepu i γ Met953.

Nasuprot tome, negativne promenljive, kao što je *var623* iz O–TIP korelograma, opisuju nepovoljno rastojanje između interakcije donora vodonične veze iz dela koji modifikuje selektivnost i sterne interakcije dela koji se vezuje u afinitetni džep. Ovakav raspored je u skladu sa slabijim vezujućim pozama i odsustvom formiranih vodoničnih veza. Posmatrano zajedno, rezultati 3D-QSAR i doking analiza ukazuju da potentnost PI3K γ inhibitora zavisi od uravnoteženog hidrofobnog uklapanja i sterne komplementarnosti u zglobnom regionu i afinitetnom džepu, dok neusklađene polarne grupe modifikatora selektivnosti mogu oslabiti vezivanje.

4.3.4.10. PI3K δ 3D-QSAR model

PI3K δ model je obuhvatao 205 promenljivih, dok je dimenzionalnost modela bila definisana pomoću dve latentne promenljive. Najvažnije promenljive ovog modela su prikazane na Slici 4.35 i u Tabeli 4.17.



Slika 4.35. Grafik PLS koeficijenata sa označenim najvažnijim promenljivim za PI3Kδ 3D-QSAR model.

Tabela 4.17. Sažetak najvažnijih varijabli PI3Kδ 3D-QSAR modela.

Promenljiva	PLS koeficijent	Rastojanje (Å)	Par MIF čvorova	Opis
<i>var74</i>	−0,250	1,6–2,0	O–O	Blisko rastojanje između dva donora vodonične veze (HBD), prisutno samo kod pojedinih manje aktivnih jedinjenja Thz klastera. Ova promenljiva ima najveći negativan uticaj na aktivnost.
<i>var82</i>	−0,225	4,8–5,2	O–O	Slična promenljivoj <i>var74</i> .
<i>var178</i>	−0,186	15,2–15,6	N1–N1	Prisutna je kod nekoliko jedinjenja iz oba klastera i opisuje rastojanje između dva akceptora vodonične veze (HBA) na suprotnim stranama jedinjenja.
<i>var310</i>	0,202	12,0–12,4	DRY–O	Rastojanje između hidrofobnog regiona i donora vodonične veze (HBD), formirano kod većine jedinjenja.
<i>var355</i>	0,243	2,0–2,4	DRY–N1	Optimalno rastojanje između hidrofobnog regiona i akceptora vodonične veze (HBA).
<i>var461</i>	0,254	16,4–16,8	DRY–TIP	Optimalno rastojanje između hidrofobnog regiona i sternog centra.
<i>var527</i>	0,277	14,8–15,2	O–N1	Promenljiva sa najvećim pozitivnim uticajem na aktivnost. Opisuje rastojanje između donora vodonične veze (HBD) i akceptora vodonične veze (HBA), a nije prisutna kod pojedinih manje aktivnih jedinjenja iz oba klastera.
<i>var589</i>	0,201	3,6–4,0	O–TIP	Blisko rastojanje između donora vodonične veze (HBD) i sternog centra.

Promenljiva	PLS koeficijent	Rastojanje (Å)	Par MIF čvorova	Opis
<i>var634</i>	-0,188	1,6–2,0	N1–TIP	Kratko rastojanje između akceptora vodonične veze (HBA) i sternog centra, izraženo kod svih jedinjenja.
<i>var677</i>	0,246	18,8–19,2	N1–TIP	Rastojanje između akceptora vodonične veze (HBA) i sternog centra na suprotnim stranama jedinjenja.

Sve promenljive iz O–O korelograma imaju negativan uticaj na inhibitornu aktivnost prema PI3Kδ. Najizraženiji doprinos pokazale su dve promenljive, *var74* i *var82*, koje odgovaraju rastojanjima od 1,6–2,0 Å i 4,8–5,2 Å. Obe promenljive opisuju rastojanje između dva donora vodonične veze i izražene su samo kod nekoliko jedinjenja Thz klastera. *var74* se formira između dva vodonika uree, dok *var82* opisuje odnos između vodonika uree i vodonika amidne grupe.

Promenljiva *var178* iz N1–N1 korelograma, u opsegu 15,2–15,6 Å, takođe ima negativan uticaj na aktivnost. Kod jedinjenja Bzo klastera formira se između azota 1,2,4-triazola i različitih akceptora vodonične veze u R₁ supstituentu, dok se kod jedinjenja Thz klastera javlja između kiseonika amidne ili ureidne grupe i različitih akceptora vodonične veze u R₃ supstituentu. Ova promenljiva je jedna od dve negativne promenljive formirane kod **T1**, dok kod **B1** nije prisutna (Slika 4.36).

U DRY–O korelogramu izdvojena je promenljiva *var310*, koja odgovara rastojanju od 12,0–12,4 Å i opisuje odnos između donora vodonične veze i hidrofobnog dela molekula. Ova promenljiva pozitivno utiče na aktivnost i formira se između amidnog vodonika i 1,2,4-triazola kod benzoksazepinskih derivata, odnosno između kiseonika amidne ili ureidne grupe i benzenovog prstena kod tiazolnih derivata.

DRY–N1 korelogram sadrži promenljivu *var355*, u opsegu 2,0–2,4 Å, koja opisuje optimalno rastojanje između MIF-ova formiranih imidazolskim ili 1,2,4-triazolskim prstenom kao hidrofobnim delom i njegovim azotom kao akceptorom vodonične veze kod jedinjenja Bzo klastera. Kod jedinjenja Thz klastera ova promenljiva se formira između benzenovog prstena i akceptora vodonične veze u R₃ supstituentu.

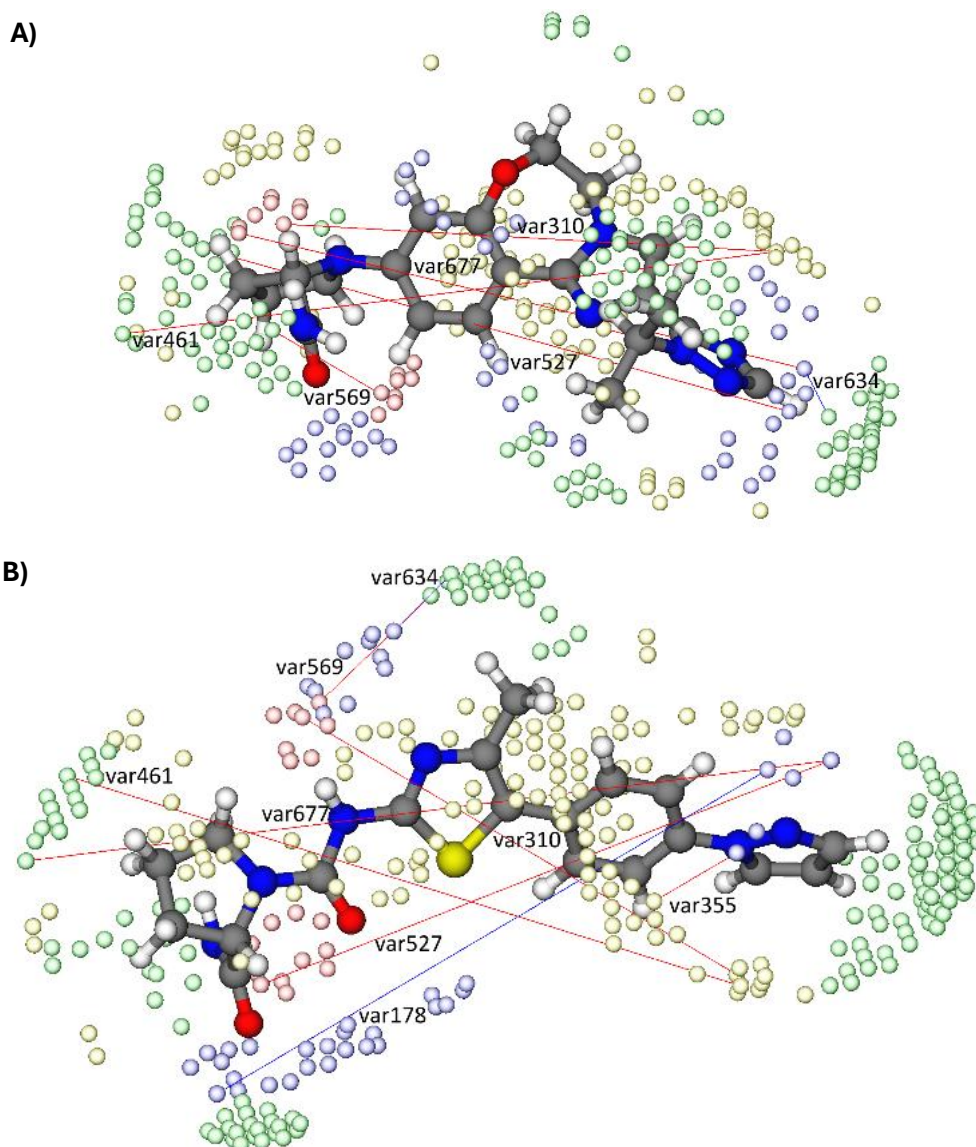
Sve DRY–TIP promenljive pozitivno utiču na aktivnost. Među njima se izdvaja *var461*, koja odgovara rastojanju od 16,4–16,8 Å. Kod Bzo klastera ova promenljiva povezuje hidrofobni 1,2,4-triazol sa različitim R₁ supstituentima kao sternim centrima. Kod Thz klastera najčešće je izražena između hidrofobnog benzenovog prstena i R₃ supstituenta kao sternog dela molekula.

Promenljiva *var527* iz O–N1 korelograma ima najviši pozitivni PLS koeficijent u PI3Kδ modelu. Ova promenljiva, u opsegu 14,8–15,2 Å, opisuje rastojanje između donora i akceptora vodonične veze. Najčešće se formira kod benzoksazepinskih derivata, između vodonika amidne grupe i azota 1,2,4-triazola. Kod tiazolnih derivata *var527* se javlja između amidnog ili ureidnog vodonika i azota pirazola ili kiseonika keto grupe iz R₁ supstituenta.

Pozitivan doprinos inhibitornoj aktivnosti pokazuje i promenljiva *var569* iz O–TIP grupe, koja odgovara rastojanju od 3,6–4,0 Å. Kod jedinjenja Bzo klastera ova promenljiva je izražena između MIF-ova koji interaguju sa vodonikom amidne grupe, koji predstavlja donora vodonične veze, i kiseonikom koji predstavlja sterni centar. Kod jedinjenja Thz klastera, prvenstveno se formira između vodonika amidne ili ureidne grupe i metil grupe na položaju 4 tiazolnog prstena.

N1–TIP korelogram sadrži dve važne promenljive, *var634* i *var677*, koje odgovaraju rastojanjima od 1,6–2,0 Å i 18,8–19,2 Å. Obe promenljive opisuju rastojanje između akceptora vodonične veze i sternog centra. Kod benzoksazepinskih derivata *var634* se formira između azota 1,2,4-triazola i metil grupe ili vodonika, dok *var677* opisuje odnos između azota 1,2,4-triazola i amidne grupe. *var634* je

jedina negativna promenljiva formirana kod jedinjenja **B1**. Kod jedinjenja Thz klastera *var634* se formira između azota tiazola i metil-supstituenta, dok se *var677* javlja samo kod pojedinih tiazolnih derivata, između različitih akceptora vodonične veze u R_3 supstituentu i udaljenih delova R_1 supstituenata kao sternog centra. Ova promenljiva je bila prisutna kod **T1**.



Slika 4.36. Najvažnije pozitivne (crveno) i negativne (plavo) promenljive iz PI3K δ 3D-QSAR modela za jedinjenja A) **B1** i B) **T1**; plave sfere predstavljaju N1 probe (donor vodonične veze), crvene sfere O probe (akceptor vodonične veze), žute sfere DRY probe (hidrofobni centri), a zelene sfere TIP probe (sterna žarišta).

4.3.4.11. Studija molekuskog dokinga PI3K δ izoforme

Rezultati dokinga pokazuju da jedinjenja Bzo klastera formiraju vodoničnu vezu sa $\delta Val828$. Interakcija sa $\delta Asn836$ nije uočena, ali su uočene druge vodonične veze, uključujući one sa $\delta Arg830$ i $\delta Ser831$. Hidrofobni kontakti se formiraju sa $\delta Ile758$, $\delta Ile777$, $\delta Tyr813$, $\delta Ile825$, $\delta Glu826$, $\delta Val827$ i $\delta Ile910$ u zglobnom regionu. U afinitetnom džepu su uočene interakcije sa $\delta Met752$ i $\delta Ile910$. Pored toga, motiv selektivnosti formira T-oblikovanu π - π interakciju sa $\delta Trp760$.

Jedinjenja Thz klastera takođe formiraju vodoničnu vezu sa $\delta Val828$. U ovoj interakciji azot tiazolnog prstena deluje kao akceptor vodonične veze, dok susedni azot iz ureidne ili amidne grupe deluje kao

donor vodonične veze. Karbonilni kiseonik dodatno formira vodoničnu vezu sa $\delta Trp760$, dok sulfonski derivati formiraju vodoničnu vezu sa $\delta Asp911$. Tiazolni zglobni vezujući deo ostvaruje različite hidrofobne kontakte, uključujući interakcije sa $\delta Tyr813$, $\delta Ile825$, $\delta Glu826$, $\delta Val827$, $\delta Met900$ i $\delta Phe908$. Benzenov prsten i susedni supstituenti takođe učestvuju u hidrofobnim interakcijama sa $\delta Ile910$ i $\delta Tyr813$ u afinitetnom džepu.

4.3.4.12. Uporedna analiza rezultata PI3K δ izoforme

Povezivanjem rezultata dokinga sa PI3K δ 3D-QSAR modelom, kao ključne promenljive izdvajaju se *var355* (DRY–N1), *var310* (DRY–O) i *var527* (O–N1), koje naglašavaju značaj povoljnih hidrofobnih i donor–akceptor interakcija. Rastojanje obuhvaćeno promenljivom *var355*, od 2,0–2,4 Å, odgovara kratkom rastojanju između vodonične veze sa $\delta Lys779$ i hidrofobne interakcije sa aminokiselinskim ostatkom $\delta Ile825$. Promenljiva *var310*, definisana u intervalu rastojanja 12,0–12,4 Å, nalazi se u prostornom regionu koji odgovara položaju vodoničnih veza liganda sa aminokiselinskim ostacima $\delta Arg830$ i $\delta Ser831$, kao i hidrofobne interakcije fragmenta vezanog za zglobni region sa $\delta Ile910$. Promenljiva *var527* (O–N1), u opsegu 14,8–15,2 Å, odgovara vodoničnim vezama u zglobnom regionu koje uključuju aminokiseline $\delta Val828$ i $\delta Ser831$.

Dodatne promenljive, *var461* (DRY–TIP: 16,4–16,8 Å) i *var677* (N1–TIP: 18,8–19,2 Å), ukazuju da povećani sterni doprinos supstrukture susedne amidnoj grupi može pojačati aktivnost prema PI3K δ . Ovakav doprinos je u skladu sa interakcijom ove strukture sa aminokiselinom $\delta Trp760$ i njenim rastojanjem od aminokiseline $\delta Ile825$. Nasuprot tome, *var634* (N1–TIP: 1,6–2,0 Å) ukazuje na sterni raspored motiva vezujućeg dela džepa aktivnosti koji je nepovoljan za δ inhibiciju, što se odražava kroz odsustvo većeg broja interakcija ove strukture u džepu.

Sveukupno, inhibicija PI3K δ oslanja se na snažno formiranje vodoničnih veza u zglobnom regionu i stabilne hidrofobne kontakte u afinitetnom džepu. Istovremeno, povoljniji profil aktivnosti zahteva kompaktniju supstrukturu za vezivanje u afinitetni džep i uvođenje voluminoznijeg dela koji modifikuje selektivnost.

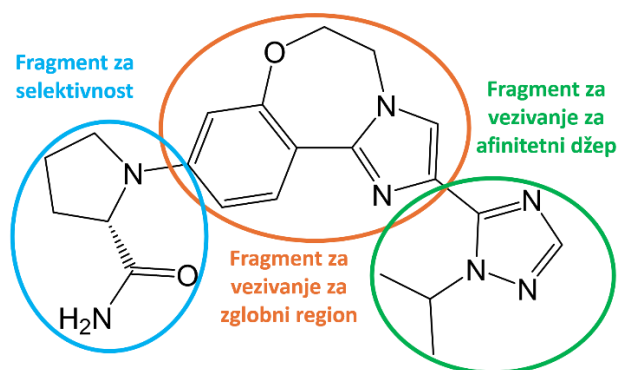
4.3.5. Uporedna analiza 3D-QSAR i doking studija sa definisanjem strukturnih determinanti i smernica za dizajn selektivnih PI3K α inhibitora

Dalja analiza dobijenih rezultata je sprovedena sa ciljem razjašnjavanja strukturnih karakteristika koje doprinose povećanju inhibitorne aktivnosti prema PI3K α , uz istovremeno smanjenje aktivnosti prema ostalim PI3K izoformama.

Za PI3K α inhibitore je poznato da formiraju vodoničnu vezu sa $\alpha Val851$. Pored toga, prethodne studije su pokazale da ciljanje interakcije sa nekonzerviranom aminokiselinom $\alpha Gln859$ može predstavljati efikasnu strategiju za postizanje selektivne inhibicije PI3K α [160]. U ovoj studiji je ovaj pristup dodatno razmatran kroz analizu interakcija sa nekonzerviranim aminokiselinama, očuvanje i optimizaciju pozitivnih promenljivih PI3K α modela, kao i smanjenje doprinosa njegovih negativnih promenljivih. Istovremeno je bilo važno smanjiti pozitivne, a povećati negativne promenljive u 3D-QSAR modelima formiranim za PI3K β , PI3K γ i PI3K δ izoforme.

Promenljive *var481* (O–N1: 13,2–13,6 Å) i *var488* (O–N1: 16,0–16,4 Å) iz PI3K α modela opisuju rastojanje između akceptora i donora vodonične veze koji se nalaze na suprotnim stranama molekula. O proba je povezana sa amidnom grupom, koja učestvuje i u interakciji sa $\alpha Gln859$, dok N1 proba interaguje sa azotom triazolskog prstena jedinjenja **B1** (Slika 4.37), koji se vezuje u afinitetni džep. Zbog toga očuvanje akceptora vodonične veze u delu molekula koji se vezuje u afinitetni džep može olakšati dizajn novih, potencijalno selektivnih PI3K α inhibitora. Ova karakteristika je izražena i u PI3K δ modelu, ali ne i u modelima PI3K β i PI3K γ , u kojima se javljaju promenljive nepovoljne za

aktivnost, kao što su *var566* (O–TIP) i *var291* (DRY–O) u PI3K β modelu, odnosno *var325* (DRY–O) i *var590* (O–TIP) u PI3K γ modelu.



Slika 4.37. Jedinjenje B1 i njegovi delovi strukture.

Sa druge strane, u PI3K α modelu je izdvojena promenljiva *var528* (O–TIP), koja opisuje negativan uticaj sternih osobina dela molekula susednog amidnoj grupi koja se vezuje za α Gln859, odnosno pirolidinskog dela u jedinjenju **B1** (Slika 4.37). Istovremeno, PI3K δ model sadrži tri promenljive koje ukazuju na pozitivan uticaj sternih osobina modifikatora selektivnosti na aktivnost prema PI3K δ : *var461* (DRY–TIP), *var569* (O–TIP) i *var677* (N1–TIP). Zbog toga bi modifikacija ovog dela molekula, uz očuvanje sposobnosti formiranja vodonične veze sa α Gln859, mogla predstavljati važan pravac u dizajnu novih jedinjenja.

Dodatno, promenljiva *var397* (DRY–TIP) iz PI3K α modela ukazuje na povoljan uticaj hidrofobnih osobina triazolskog prstena i sternih osobina susednih supstituenata. Ova karakteristika nije povoljna za inhibitornu aktivnost prema PI3K δ , što je prikazano promenljivom *var634* (N1–TIP). Prema tome, optimizacija sternih osobina ovih supstituenata može doprineti povećanju PI3K α aktivnosti, uz istovremeno održavanje niže aktivnosti prema PI3K δ .

Pored navedenih karakteristika, dizajnirana jedinjenja treba da zadrže sposobnost formiranja ključnih hidrofobnih interakcija sa aminokiselinama u afinitetnom džepu PI3K α enzima, uključujući α Met772, α Pro778, α Ile800, α Ile848, α Met922 i druge ostatke. Značaj hidrofobnosti ovog dela molekula podržan je većim brojem promenljivih PI3K α modela, među kojima su *var15* (DRY–DRY), *var291* (DRY–O) i *var397* (DRY–TIP).

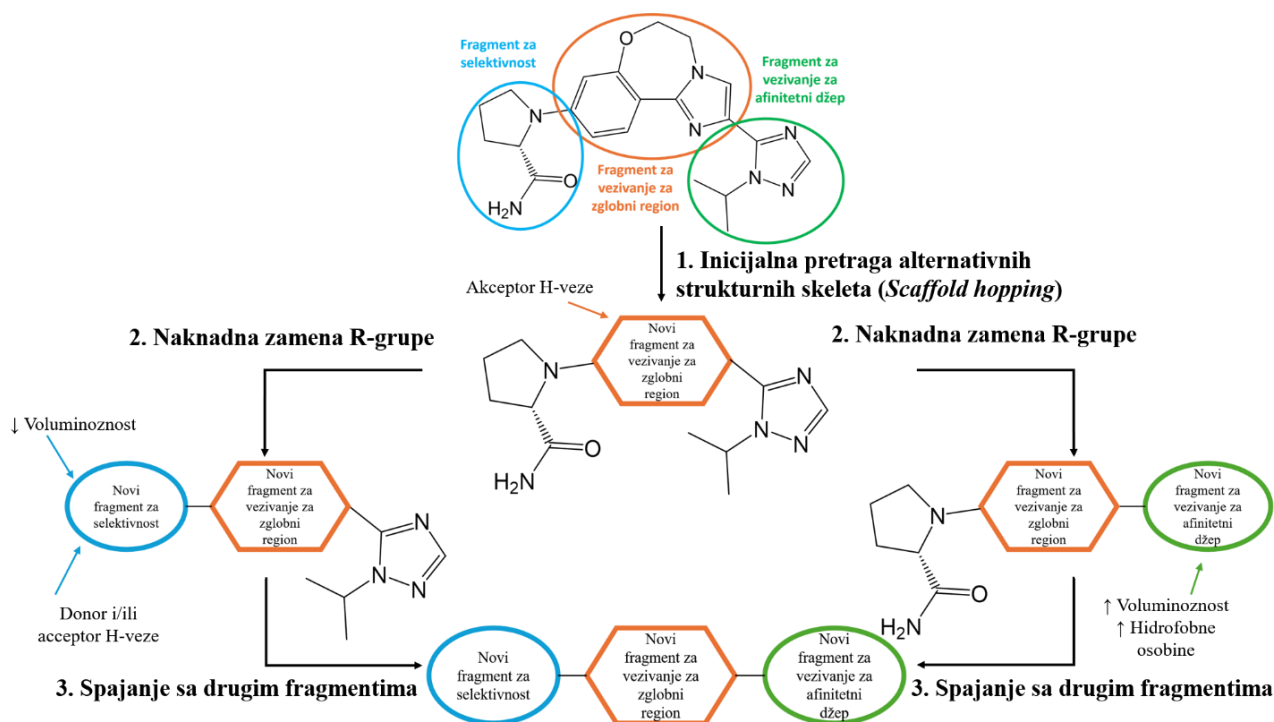
4.3.6. Dizajn novih selektivnih PI3K α inhibitora

Prethodne 3D-QSAR i doking analize ukazale su na nekoliko strukturnih karakteristika koje su važne za dizajn selektivnih PI3K α inhibitora. Pre svega, potvrđen je značaj akceptora vodonične veze u delu molekula koji se vezuje za zglobni region. Pored toga, kao povoljan pravac za razvoj PI3K α -selektivnih jedinjenja izdvojeno je očuvanje ili povećanje hidrofobnih i sternih karakteristika dela koji se vezuje u afinitetni džep. Još jedan važan element dizajna predstavlja modifikator selektivnosti, koji treba da sadrži funkcionalnu grupu sposobnu za formiranje vodonične veze sa nekonzerviranom aminokiselinom, uz istovremeno smanjenje voluminoznosti ove supstrukture. Na osnovu ovih smernica je primenjena strategija zamene osnovnog strukturnog skeleta, odnosno *scaffold hopping*, radi pronalaženja novih hemijskih entiteta pogodnih za dizajn potencijalnih PI3K α inhibitora. Tokom ovog procesa su korišćena specifična ograničenja, kako bi izbor novih supstrukture bio usmeren ka željenom profilu aktivnosti i selektivnosti.

Kao šablon za dizajn novih, potencijalno selektivnih PI3K α inhibitora je odabrano reprezentativno jedinjenje iz benzoksazepinskog klastera. Konkretno, jedinjenje **B1** (Slika 4.37), koje je u skupu

podataka identifikovano kao najaktivnije jedinjenje i koje je dokovano u centroidnu konformaciju α Bz2 PI3K α (Tabela 4.10), korišćeno je kao početna struktura za *scaffold hopping* pristup. Iako su u prethodnim analizama bili obuhvaćeni i benzoksazepinski i tiazolni derivati, predstavnik Thz klastera, jedinjenje **T1**, nije izabran kao šablon. Razlog za to je njegova niža aktivnost prema PI3K α ($pK_i = 8,30$) u poređenju sa jedinjenjem **B1** ($pK_i = 10,52$). Dodatno, rezultati MD simulacija pokazali su da tiazolni derivat ostvaruje manje stabilnu interakciju sa α Gln859, ostatkom koji je važan za selektivnost prema PI3K α izoformi. Nasuprot tome, benzoksazepinski derivat je pokazao stabilnije i povoljnije interakcije u vezivnom džepu, posebno sa ostacima povezanim sa izoformno specifičnim vezivanjem, uključujući α Gln859. Zbog toga je **B1** predstavljao pogodniji šablon za usmereni dizajn selektivnih inhibitora.

Na osnovu položaja i interakcija u vezivnom mestu, struktura jedinjenja **B1** je podeljena na tri prethodno definisane komponente: deo koji se vezuje za zglobni region, deo koji se vezuje u afinitetni džep i modifikator selektivnosti. Dizajn novih inhibitora je zatim sproveden kroz tri koraka. U prvom koraku je primenjen *scaffold hopping* dela koji se vezuje za zglobni region. U drugom koraku je izvedena zamena R-grupa dela koji se vezuje u afinitetni džep i modifikatora selektivnosti. U završnom koraku su identifikovani delovi molekula međusobno kombinovani radi formiranja novih struktura (Slika 4.38).



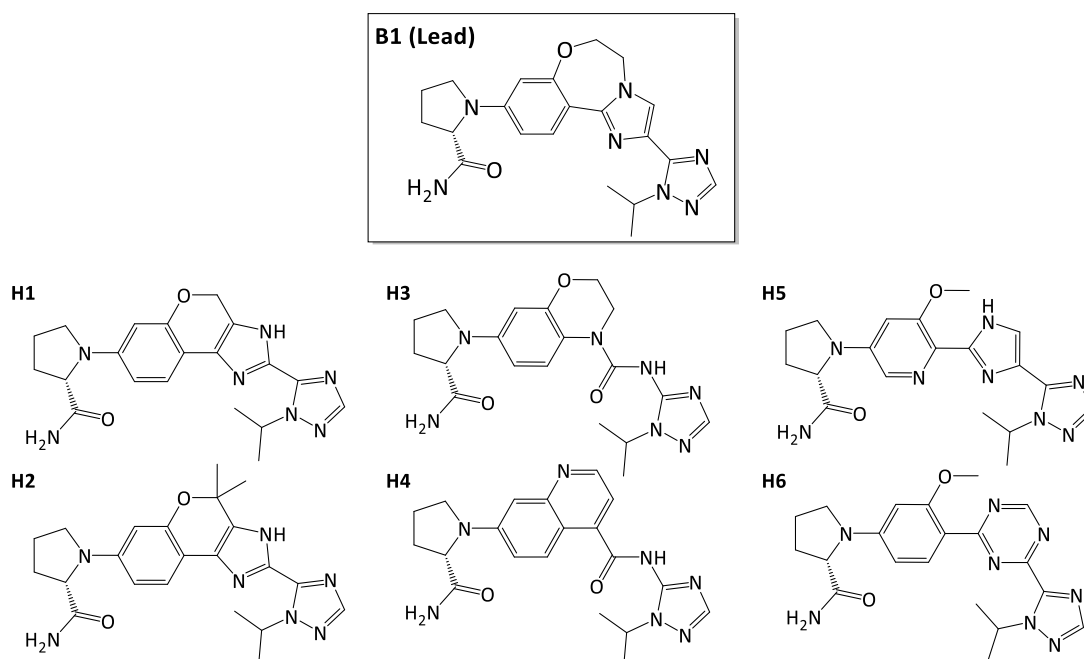
Slika 4.38. Šablonska struktura i delovi strukture podvrgnuti *scaffold hopping* pristupu i zameni R-grupa.

Prvi korak obuhvatao je pretragu novih skeleta za fragment koji se vezuje za zglobni region. Tokom ove pretrage su postavljena ograničenja polja, prema kojima novi skelet treba da interaguje sa poljem na približno istoj prostornoj lokaciji kao i početni fragment. Pored toga, primenjena su i farmakoforna ograničenja, odnosno zahtev da novi skelet poseduje slične osobine akceptora vodonične veze. Na taj način je pretraga bila usmerena ka delovima molekula koji mogu efikasno da ostvare interakciju sa α Val851 u zglobnom regionu.

Početna pretraga skeleta dala je niz novih struktura koje su zatim uključene u ostatak molekula. Jedinjenja koja su sadržala prvih 50 najbolje rangiranih fragmentata koji se vezuju za zglobni region su pripremljena i podvrgnuta proceduri ansambl dokinga u sve četiri PI3K izoforme. Za skelete koji

su nakon dokinga zadržavali vodoničnu vezu sa α Val851, dodatno je sprovedeno predviđanje aktivnosti pomoću prethodno razvijenih 3D-QSAR modela, kako bi se procenile njihova aktivnost i potencijalna selektivnost.

Novodizajnirana jedinjenja su analizirana na osnovu interakcija u aktivnom mestu i upoređena sa vodećim jedinjenjem **B1**, koje je služilo kao pozitivna kontrola. Nakon dokinga je utvrđeno da 24 jedinjenja zadržavaju vodoničnu vezu sa α Val851, kao i vodoničnu vezu sa α Gln859, koja je značajna za selektivnost prema α izoformi. Dodatna predikcija aktivnosti primenom razvijenih 3D-QSAR modela pokazala je da 6 od ovih jedinjenja (Slika 4.39) ispoljava PI3K α selektivnost, sa najmanje desetostrukom razlikom u aktivnosti (Tabela 4.18). Odabrani skeleti mogu se svrstati u derivate hromeno[3,4-d]imidazola (**H1** i **H2**), 2H-benzo[b][1,4]oksazina (**H3**), hinolina (**H4**), 3-metoksipiridina (**H5**) i anizola (**H6**).



Slika 4.39. Strukture dizajniranih jedinjenja sa novoodabranim skeletima za vezivanje u zglobnom regionu.

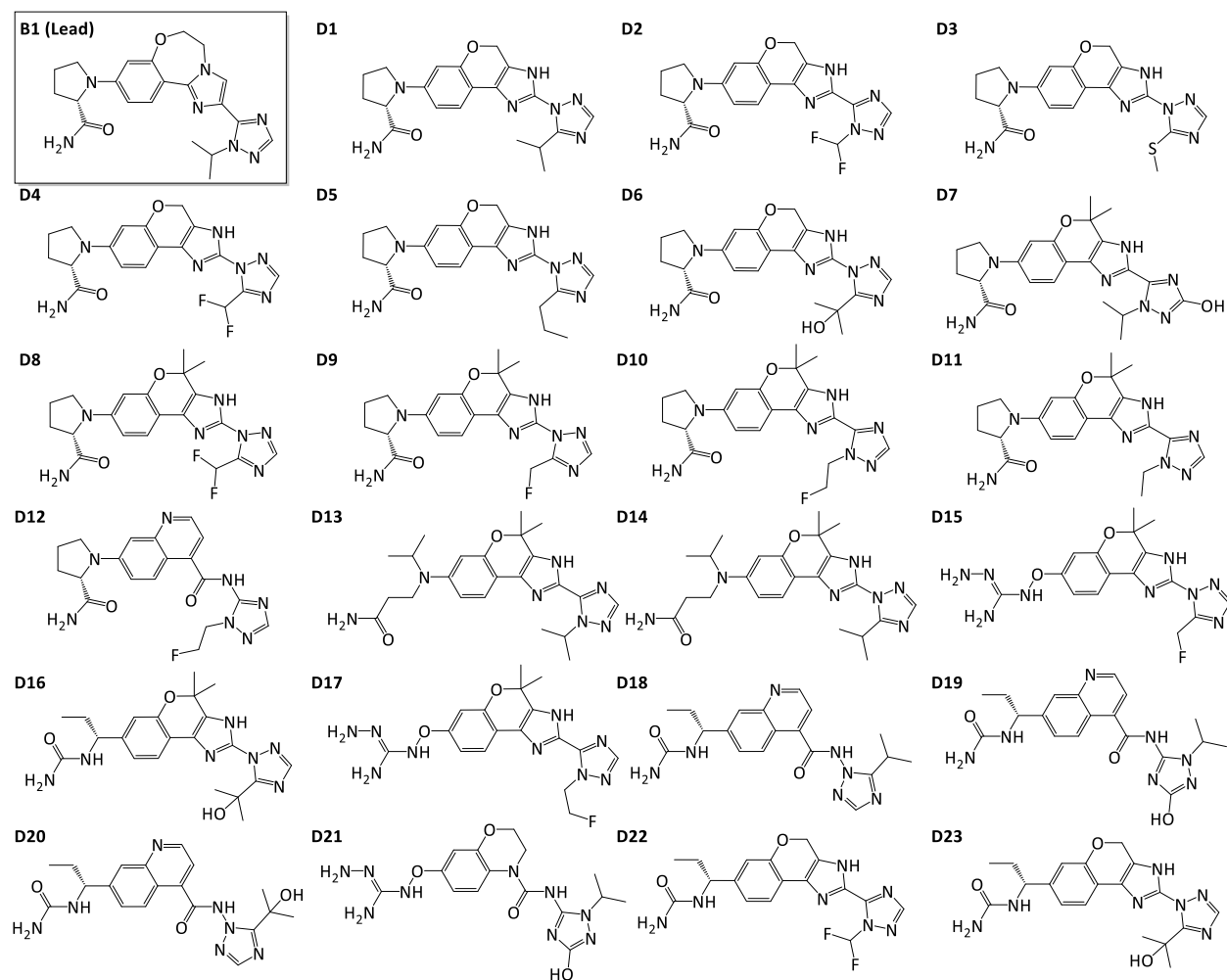
Tabela 4.18. Predviđene pK_i vrednosti za dizajnirana jedinjenja sa novoodabranim skeletima za vezivanje u zglobnom regionu.

Jedinjenje	Predviđene pK _i vrednosti			
	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
B1 (Vodeće jedinjenje)	10,523	8,253	8,697	9,654
H1	10,038	6,984	6,659	8,776
H2	9,644	7,045	6,958	7,791
H3	9,522	6,235	7,499	8,295
H4	9,527	6,921	7,123	7,554
D5	9,980	7,026	7,530	8,075

Nakon identifikacije odgovarajućih fragmenata koji se vezuju za zglobni region je sprovedena zamena R-grupa, sa ciljem pronalaženja novih delova pogodnih za vezivanje u afinitetni džep i novih modifikatora selektivnosti. Za modifikator selektivnosti su postavljena ograničenja polja, kao i farmakoforna ograničenja za donore i akceptore vodoničnih veza. Time je pretraga bila usmerena ka delovima molekula koji mogu da se vezuju za α Gln859 i na taj način očuvaju ili poboljšaju selektivnost novodizajniranih jedinjenja. Među dobijenim fragmentima su kao najpovoljniji izdvojeni oni koji su pokazivali prethodno definisane karakteristike za selektivnu inhibiciju: formiranje

ograničene vodonične veze, smanjenu voluminoznost modifikatora selektivnosti i povećanu voluminoznost i hidrofobnost dela koji se vezuje u afinitetni džep. Ovakav ishod podržava *scaffold hopping* pristup kao primenljiv način za identifikaciju novih hemijskih klasa inhibitora sa očuvanim ili poboljšanim karakteristikama selektivnosti.

Dvadeset najbolje rangiranih delova za vezivanje u afinitetni džep i modifikatora selektivnosti je kombinovano sa šest odabranih fragmenata koji se vezuju za zglobni region, a zatim su ovi fragmenti međusobno kombinovani radi formiranja novih jedinjenja (Slika 4.38). Dobijena jedinjenja su zatim podvrgnuta ansambl dokingu. Na osnovu povoljnih interakcija formiranih u aktivnom mestu PI3K α i predviđenih aktivnosti, 23 dizajnirana jedinjenja su odabrana kao reprezentativni potencijalni selektivni PI3K α inhibitori (Slika 4.40, Tabela 4.19).



Slika 4.40. Strukture dizajniranih jedinjenja sa novim vezujućim fragmentima za džep afiniteta i modifikatorima selektivnosti.

Konačni izbor delova za vezivanje u afinitetni džep obuhvatao je različite derivate 1,2,4-triazola, povezane sa fragmentom koji se vezuje za zglobni region na položaju 1' ili 2' (Slika 4.40). Izabrani supstituenti imali su slične ili izraženije voluminozne osobine, kako bi se pojačale sterne karakteristike opisane 3D-QSAR modelima i na taj način podržala aktivnost prema PI3K α . Ovi supstituenti, zajedno sa 1,2,4-triazolskim prstenom, ostvarivali su brojne hidrofobne kontakte unutar afinitetnog džepa aktivnog mesta enzima (Tabela 4.19).

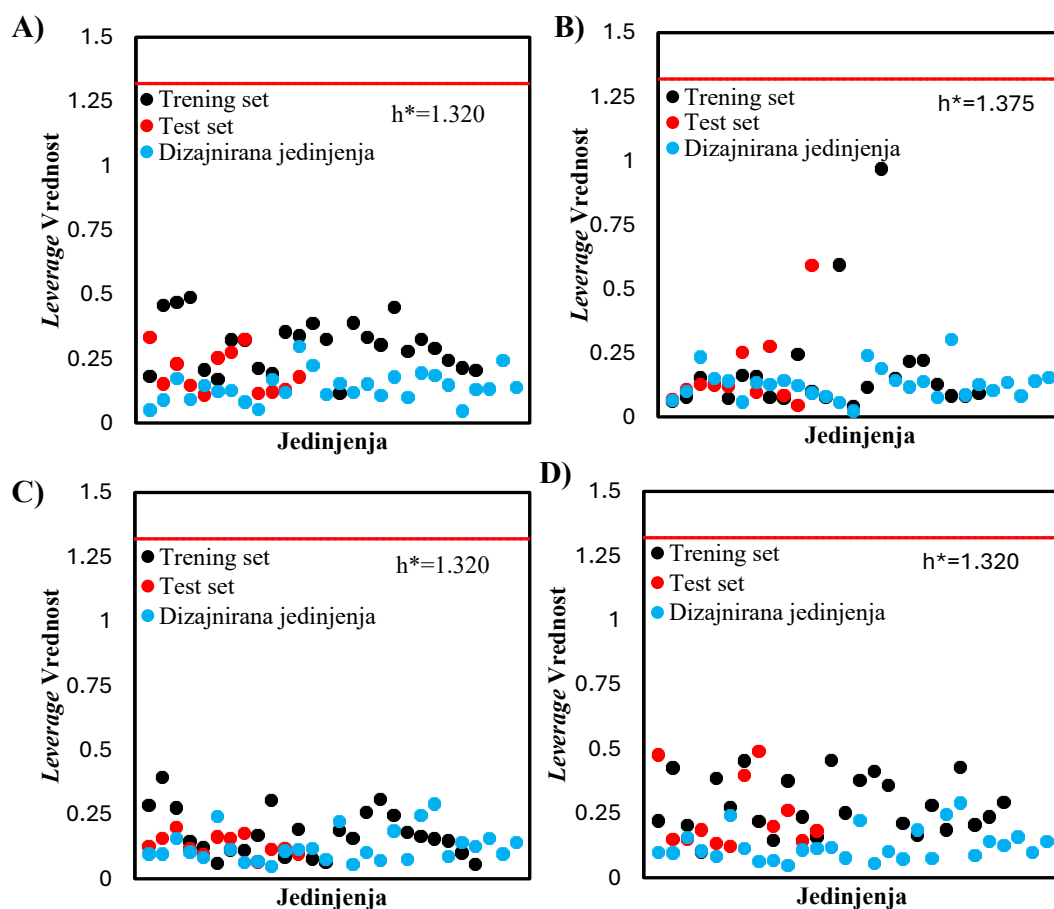
Tabela 4.19. 3D-QSAR predviđene pKi vrednosti, odabrani PI3K centroidi i ključne interakcije u vezivnom mestu za dizajnirana jedinjenja sa novim vezujućim fragmentima za džep afiniteta i modifikatorima selektivnosti; aminokiseline koje formiraju vodonične veze istaknute su podebljanim slovima.

Oznaka jedinjenja	3D-QSAR predviđene pKi vrednosti				Interakcije u vezivnom mestu			
	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
B1 (vodeće jedinjenje)	10,523	8,253	8,697	9,654	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo4: Lys775 , Trp787 , <i>Glu</i> 852, <i>Val</i> 853, Val854	γ Bzo3: <i>Tyr</i> 867, <i>Ile</i> 879, <i>Glu</i> 880, <i>Ile</i> 881, Val882 , <i>Met</i> 953	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, <i>Asp</i> 787, Lys779 , <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D1	10,038	6,984	6,659	8,776	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo3: Lys775 , Trp787 , <i>Glu</i> 852, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo2: Tyr867 , <i>Ile</i> 879, <i>Glu</i> 880, <i>Ile</i> 881, Val882 , <i>Met</i> 953	δ Bzo5: <i>Trp</i> 760, <i>Asp</i> 787, Tyr813 , <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D2	9,644	7,045	6,958	7,791	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, Tyr836 , <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo4: Lys775 , Trp787 , <i>Ile</i> 803, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo2: <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, Lys833 , Tyr836 , <i>Asp</i> 841, <i>Ile</i> 879, <i>Glu</i> 880, <i>Ile</i> 881, Val882 , <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, <i>Asp</i> 787, Tyr813 , <i>Asp</i> 823, <i>Ile</i> 825, <i>Val</i> 827, Val828 , Ser831 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D3	9,522	6,235	7,499	8,295	α Bzo2: Tyr836 , <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo4: Lys775 , Trp787 , <i>Ile</i> 803, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo2: <i>Trp</i> 812, <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, Tyr867 , <i>Ile</i> 879, Val882 , <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, Tyr813 , <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Ser</i> 831, <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D4	9,527	6,921	7,123	7,554	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, Tyr836 , <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo3: Lys775 , Trp787 , <i>Glu</i> 852, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo2: <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, Lys833 , Tyr867 , <i>Glu</i> 880, <i>Ile</i> 881, Val882 , Met 953, <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, <i>Asp</i> 787, Tyr813 , <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Ser</i> 831, <i>Asp</i> 832, Thr833 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D5	9,980	7,026	7,530	8,075	α Bzo2: <i>Met</i> 772, <i>Ile</i> 800, Tyr836 , <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo3: <i>Trp</i> 787, <i>Ile</i> 803, <i>Glu</i> 852, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo2: <i>Trp</i> 812, <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, <i>Asp</i> 841, Tyr867 , <i>Ile</i> 879, <i>Glu</i> 880, <i>Ile</i> 881, Val882 , <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, Tyr813 , <i>Ile</i> 825, Val828 , Thr833 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D6	9,195	7,057	6,579	7,640	α Bzo2: <i>Met</i> 772, <i>Ile</i> 800, Tyr836 , <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo4: Lys775 , <i>Met</i> 779, Trp787 , <i>Ile</i> 803, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo2: <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, Lys833 , <i>Asp</i> 841, Tyr867 , <i>Ile</i> 879, <i>Glu</i> 880, <i>Ile</i> 881, Val882 , <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, <i>Ile</i> 825, <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D7	9,286	7,395	7,154	8,047	α Bzo2: <i>Met</i> 772, <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo1: Trp787 , <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo3: <i>Trp</i> 812, Tyr867 , <i>Ile</i> 879, Val882 , <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: Tyr813 , <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D8	9,356	7,043	6,057	7,884	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, <i>Asp</i> 810, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo4: Lys775 , Trp787 , <i>Glu</i> 852, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo3: <i>Trp</i> 812, <i>Asp</i> 841, Tyr867 , <i>Ile</i> 879, Val882 , Met 953, <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: Lys779 , <i>Asp</i> 787, <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D9	9,272	7,260	6,548	8,067	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922, Asp933	β Bzo1: Lys775 , <i>Trp</i> 787, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo3: <i>Trp</i> 812, Tyr867 , <i>Ile</i> 879, Val882 , <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, Lys779 , <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D10	9,009	7,197	7,279	7,351	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo3: Lys775 , Trp787 , <i>Glu</i> 852, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo2: <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, <i>Ile</i> 879, Val882 , <i>Ile</i> 963	δ Bzo5: <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D11	9,350	7,216	7,573	7,944	α Bzo2: <i>Met</i> 772, <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo1: Lys775 , Trp787 , <i>Glu</i> 852, <i>Val</i> 853, <i>Val</i> 854, <i>Met</i> 926	γ Bzo3: <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, Tyr867 , <i>Ile</i> 879, Val882 , Met 953, <i>Ile</i> 963	δ Bzo5: <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D12	8,655	7,107	6,504	7,371	α Bzo2: <i>Met</i> 772, <i>Ile</i> 800, Tyr836 , <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo5: <i>Met</i> 779, <i>Ile</i> 803, <i>Glu</i> 852, <i>Val</i> 853, Val854 , Ser857 , Glu858	γ Bzo5: <i>Ile</i> 831, <i>Ile</i> 879, Val882 , <i>Met</i> 953, <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: Lys779 , <i>Asp</i> 787, Tyr813 , <i>Ile</i> 825, <i>Glu</i> 826, Asp897 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D13	10,377	6,588	7,537	8,897	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, Tyr836 , <i>Ile</i> 848, Val851 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo3: Lys775 , Trp787 , <i>Ile</i> 803, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo3: <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, Tyr867 , <i>Ile</i> 879, Val882 , Asp884 , Ala885 , <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, <i>Ile</i> 825, Val828 , Asp832 , Thr833 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D14	9,484	6,448	7,308	8,173	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo4: Lys777 , <i>Met</i> 779, Trp787 , <i>Ile</i> 803, <i>Val</i> 853, Val854	γ Bzo3: <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, Tyr867 , <i>Ile</i> 879, Val882 , Asp884 , Ala885 , <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, Lys779 , <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D15	8,033	6,693	4,944	6,439	α Bzo2: <i>Asp</i> 810, Tyr836 , <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo4: Trp787 , <i>Ile</i> 803, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo2: <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, Lys833 , <i>Ile</i> 879, <i>Ile</i> 881, Val882 , Ala885	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, Lys779 , <i>Ile</i> 825, Val828 , Ser831 , Asp832 , <i>Ile</i> 910
D16	8,317	6,660	5,918	7,051	α Bzo2: <i>Met</i> 772, <i>Pro</i> 778, <i>Ile</i> 800, <i>Asp</i> 810, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922, Asp933	β Bzo4: Lys777 , <i>Met</i> 779, <i>Trp</i> 787, <i>Ile</i> 803, <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo2: <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, Lys833 , <i>Ile</i> 879, Val882 , Ala885 , <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, <i>Ile</i> 825, Val828 , Asp832 , Tyr836 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D17	8,200	6,290	5,300	6,983	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, <i>Asp</i> 810, Tyr836 , <i>Ile</i> 848, <i>Val</i> 850, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo3: Lys775 , Trp787 , <i>Val</i> 853, Val854 , <i>Met</i> 926	γ Bzo3: <i>Trp</i> 812, <i>Asp</i> 841, Tyr867 , <i>Ile</i> 879, Val882 , Ala885 , <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, Lys779 , <i>Ile</i> 825, Val828 , Asp832 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
D18	8,271	6,920	6,145	7,152	α Bzo2: <i>Met</i> 772, <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo5: <i>Met</i> 779, <i>Ile</i> 803, <i>Glu</i> 852, Val854 , Thr856 , Ser857 , <i>Met</i> 926	γ Bzo4: <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, Lys833 , <i>Ile</i> 879, Val882 , <i>Ile</i> 963, <i>Asp</i> 964	δ Bzo1: Lys779 , Tyr813 , <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910, <i>Ile</i> 910
D19	8,112	6,896	5,072	6,762	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo3: <i>Met</i> 779, <i>Trp</i> 787, <i>Ile</i> 803, <i>Val</i> 853, Val854 , Ser857 , Glu858	γ Bzo4: <i>Trp</i> 812, <i>Ile</i> 831, Lys833 , <i>Ile</i> 879, Val882 , Ala885 , <i>Met</i> 953, <i>Ile</i> 963, Asp964	δ Bzo1: Lys779 , <i>Asp</i> 787, Tyr813 , <i>Ile</i> 825, <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910

Oznaka jedinjenja	3D-QSAR predviđene pKi vrednosti				Interakcije u vezivnom mestu			
D20	7,699	6,099	5,004	6,382	α Bzo2: Met772, Ile848, Val851, Ser854, Gln859, Met922, Asp933	β Bzo3: Lys739, Met779, Trp787, Val853, Glu858	γ Bzo4: Ile831, Lys833, Ile879, Val882, Met953, Ile963, Asp964	δ Bzo1: Lys779, Tyr813, Ile825, Met900, Ile910
D21	8,140	6,581	5,711	6,898	α Bzo2: Met772, Ile848, Val850, Val851, Ser854, Gln859	β Bzo3: Met779, Val853, Val854, Ser857, Met926	γ Bzo3: Ile879, Glu880, Val882, Lys883, Asp885, Met953, Ile963	δ Bzo1: Trp760, Ile825, Val828, Ser831, Met900, Ile910
D22	8,143	6,655	5,822	6,968	α Bzo2: Met772, Trp780, Ile800, Ile848, Glu849, Val850, Val851, Ser854, Met922	β Bzo3: Trp787, Glu852, Val853, Val854, Met926	γ Bzo5: Ile879, Glu880, Val882, Ala885, Met953, Ile963	δ Bzo1: Trp760, Ile825, Val828, Ile910
D23	8,621	6,738	5,233	7,011	α Bzo2: Met772, Pro778, Ile800, Ile848, Val850, Val851, Ser854, Gln859, Met922	β Bzo3: Met779, Trp787, Ile803, Glu852, Val853, Val854, Met926	γ Bzo3: Trp812, Ile831, Tyr867, Ile879, Glu880, Val882, Ala885, Ile963	δ Bzo1: Trp760, Lys779, Ile825, Val828, Met900, Ile910

Kao povoljni modifikatori selektivnosti izdvojene su tri grupe fragmenata koje su pokazale odgovarajuće doking poze i bile potvrđene 3D-QSAR predviđenim aktivnostima. Ovi modifikatori obuhvatali su derivate amida (D13 i D14), uree (D16, D18, D19, D20, D22 i D23) i karbonohidrazon-diamida (D15, D17 i D21) (Slika 4.40). Svako od ovih jedinjenja formiralo je najmanje jednu vodoničnu vezu sa α Gln859, čime je dodatno podržana njihova potencijalna selektivnost prema PI3K α izoformi (Tabela 4.19).

Za sva dizajnirana jedinjenja je provereno da li se nalaze unutar prethodno definisanog domena primenljivosti razvijenih modela (Slika 4.41). Predviđene pKi vrednosti novodizajniranih PI3K inhibitora ukazale su na izraženiji afinitet prema PI3K α izoformi, što je bilo u skladu sa osnovnim ciljem dizajna, odnosno postizanjem izoformne selektivnosti. Većina jedinjenja je pokazala visoke predviđene afinitete prema PI3K α , pri čemu su pojedina jedinjenja dostigla pKi vrednosti iznad 9,5, što ukazuje na potencijalnu nanomolarnu potentnost. Kao najpotentniji kandidati izdvojila su se jedinjenja D13, D1, D5, D2, D4 i D3.



Slika 4.41. *Williams-ovi grafici, sa definisanim domenima primenljivosti, za dizajnirana jedinjenja u okviru 3D-QSAR modela PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ .*

Poređenje predviđenih afiniteta između izoformi dodatno je pokazalo da veliki broj dizajniranih jedinjenja ispoljava značajnu selektivnost prema PI3K α . Na primer, jedinjenje **D13** je pokazalo veliki prozor selektivnosti u odnosu na PI3K β ($\Delta pK_i \approx 3,8$), dok je jedinjenje **D1** bilo izrazito selektivno u odnosu na PI3K γ i PI3K β . Povoljan profil selektivnosti pokazala su i jedinjenja **D3**, **D8** i **D14**, kod kojih su ΔpK_i vrednosti često bile veće od 2 u odnosu na najbližu *off-target* izoformu. Dodatna jedinjenja, uključujući **D6**, **D7**, **D9** i **D11**, takođe su zadržala dobar predviđeni afinitet prema PI3K α , ali sa umerenijim razlikama u selektivnosti u poređenju sa najboljim kandidatima. Zbog toga se ova jedinjenja mogu posmatrati kao obećavajući derivati, ali i kao strukture koje bi mogle zahtevati dalju optimizaciju radi smanjenja preostale aktivnosti prema PI3K β ili PI3K δ izoformama.

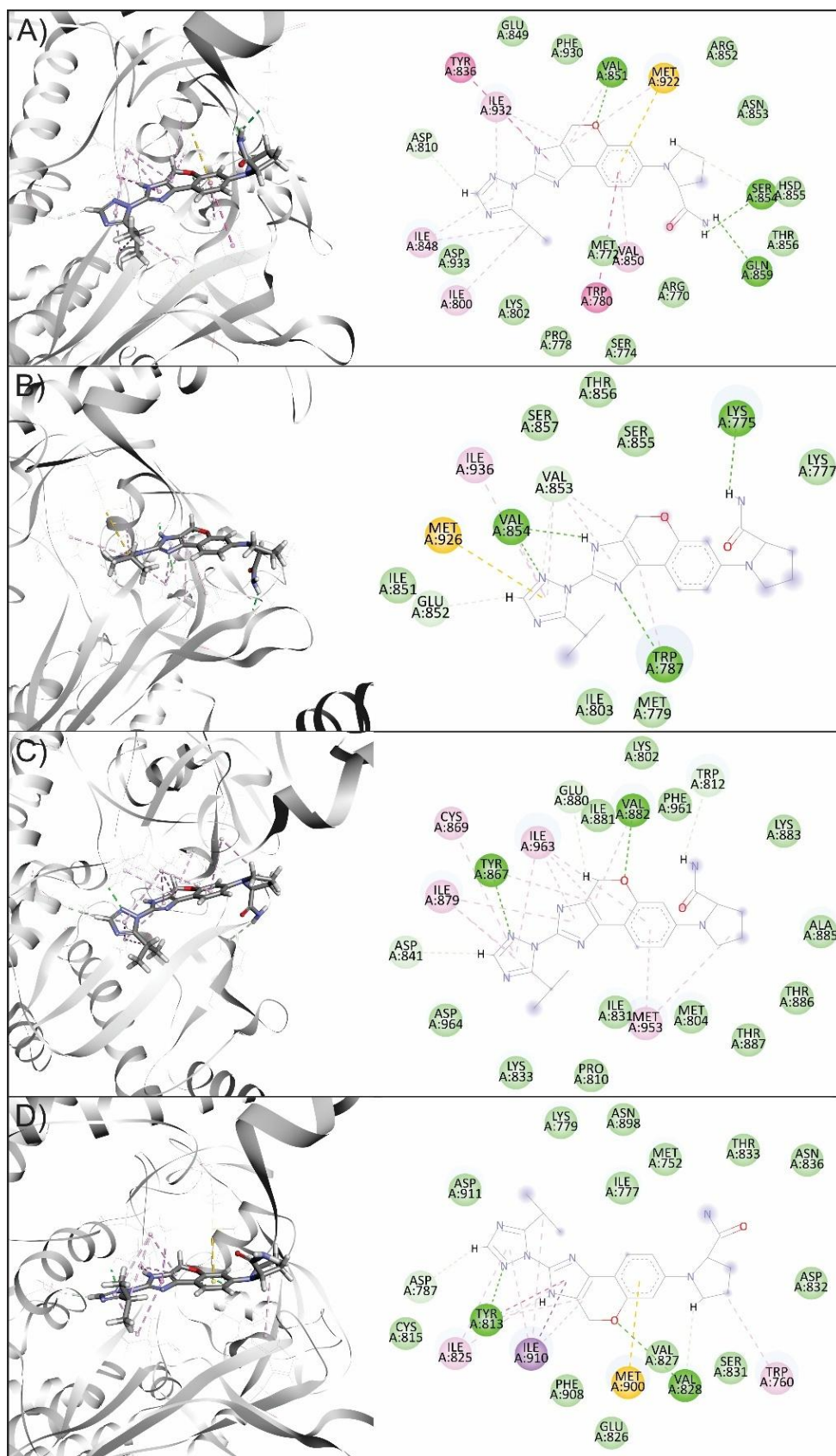
Jedinjenja iz serije **D15–D22** zadržala su profile selektivnosti uz umerene predviđene afinitete, što ukazuje na njihov potencijal za dalju optimizaciju u pravcu PI3K α inhibitora. Jedinjenje **D23** je pokazalo umerenu aktivnost i izraženu selektivnost u odnosu na ostale izoforme, pri čemu je najmanja razlika iznosila $\Delta pK_i \approx 1,6$ u odnosu na PI3K δ . Nasuprot tome, pojedina jedinjenja, uključujući **D10** i **D11**, imala su uravnoteženije afinitete prema svim izoformama, što može ukazivati na veći rizik od *off-target* aktivnosti. Sveukupno, jedinjenja **D1**, **D2**, **D3**, **D4**, **D5**, **D13** i **D23** mogu se izdvojiti kao najperspektivnije vodeće strukture za dalju optimizaciju.

Jedinjenje **D1**, koje pripada grupi jedinjenja sa najvišim predviđenim aktivnostima prema PI3K α , formiralo je tri vodonične veze i brojne hidrofobne interakcije u aktivnom mestu ove izoforme (Slika 4.42A). Kiseonik fragmenta koji se vezuje za zglobni region, 3,4-dihidrohromeno[3,4-d]imidazola, delovao je kao akceptor vodonične veze u interakciji sa $\alpha Val851$. Deo koji se vezuje u afinitetni džep, odnosno triazolski prsten i susedna izopropil grupa, formirao je ugljenik-vodoničnu vezu sa $\alpha Asp810$, kao i brojne hidrofobne interakcije sa $\alpha Met772$, $\alpha Pro778$, $\alpha Ile800$, $\alpha Lys802$, $\alpha Ile848$ i $\alpha Met922$. Ovakav obrazac vezivanja je u skladu sa 3D-QSAR rezultatima, koji ukazuju na značaj hidrofobnog dela molekula (*var15*, *var291*, *var397*) i njegovog voluminoznog supstituenta (*var397*). Amidna grupa povezana sa pirolidinskim prstenom formirala je dve vodonične veze, sa $\alpha Gln859$ i $\alpha Ser854$.

Pri vezivanju za β izoformu (Slika 4.42B), **D1** je pokazalo sličan način vezivanja kao vodeće jedinjenje, pri čemu se za $\beta Val854$ u zglobnom regionu vezuje preko imidazolskog prstena. Zbog takvog položaja jedinjenje ne doseže u potpunosti afinitetni džep i formira manji broj hidrofobnih kontakata, uključujući interakcije sa $\beta Glu852$, $\beta Val853$, $\beta Met926$ i $\beta Ile936$. Ovakav način vezivanja može objasniti nisku predviđenu aktivnost **D1** prema PI3K β . Amidna grupa se vezivala za $\beta Lys775$, ali nije ostvarivala interakciju sa $\beta Asp862$, analogom $\alpha Gln859$.

U PI3K γ izoformi (Slika 4.42C), kiseonik hromenskog dela **D1** formirao je vodoničnu vezu sa $\gamma Val882$, uz hidrofobne kontakte sa $\gamma Val882$, $\gamma Met953$ i $\gamma Ile963$. Triazolski prsten je takođe ostvarivao interakcije sa $\gamma Ile963$, a dublje u afinitetnom džepu i sa $\gamma Tyr867$, $\gamma Cys869$ i $\gamma Ile879$. Amidna grupa u ovoj izoformi nije formirala vodonične veze.

U PI3K δ izoformi (Slika 4.42D), kiseonik hromenskog dela formirao je vodoničnu vezu sa $\delta Val828$ u zglobnom regionu. Azot triazolskog prstena na položaju 2' formirao je vodoničnu vezu sa $\delta Tyr813$, dok su triazolski prsten i izopropil grupa ostvarivali hidrofobne alkil-hidrofobne kontakte sa $\delta Ile910$, $\delta Tyr813$ i $\delta Ile825$. Pirolidinski prsten je ostvarivao interakciju sa $\delta Trp760$. Suboptimalni načini vezivanja **D1** u PI3K β i PI3K γ izoformama mogu objasniti njegove niže predviđene aktivnosti dobijene 3D-QSAR analizom.



Slika 4.42. 3D (levo) i 2D (desno) prikaz bioaktivnih konformacija **D1** i interakcija sa A) PI3K α , B) PI3K β , C) PI3K γ i D) PI3K δ izoformama; tamnozeleno – konvencionalne vodonične veze, svetlozeleno – ugljenik-vodonične veze, srednje zeleno – *van der Waals*-ove interakcije, ljubičasto – T-oblikovane π - π interakcije, roze – alkil i π -alkil interakcije, narandžasto – π -sumpor interakcije.

Jedinjenje **D19**, koje je pokazalo slabiji učinak u odnosu na ostala dizajnirana jedinjenja, ima nižu predviđenu PI3K α aktivnost, ali je zadržalo selektivnost u odnosu na druge izoforme. U aktivnom mestu PI3K α , azot hinolinskog fragmenta koji se vezuje za zglobni region formira vodoničnu vezu sa α Val851. Uočena je i ugljenik-vodonična veza sa α Val850. Hinolinski prsten dodatno formira T-oblikovanu π - π interakciju sa α Trp780 i više hidrofobnih interakcija sa različitim aminokiselinama, uključujući α Ile800, α Met922 i α Ile932. Deo koji se vezuje u afinitetni džep formira alkil-interakciju sa α Ile848, što je u skladu sa nižom predviđenom aktivnošću prema α izoformi. Urea formira dve vodonične veze sa α Ser854 i jednu sa α Gln859.

U kompleksu sa PI3K β , azot hinolinskog prstena se vezuje za zglobni region vodoničnom vezom sa β Val854, ugljenik-vodoničnom vezom sa β Trp787 i π -alkil interakcijom sa β Val853. Triazolski prsten formira dva hidrofobna kontakta sa β Met779 i β Ile803, dok se izopropil grupa vezuje za β Ile936. Urea formira dve vodonične veze sa β Ser857 i jednu sa β Glu857.

Kada je jedinjenje **D19** vezano za γ izoformu, hinolinski prstem vezuje za γ Val882 samo preko π -alkil interakcije, dok urea formira vodoničnu vezu sa istim ostatkom. Dodatni hidrofobni kontakti fragmenta koji se vezuje za zglobni region ostvaruje se sa γ Ile963, γ Tyr867 i γ Met953. Urea takođe formira vodoničnu vezu sa γ Ala885. Azot triazola na položaju 3' i kiseonik hidroksilne grupe formiraju dve vodonične veze, dok vodonik hidroksilne grupe formira vodoničnu vezu sa γ Asp964. Triazolski prsten dodatno ostvaruje π -alkil interakciju sa γ Ile879, dok je izopropil grupa formira dve alkil-hidrofobne interakcije sa γ Ile831 i γ Ile879. Narušen način vezivanja u aktivnom mestu PI3K γ odgovara veoma niskoj predviđenoj aktivnosti **D19** prema ovoj izoformi.

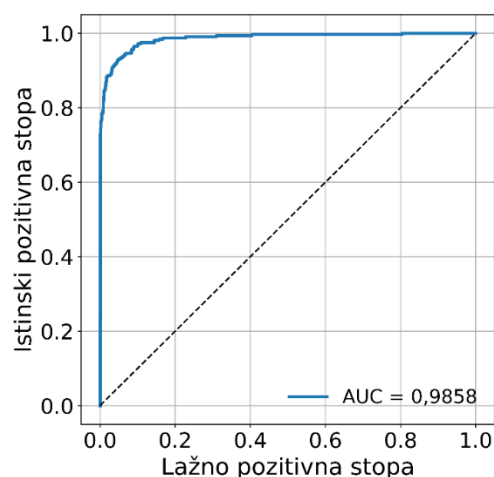
Kompleks PI3K δ -D19 sadrži jednu konvencionalnu vodoničnu vezu i jednu ugljenik-vodoničnu vezu sa δ Val828 u zglobnom regionu. T-oblikovana π - π interakcija formira se između piridinskog prstena i δ Met900, dok ostali hidrofobni kontakti uključuju interakcije sa δ Lys833, δ Val827 i δ Ile910. Etil grupa formira četiri alkil-hidrofobna kontakta sa δ Tyr813, δ Ile825, δ Val828 i δ Ile910. Aminokiselina δ Trp760 dodatno formira jednu T-oblikovanu π - π interakciju sa triazolskim prstenom i alkil-interakciju sa izopropil grupom.

4.3.7. Strukturno zasnovani virtuelni skrining

Radi identifikacije novih kinaznih inhibitora sa aktivnošću i potencijalnom selektivnošću prema PI3K α , primenjen je SBVS metod korišćenjem LDA-zasnovanog protokola. Virtuelni skrining je u ovoj studiji korišćen kao strategija za ispitivanje šireg hemijskog prostora i identifikaciju novih PI3K α inhibitora. Budući da se tradicionalni pristupi otkrivanju lekova često zasnivaju na ograničenim regionima hemijskog prostora definisanim poznatim aktivnim jedinjenjima, njihova primena može ograničiti pronalaženje strukturno novih i potencijalno efikasnijih inhibitora. Zbog toga je pretraga velikih i raznovrsnih biblioteka jedinjenja primenjena sa ciljem proširenja hemijskog prostora dostupnog za identifikaciju potencijalno aktivnih PI3K α inhibitora.

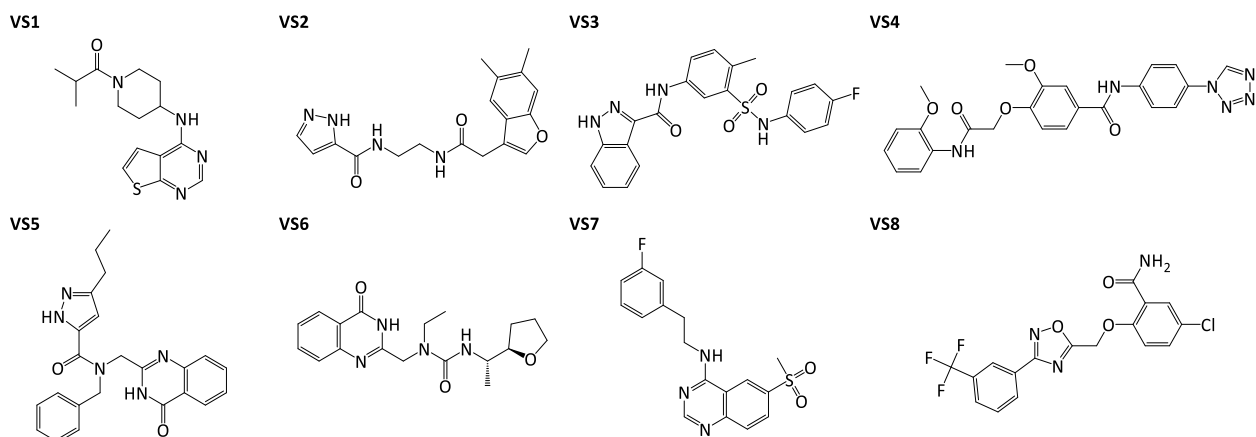
Ovakav pristup je omogućio razmatranje novih molekulskih struktura i farmakofornih karakteristika koje nisu zastupljene u trenutno poznatim PI3K α inhibitorima, čime se povećava mogućnost identifikacije jedinstvenih i potentnih hemijskih klasa jedinjenja. U nastavku su prikazani rezultati virtuelnog skrininga, uključujući prioritizaciju najbolje rangiranih hitova i analizu njihovih predviđenih interakcija sa vezivnim mestom PI3K α .

U SBVS proceduri je korišćena konačna baza od 318 aktivnih i 2178 neaktivnih jedinjenja. Kao šabloni za SBVS protokol su izabrana tri centroida dobijena iz MD simulacija: α Bzo1, α Thz2 i α Thz4 (Tabela 4.20). U LDA modelu su korišćeni H i DRY-O skorovi. Ukupna AUC vrednost iznosila je 0,99, dok su faktori obogaćenja pri 0,5%, 1%, 2% i 5% iznosili 0,78, 0,83, 0,89 i 0,93, redom (Slika 4.43).



Slika 4.43. ROC kriva LDA-SBVS modela.

Razvijeni model je zatim primenjen za skrining Enamine biblioteke inhibitora kinaza. Trideset jedinjenja sa najvišom predviđenom aktivnošću je podvrgnuto ansambl dokingu. Dobijena jedinjenja su poređena sa vodećim jedinjenjem **B1**, koje je korišćeno kao pozitivna kontrola. Jedinjenja sa povoljnim doking pozama su zatim dodatno analizirana primenom 3D-QSAR modela radi predviđanja aktivnosti (Slika 4.44). Na osnovu ovih analiza je za dalju procenu odabrano osam jedinjenja (Tabela 4.20). Odabrana jedinjenja pripadaju različitim heterocikličnim klasama, među kojima su derivati tienopirimidina, pirazol-karboksamida, indazola, hinazolinona, hinazolina i 1,2,4-oksadiazola.

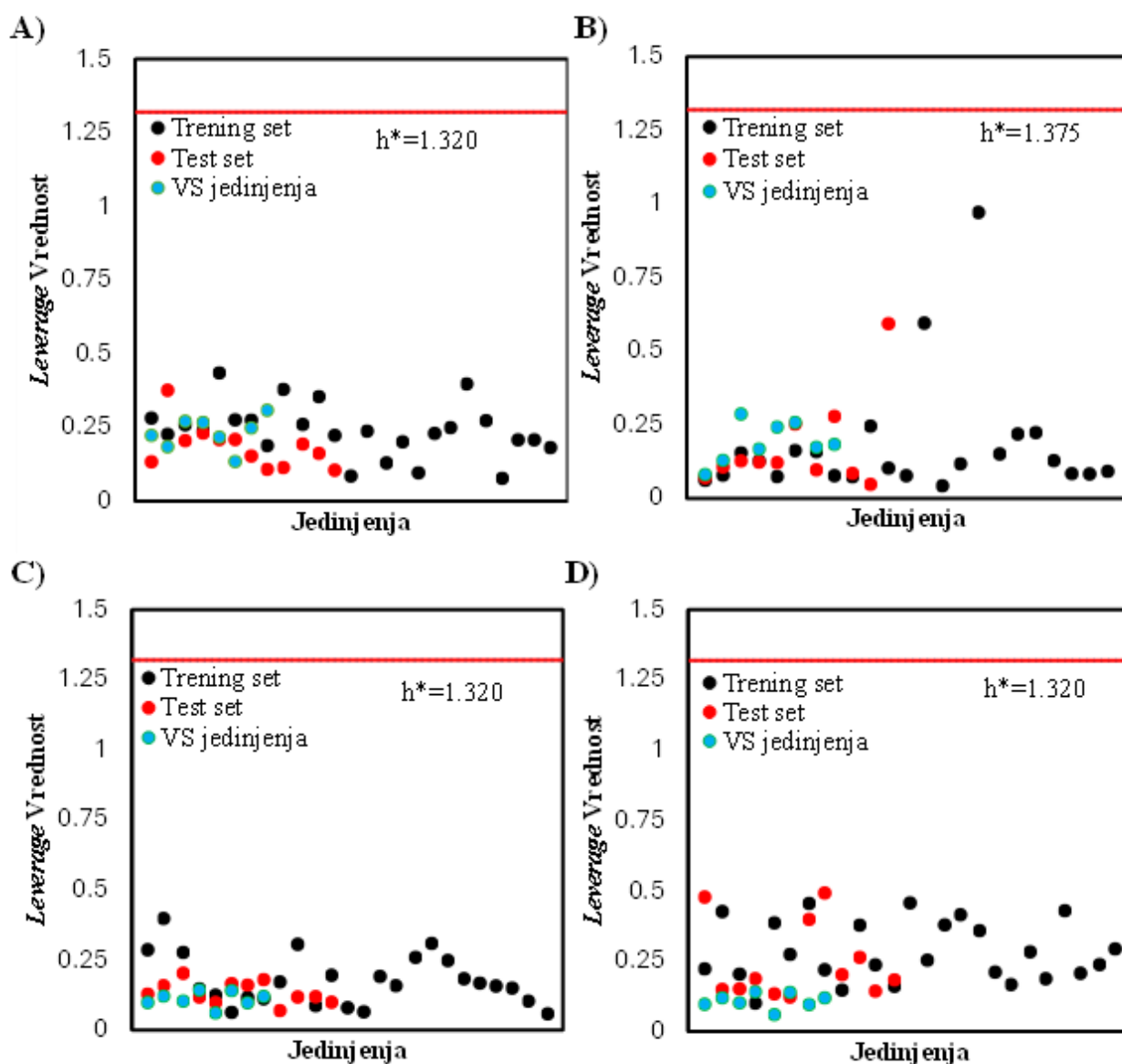


Slika 4.44. Strukture jedinjenja odabranih postupkom SBVS.

Tabela 4.20. 3D-QSAR predviđene pKi vrednosti, odabrani PI3K centroidi i ključne interakcije u vezivnom mestu za jedinjenja dobijena postupkom SBVS; aminokiseline koje formiraju vodonične veze istaknute su podebljanim slovima.

Oznaka jedinjenja	Identifikator u Enamine bazi podataka	LDA skor	3D-QSAR predviđene pKi vrednosti				Interakcije u vezivnom mestu			
			PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
B1 (vodeće jedinjenje)	/	/	10,523	8,253	8,697	9,654	α Bzo2: <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, Val851 , Ser854 , <i>Gln</i> 859, <i>Met</i> 922	β Bzo4: Lys775 , Trp787 , <i>Glu</i> 852, <i>Val</i> 853, Val854	γ Bzo3: <i>Tyr</i> 867, <i>Ile</i> 879, <i>Glu</i> 880, <i>Ile</i> 881, Val882 , <i>Met</i> 953	δ Bzo1: <i>Trp</i> 760, <i>Asp</i> 787, Lys779 , <i>Ile</i> 825, Val828 , <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 910
VS1	Z354333368	3,801	8,292	6,160	7,458	6,993	α Bzo2: <i>Gln</i> 859, Val851 , <i>Val</i> 850, <i>Met</i> 922, <i>Ile</i> 932, <i>Tyr</i> 836	β Bzo2: Val854 , <i>Val</i> 853, <i>Met</i> 926, <i>Ile</i> 936	γ Thz4: Lys833 , Val882 , <i>Asp</i> 964, <i>Ile</i> 831, <i>Ile</i> 879, <i>Ile</i> 963, <i>Met</i> 953	δ Bzo1: Val828 , Asn836 , Arg830 , <i>Ile</i> 910, <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 825, <i>Trp</i> 760, <i>Tyr</i> 813
VS2	Z1633943065	2,983	7,385	5,664	6,556	6,106	α Thz4: Val851 , Ser854 , Asn853 , <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, <i>Val</i> 850, <i>Met</i> 922, <i>Ile</i> 932	β Bzo5: Val854 , <i>Val</i> 853, <i>Met</i> 779, <i>Trp</i> 787, <i>Ile</i> 803	γ Bzo3: Val882 , Ala885 , <i>Ile</i> 831, <i>Ile</i> 879, <i>Ile</i> 963	δ Bzo3: Val828 , Ser831 , <i>Ile</i> 910, <i>Met</i> 900, <i>Met</i> 752
VS3	Z43963691	2,879	6,788	5,721	6,170	6,647	α Bzo2: <i>Gln</i> 859, Ser854 , Val851 , <i>Val</i> 850, <i>Met</i> 922, <i>Tyr</i> 836	β Bzo3: Val854 , Trp787 , <i>Met</i> 926, <i>Ile</i> 803	γ Bzo5: Lys833 , Asp964 , <i>Ile</i> 831, <i>Ile</i> 879, <i>Ile</i> 963	δ Bzo1: Val828 , Asn836 , Glu826 , <i>Ile</i> 910, <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 825, <i>Trp</i> 760, <i>Tyr</i> 813
VS4	Z26552865	2,469	7,927	6,631	7,185	8,566	α Bzo2: Val851 , <i>Arg</i> 852, Asn853 , His855 , <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, <i>Val</i> 850, <i>Ile</i> 932	β Bzo3: Val854 , <i>Val</i> 853, Ser857 , Lys929 , <i>Met</i> 926, <i>Ile</i> 803	γ Bzo5: Asp884 , Val882 , Ala885 , <i>Ile</i> 879, <i>Ile</i> 963, <i>Met</i> 953	δ Bzo1: Val828 , Arg830 , <i>Ile</i> 910, <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 825, <i>Trp</i> 760, <i>Tyr</i> 813
VS5	Z298834140	2,356	7,547	6,356	6,986	7,848	α Bzo2: Val851 , Asn853 , <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, <i>Val</i> 850, <i>Met</i> 922, <i>Ile</i> 932	β Bzo4: Val853 , Ser857 , <i>Val</i> 853, <i>Met</i> 779, <i>Trp</i> 787, <i>Ile</i> 803	γ Thz4: Lys833 , Asp964 , <i>Ile</i> 831, <i>Ile</i> 879, <i>Ile</i> 963	δ Bzo4: Val828 , <i>Ile</i> 910, <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 825, <i>Trp</i> 760, <i>Tyr</i> 813
VS6	Z535396046	2,173	6,437	6,445	7,057	7,278	α Bzo2: Val851 , Ser854 , Arg770 , <i>Trp</i> 780, <i>Val</i> 850, <i>Met</i> 922, <i>Ile</i> 932, <i>Tyr</i> 836	β Bzo5: Val854 , Ser857 , Trp787 , <i>Ile</i> 803	γ Thz5: Val882 , Asp964 , <i>Ile</i> 831, <i>Ile</i> 879, <i>Ile</i> 963, <i>Met</i> 953, <i>Trp</i> 812	δ Bzo4: Val828 , <i>Ser</i> 831, <i>Ile</i> 910, <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 825, <i>Trp</i> 760
VS7	Z1823628270	2,128	7,209	6,009	7,411	7,329	α Thz4: Val851 , Ser854 , Asn853 , <i>Val</i> 850, <i>Ile</i> 932, <i>Tyr</i> 836	β Bzo3: <i>Val</i> 853, <i>Lys</i> 777, <i>Lys</i> 775, <i>Trp</i> 787, <i>Met</i> 779	γ Bzo2: <i>Val</i> 882, Tyr867 , <i>Ile</i> 831, <i>Ile</i> 879, <i>Ile</i> 963, <i>Met</i> 953, <i>Trp</i> 812	δ Bzo1: Val828 , <i>Glu</i> 826, <i>Ile</i> 910, <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 825, <i>Trp</i> 760, <i>Tyr</i> 813
VS8	Z226221758	2,056	7,158	6,148	6,635	7,142	α Bzo2: Val851 , <i>Gln</i> 859, <i>Ser</i> 854, <i>Ile</i> 800, <i>Ile</i> 848, <i>Val</i> 850, <i>Ile</i> 932, <i>Tyr</i> 836	β Bzo2: Ser857 , <i>Trp</i> 787, <i>Lys</i> 777, <i>Ile</i> 936, <i>Ile</i> 803	γ Bzo3: Val882 , Asp964 , <i>Ile</i> 879, <i>Ile</i> 963	δ Bzo5: Val828 , Glu826 , <i>Ile</i> 910, <i>Met</i> 900, <i>Ile</i> 825, <i>Trp</i> 760

Odabrana jedinjenja su dodatno analizirana pomoću *Williams*-ovog grafika, kako bi se proverilo da li se nalaze unutar prethodno definisanog domena primenljivosti (Slika 4.45).



Slika 4.45. Williams-ovi grafici, sa definisanim domenima primenljivosti, za jedinjenja dobijena postupkom LDA-SBVS u okviru 3D-QSAR modela PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ .

Sva odabrana jedinjenja su pokazala interakcije sa zglobnim regionom, pri čemu je formirana vodonična veza sa α Val851. Pored toga, kod ovih jedinjenja su uočene i vodonične veze sa nekonzerviranim aminokiselinama. Jedinjenja **VS1**, **VS3** i **VS8** formirala su vodoničnu vezu sa α Gln859, a sva tri sadrže amidnu grupu odgovornu za ovu interakciju. Jedinjenja **VS2**, **VS4**, **VS5** i **VS7** formirala su vodoničnu vezu sa α Asn853. Dodatno, **VS4** je formirao vodoničnu vezu i sa α His855 iz hidrofobnog regiona, dok je **VS6** ostvario vodoničnu vezu sa α Asn770, smeštenim u P-petlji.

Među odabranim jedinjenjima, **VS1** je imalo najviši LDA skor i najvišu predviđenu pKi vrednost prema PI3K α . Aaminski vodonik, koji povezuje piperidin i tienopirimidin, vezivao se za α Val851. Karbonilni kiseonik amidne grupe je formirao vodoničnu vezu sa α Gln859, što ukazuje na potencijal ovog jedinjenja za selektivnost prema α izoformi. Tienopirimidinski prsten je ostvarivao različite hidrofobne kontakte, uključujući π -alkil interakciju sa α Val850 u zglobnom regionu, π -sumpor i T-oblikovane π - π interakcije sa α Tyr836, kao i π -alkil interakcije sa *alle*932 i α Met922 u afinitetnom džepu.

Predviđene pKi vrednosti jedinjenja dobijenih skriningom su zatim procenjene i prema drugim izoformama, PI3K β , PI3K γ i PI3K δ , radi sagledavanja njihovih profila selektivnosti. Među osam analiziranih jedinjenja, **VS1** i **VS2** su pokazala najizraženiju predviđenu selektivnost prema PI3K α izoformi. Za **VS1** je predviđena pKi vrednost od 8,29 prema PI3K α , uz niže afinitete prema PI3K β , PI3K γ i PI3K δ , što odgovara razlici većoj od 100 puta između PI3K α i PI3K β . Slično tome, **VS2** je pokazalo pKi vrednost od 7,39 prema PI3K α , uz selektivnost $\Delta pK_i > 1$ u odnosu na PI3K β i PI3K δ , što ukazuje na izraženiji afinitet prema α izoformi.

Nasuprot tome, jedinjenja **VS4**, **VS5** i **VS6** pokazala su više predviđene afinitete prema PI3K δ nego prema PI3K α , što ukazuje na slabiju selektivnost prema α izoformi. Konkretno, za **VS4** je predviđena pKi vrednost od 8,57 prema PI3K δ , u poređenju sa 7,93 prema PI3K α , što ukazuje na δ -selektivni profil.

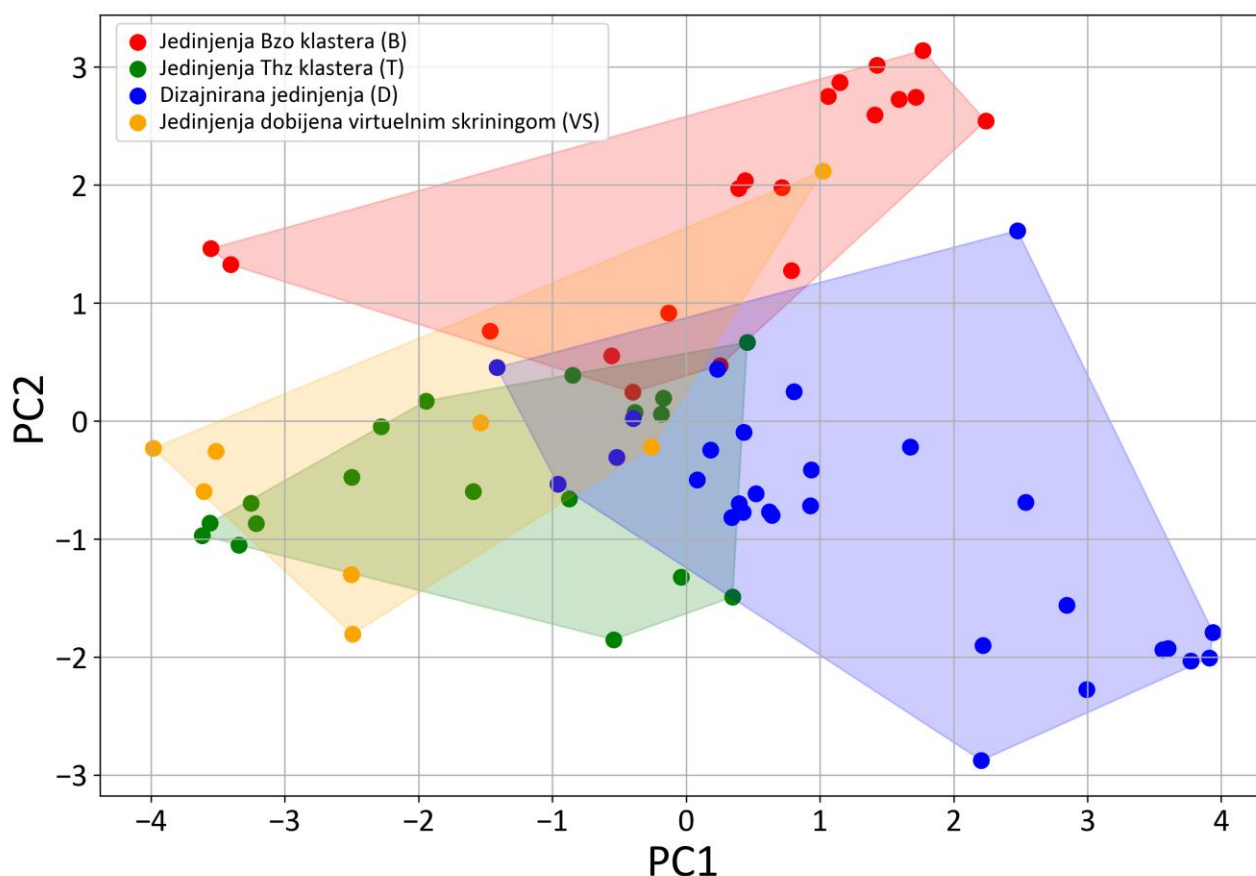
Jedinjenja **VS3**, **VS7** i **VS8** pokazala su umerenu aktivnost prema PI3K α , ali uz skromnu selektivnost u odnosu na PI3K β , najčešće sa $\Delta pK_i \approx 1$. Njihove predviđene aktivnosti prema PI3K γ i PI3K δ bile su uporedive sa aktivnošću prema PI3K α , što ukazuje na ograničenu sposobnost razlikovanja izoformi.

Sveukupno, **VS1** i **VS2** se izdvajaju kao najperspektivniji kandidati za selektivnu inhibiciju PI3K α (Tabela 4.20). Preostala jedinjenja ili nisu pokazala dovoljnu selektivnost ili su ispoljila izraženiju aktivnost prema drugim PI3K izoformama, posebno prema PI3K δ , zbog čega bi mogla zahtevati dodatnu strukturnu optimizaciju radi poboljšanja α -selektivnosti.

Ovi rezultati pružaju preliminarne dokaze o hemijskim tipovima koji bi mogli selektivnije delovati na PI3K α u odnosu na druge izoforme. Ipak, pošto ovaj korak predstavlja početnu fazu identifikacije selektivnih inhibitora, neophodne su dodatne *in silico* i eksperimentalne studije kako bi se validirale predviđene interakcije, procenila biološka aktivnost i dalje optimizovale selektivnost i farmakološke osobine.

4.3.8. Ispitivanje hemijskog prostora pokrivenog ispitivanim jedinjenjima

PCA analiza je izvedena na osnovu svih GRIND-2 deskriptora iz 3D-QSAR analize jedinjenja koja interaguju sa PI3K α , radi ispitivanja hemijskog prostora pokrivenog svim ispitivanim jedinjenjima. PCA je sprovedena korišćenjem prve dve glavne komponente, koje zajedno definišu ravan u kojoj je predstavljena glavna varijacija u podacima. PCA grafik pokazuje da četiri grupe jedinjenja zauzimaju različite regione hemijskog prostora (Slika 4.46). Jedinjenja Bzo klastera formiraju kompaktan klaster, dok se jedinjenja Thz klastera šire ka novim oblastima i time doprinose raznovrsnosti. Dizajnirana jedinjenja pokrivaju najširi i najraznovrsniji prostor, što ukazuje na njihovu visoku unutrašnju raznolikost. VS jedinjenja zauzimaju zaseban region, uz određeno preklapanje sa drugim klasterima, što dodatno potvrđuje njihove različite hemijske karakteristike. Sveukupno, svaka grupa jedinjenja ispituje različite delove hemijskog prostora, što je važno za povećanje raznovrsnosti u otkrivanju lekova i dizajnu novih jedinjenja.



Slika 4.46. PCA grafik skupa podataka, dizajniranih i VS jedinjenja na osnovu svih GRIND-2 3D-QSAR deskriptora.

4.3.9. *In silico* ADMET profilisanje seta podataka, dizajniranih i VS jedinjenja

Za *in silico* procenu novodizajniranih inhibitora su izračunati različiti fizičko-hemijski parametri, skorovi složenosti sinteze (Tabela 4.21) i farmakokinetičkih osobina (Tabela 4.22). Lipofilnost jedinjenja je procenjena na osnovu $MlogP$ vrednosti. Dobijeni rezultati su pokazali da jedinjenja **D1**, **D2**, **D3**, **D4**, **D5**, **D13**, **D23**, **VS1** i **VS2** imaju povoljne profile permeabilnosti i rastvorljivosti, što ukazuje na potencijalno dobru oralnu bioraspoloživost. Za većinu ovih molekula je bilo ispunjeno i Lipinskijevo „pravilo petice“. Kada je analizirano vezivanje za proteine plazme, navedena jedinjenja su pokazala udeo nevezanog leka u plazmi u opsegu sličnom onom koji je dobijen za vodeće jedinjenje **B1**.

Potencijal za nepovoljan metabolički profil je takođe ispitan. Za jedinjenja **D3** i **D13** je uočen viši CYP-povezan rizik u poređenju sa **B1**, što može ukazivati na potencijalno brži klirens. Nasuprot tome, jedinjenja **D1**, **D2**, **D4**, **D5**, **D23**, **VS1** i **VS2** pokazala su povoljnije metaboličke profile u odnosu na vodeće jedinjenje. Sva navedena jedinjenja, kao i **B1**, identifikovana su kao P-gp supstrati.

Predikcije toksičnosti su ukazale na potencijalnu hERG inhibiciju za **D4** i **D13**, što nije uočeno kod **B1**. Sa druge strane, **D1**, **D2**, **D3**, **D5**, **D23**, **VS1** i **VS2** nisu pokazali visok rizik u pogledu kardiovaskularne bezbednosti. Ukupni rizik toksičnosti bio je viši za **D2**, **D3** i **VS2** u poređenju sa **B1**, dok su **D1**, **D4**, **D5**, **D13**, **D23** i **VS1** ostali u povoljnijem bezbednosnom opsegu.

Skorovi složenosti sinteze pokazali su da je **D1** sintetski zahtevniji od **B1**, što se može povezati sa većom molekulskom kompleksnošću. Međutim, jedinjenja **D2**, **D3**, **D4**, **D5**, **D13**, **D23**, **VS1** i **VS2**

imala su niže skorove sintetske zahtevnosti u odnosu na vodeće jedinjenje, što ukazuje na potencijalno jednostavniji postupak sinteze.

Sveukupno, jedinjenja **D1**, **D13**, **D23**, **VS1** i **VS2** pokazala su povoljne predviđene fizičko-hemijske i farmakokinetičke osobine koje su unapređene u odnosu na **B1**. Pri tome se **D13** izdvaja po višim metaboličkim i hERG-povezanim rizicima, **D1** po većoj sintetskoj zahtevnosti, dok su **D2**, **D3** i **VS2** pokazali povećan rizik u pogledu toksičnosti. Nasuprot tome, **D4**, **D5**, **D23** i **VS1** izdvojili su se kao strukturno dostupni kandidati sa uravnoteženim ADMET profilima, zbog čega predstavljaju obećavajuće alternative za dalju optimizaciju (Slika 4.47).

Tabela 4.21. Fizičko-hemijska svojstva i skorovi složenosti sinteze dizajniranih i VS jedinjenja dobijeni pomoću SwissADME servera.

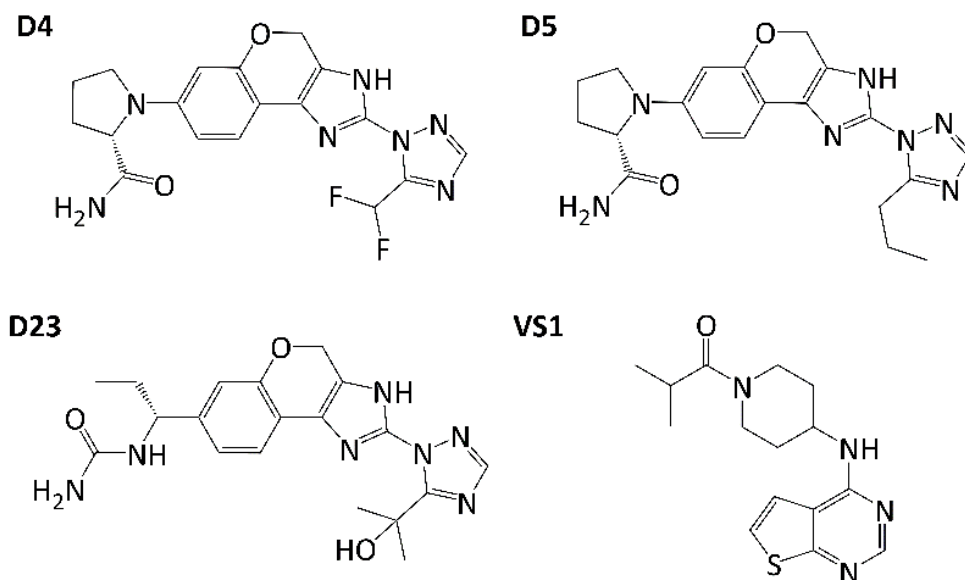
Oznaka jedinjenja	MW	MLOGP	Lipinski #violations	TPSA	Synthetic Accessibility
B1 (Vodeće jedinjenje)	407,47	1,23	0	104,09	4,16
H1	401,37	0,78	0	114,95	3,85
H2	393,44	1	0	114,95	4,08
H3	409,44	0,23	0	118,61	4,11
H4	397,45	0,81	0	119,03	3,87
H5	425,46	1,07	0	114,95	4,14
H6	407,47	0,96	0	124,94	4,12
D1	437,49	1,08	0	114,95	4,33
D2	429,42	1,63	0	114,95	4,11
D3	411,43	1,52	0	114,95	4,11
D4	397,41	1,22	0	114,95	3,3
D5	393,44	0,73	0	135,18	3,97
D6	437,54	1,39	0	114,95	4,03
D7	401,4	1,06	1	114,95	3,76
D8	437,54	2,07	0	114,95	4,12
D9	387,37	1,5	1	135,18	3,74
D10	425,48	1,41	0	114,95	4,38
D11	381,43	2,06	0	114,95	3,48
D12	397,43	1,56	0	119,03	3,57
D13	397,43	1,29	0	114,95	3,58
D14	391,39	1,22	1	154,28	3,73
D15	397,43	0,55	0	114,95	4,12
D16	421,5	1,18	0	154,28	4,23
D17	389,36	1,09	0	143,97	3,77
D18	399,45	1,34	0	127,82	3,9
D19	393,44	1,34	0	148,05	3,32
D20	395,46	1	0	148,05	3,69
D21	408,46	0,6	0	178,17	3,52
D22	393,44	1	0	143,97	4,07
D23	401,37	0,78	0	123,74	3,81
VS1	304,41	1,74	0	58,12	2,78
VS2	340,38	0,72	0	100,02	2,98
VS3	424,45	2,41	0	103,95	2,96
VS4	474,47	2,04	1	129,49	3,19
VS5	401,46	2,67	0	94,74	3,05
VS6	344,41	1,69	0	87,32	3,67
VS7	345,39	2,95	0	71,95	2,41
VS8	397,74	2,81	0	91,24	3,03

MW – molekulska masa; MLOGP – Moriguchi logP, deskriptor lipofilnosti; TPSA – topološka polarna površina; Lipinski #violations – broj odstupanja od Lipinski pravila petice; Synthetic Accessibility – skor složenosti sinteze, pri čemu niže vrednosti ukazuju na lakšu, a više vrednosti na zahtevniju sintezu.

Tabela 4.22. Farmakokinetička svojstva dizajniranih i VS jedinjenja dobijena pomoću ADMET Predictor softvera.

Oznaka jedinjenja	BBB Filter	LogBB	hum_fup%	Pgp Substr	CYP Risk	hERG Filter	TOX Risk
B1 (Vodeće jedinjenje)	Low (40%)	-1,246	23,845	Yes (88%)	0,422	No (66%)	1,5
H1	Low (77%)	-1,496	21,58	Yes (99%)	0	No (51%)	1,5
H2	Low (73%)	-1,315	14,799	Yes (99%)	0,311	Yes (57%)	1,5
H3	High (72%)	-0,778	37,5	Yes (99%)	0	No (91%)	1,298
H4	Low (68%)	-1,159	8,631	Yes (99%)	0	No (91%)	1,5
H5	Low (77%)	-1,432	18,804	Yes (99%)	0	No (69%)	1,463
H6	Low (77%)	-1,372	25,842	Yes (92%)	0	No (64%)	1
D1	Low (68%)	-1,506	18,962	Yes (99%)	0	No (56%)	1,5
D2	Low (64%)	-1,262	15,207	Yes (99%)	0	No (73%)	1,923
D3	Low (73%)	-1,39	11,917	Yes (99%)	1	No (73%)	1,535
D4	Low (68%)	-1,494	15,813	Yes (99%)	0	Yes (52%)	1,5
D5	Low (77%)	-1,594	24,914	Yes (99%)	0	No (91%)	1,5
D6	Low (77%)	-1,497	12,269	Yes (99%)	1	Yes (52%)	1,5
D7	Low (68%)	-1,286	16,352	Yes (99%)	0,234	No (43%)	1,555
D8	Low (73%)	-1,299	16,506	Yes (99%)	0	Yes (54%)	1,5
D9	Low (89%)	-1,406	18,129	Yes (99%)	0,255	No (73%)	1,5
D10	Low (68%)	-1,12	12,114	Yes (99%)	1,096	No (66%)	1,662
D11	Low (68%)	-1,3	17,698	Yes (99%)	1	No (61%)	1,47
D12	Low (60%)	-1,313	9,62	Yes (99%)	0	No (91%)	1
D13	Low (77%)	-1,181	11,829	Yes (99%)	0,847	Yes (82%)	1,5
D14	Low (97%)	-1,118	45,437	Yes (99%)	0	Yes	1
D15	Low (77%)	-1,252	11,247	Yes (99%)	0,54	Yes (86%)	1,5
D16	Low (89%)	-1,125	44,573	Yes (97%)	0	No	1
D17	Low (97%)	-1,57	21,559	Yes (99%)	0	No (91%)	2,5
D18	Low (77%)	-1,322	3,645	Yes (99%)	1	No (91%)	1,5
D19	Low (97%)	-1,397	6,146	Yes (99%)	0	No (91%)	1,5
D20	Low (97%)	-1,269	6,426	Yes (99%)	0	No (91%)	0,86
D21	Low (97%)	-0,718	67,849	Yes (99%)	0,5	No	1
D22	Low (89%)	-1,605	28,109	Yes (99%)	0	No (91%)	1,5
D23	Low (77%)	-1,322	17,251	Yes (99%)	0	No (79%)	1
VS1	High (99%)	-0,035	10,822	No (69%)	0,264	No (91%)	0,274
VS2	Low (60%)	-1,381	7,668	Yes (99%)	1	No (69%)	2,473
VS3	Low (53%)	-0,679	2,301	Yes (99%)	1	No (61%)	1
VS4	Low (73%)	-0,769	4,006	Yes (86%)	0,136	No (91%)	1,358
VS5	Low (60%)	-0,836	6,147	Yes (97%)	1,313	No (59%)	0,73
VS6	High (73%)	-0,953	36,525	Yes (95%)	1,029	No (79%)	0
VS7	High (99%)	-0,011	8,79	No (94%)	1	No (48%)	0
VS8	High (99%)	-0,496	4,825	No (74%)	0,924	Yes (98%)	0

BBB filter – predviđena sposobnost jedinjenja da prolazi kroz krvno-moždanu barijeru. Oznake „Low/High“ označavaju nisko, odnosno visoko predviđenu vrednost, dok vrednosti u zagradama predstavljaju procenat pouzdanosti predviđanja; LogBB – logaritamski odnos koncentracije jedinjenja u mozgu i krvi; hum_fup (%) – procenat nevezane frakcije jedinjenja u humanoј plazmi; P-gp supstrat – predviđanje da li je jedinjenje supstrat P-glikoproteina; CYP rizik – procenjeni rizik od interakcija posredovanih CYP enzimima; hERG filter – predviđeni rizik povezan sa inhibicijom hERG kanala; TOX rizik – ukupni predviđeni toksikološki rizik; VS – jedinjenja odabrana postupkom virtuelnog skrininga. Oznake „Yes/No“ označavaju pozitivno, odnosno negativno predviđanje, dok vrednosti u zagradama predstavljaju procenat pouzdanosti predviđanja.



Slika 4.47. Strukture najperspektivnijih jedinjenja za dalju optimizaciju.

4.3.10. Procena permeabilnosti kroz KMB primenom PAMPA-SVR QSPR modela i dodatna strukturna analiza dizajniranih PI3K α inhibitora

PAMPA-SVR model je dodatno korišćen za procenu potencijalne sposobnosti ispitivanih jedinjenja da pasivno prolaze kroz KMB. Vodeće jedinjenje za dizajn novih PI3K α inhibitora **B1** je svrstano u grupu jedinjenja srednje permeabilnosti, sa $\log P_e$ vrednošću blizu granice sa visokom permeabilnošću. U odnosu na **B1**, veći broj dizajniranih jedinjenja pokazao je jednaku ili povoljniju predviđenu permeabilnost. Niska permeabilnost je predviđena za **VS1**, **VS8**, **D18** i **D20**. Srednja permeabilnost je predviđena za **H5**, **D14**, **D16**, **D17**, **D19**, **D21**, **D22**, **D23**, **VS5**, **VS6** i **VS7**, dok su **H1**, **H2**, **H3**, **H4**, **H6**, **D1**, **D2**, **D3**, **D4**, **D5**, **D6**, **D7**, **D8**, **D9**, **D10**, **D11**, **D12**, **D13**, **D15**, **VS2**, **VS3** i **VS4** klasifikovani kao jedinjenja visoke permeabilnosti kroz KMB (Tabela 4.23). Ovakav rezultat ukazuje da sprovedene strukturne modifikacije uglavnom nisu narušile predviđenu sposobnost pasivne difuzije kroz membranski model KMB, a kod dela dizajniranih jedinjenja, naročito u okviru D serije, predviđena je i viša permeabilnost u odnosu na vodeće jedinjenje.

Tabela 4.23. Vrednosti $\log P_e$ predviđene PAMPA-SVR modelom, klasifikovane kao jedinjenja niske permeabilnosti ($-6,14 < \log P_e < -5,66$), srednje permeabilnosti ($-5,66 < \log P_e < -5,33$) i visoke permeabilnosti ($\log P_e > -5,33$).

Niska permeabilnost		Srednja permeabilnost		Visoka permeabilnost	
Jedinjenje	$\log P_e$	Jedinjenje	$\log P_e$	Jedinjenje	$\log P_e$
D20	-5,793	D17	-5,649	VS2	-5,310
VS1	-5,748	D22	-5,646	D6	-5,293
VS8	-5,724	D19	-5,596	VS4	-5,220
D18	-5,710	D23	-5,537	H4	-5,199
		H5	-5,527	D12	-5,199
		D16	-5,514	D1	-5,184
		VS5	-5,500	D3	-5,184
		VS7	-5,487	D4	-5,184
		D14	-5,481	D5	-5,184
		VS6	-5,421	H1	-5,166
		B1 (Vodeće jedinjenje)	-5,357	D2	-5,166

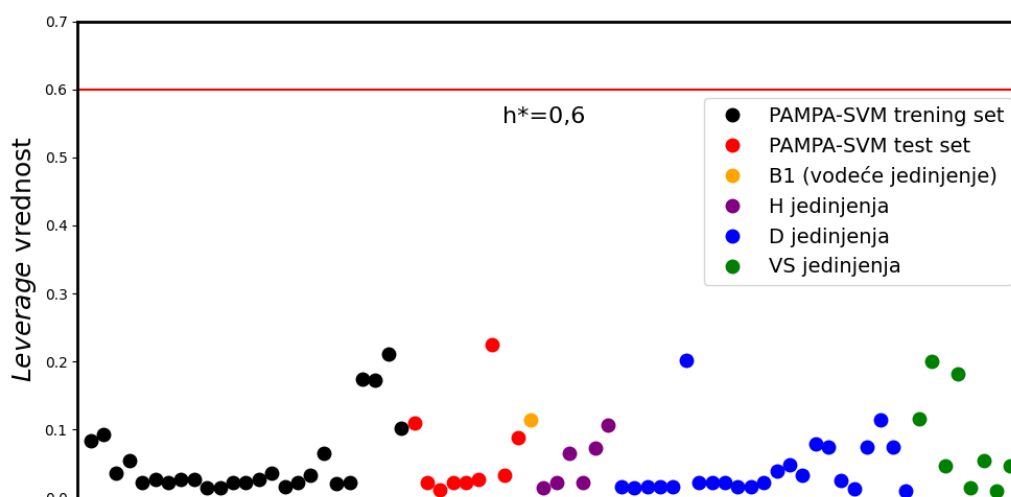
Niska permeabilnost	Srednja permeabilnost	Visoka permeabilnost
	D21	-5,357
		D10
		D11
		H2
		D7
		D8
		D9
		VS3
		H6
		D15
		D13
		H3
		-5,147
		-5,147
		-5,131
		-5,131
		-5,131
		-5,131
		-5,128
		-5,034
		-4,991
		-4,989
		-4,880

Dobijene razlike u permeabilnosti mogu se povezati sa deskriptorima koji su izdvojeni u prethodno razvijenom PAMPA-SVR modelu. Deskriptor CATS2D_09_DA, koji opisuje prisustvo donora i akceptora vodonične veze na topološkom rastojanju od 9, imao je negativan doprinos $\log P_e$ vrednosti. Visoke vrednosti ovog deskriptora kod jedinjenja **B1**, **D16**, **D17**, **D20**, **D21**, **D22** i **VS1** ukazuje da određeni raspored polarnih donorskih i akceptorskih centara može nepovoljno uticati na pasivnu permeabilnost. Nasuprot tome, deskriptor CATS2D_04_AA, koji opisuje dva akceptora vodonične veze na kraćem topološkom rastojanju, imao je pozitivan doprinos. Ovaj deskriptor ima visoke vrednosti kod većine D jedinjenja, što se može povezati sa povoljnim rasporedom heteroatoma u heterociklusima, kao i amidnim i ureidnim grupama.

Pozitivan doprinos na permeabilnost imali su i deskriptori F07[C–N] i B04[N–S]. Deskriptor F07[C–N] može se povezati sa rasporedom ugljenikovih i azotovih atoma u produženim aromatičnim i heteroaromatičnim fragmentima, kao i bočnim lancima povezanim sa centralnim sistemom. Njegova izraženost kod dela srednje permeabilnih derivata, kao što su **B1**, **D14**, **D16**, **D21** i visoko permeabilnim derivatima, poput **D13** i **D15**, može doprineti povoljnijoj predviđenoj permeabilnosti. Deskriptor B04[N–S], koji opisuje postojanje N–S atomskog para na topološkom rastojanju od 4, u modelu je pokazao pozitivan uticaj na permeabilnost, ali je među analiziranim dizajniranim i VS jedinjenjima izražen samo kod manjeg broja struktura, pre svega kod **D6**, **VS2** i **VS4**. Zbog toga je njegov doprinos značajan za pojedinačne primere, ali se razlike u permeabilnosti većine jedinjenja prvenstveno mogu objasniti odnosom deskriptora CATS2D_09_DA, CATS2D_04_AA i F07[C–N].

Sumarno, visoka permeabilnost većeg broja D derivata može se povezati sa odsustvom nepovoljnog rasporeda donora i akceptora vodonične veze, uz očuvan povoljan raspored heteroatoma i aromatičnih prstenova i heterociklusa. Nasuprot tome, niža permeabilnost jedinjenja **D18**, **D20**, **VS1** i **VS8** može se dovesti u vezu sa rasporedom strukturnih elemenata koji u manjoj meri favorizuje povećanje $\log P_e$ vrednosti.

Sva jedinjenja su se nalazila unutar definisanog domena primenljivosti PAMPA-SVR modela (Slika 4.48), što ukazuje na pouzdanost dobijenih predikcija.



Slika 4.48. Williams-ov grafik (definisani domeni primenljivosti) PAMPA-SVR modela, koji uključuje jedinjenja iz PAMPA-SVR seta podataka, vodeće jedinjenje, dizajnirana jedinjenja i jedinjenja dobijena LDA-SBVS procedurom.

Pored procene permeabilnosti, sprovedeno je i strukturno poređenje dizajniranih PI3K inhibitora sa erlotinibom, zasnovano na prisustvu potencijalno elektroaktivnih funkcionalnih grupa i strukturnih fragmenata koji mogu učestvovati u interakcijama sa DNK.

Dodatnu metodološku potporu za buduća elektrohemijška ispitivanja dizajniranih PI3K inhibitora pruža činjenica da je alpelisib, selektivni PI3K α inhibitor, već ispitan primenom elektrohemijškog senzora [523]. Iako je to ispitivanje bilo usmereno pre svega na analitičko određivanje alpelisiba, a ne na detaljno razjašnjenje redoks mehanizma ili interakcije sa DNK, ono pokazuje da PI3K inhibitori sa karakterističnim aromatičnim heterociklusima i polarnim funkcionalnim grupama mogu dati merljiv elektrohemijški odgovor.

Poređenje sa erlotinibom ima pre svega metodološki i biološki značaj. Erlotinib i dizajnirani PI3K inhibitori ne deluju na isti molekulski cilj, ali pripadaju širem okviru ciljane antitumorske terapije usmerene na signalne puteve koji regulišu proliferaciju i preživljavanje tumorskih ćelija. Erlotinib inhibira EGFR, receptorsku tirozin kinazu koja može aktivirati nishodnu PI3K/AKT-mTOR signalizaciju, dok su dizajnirana jedinjenja usmerena direktno ka PI3K α . Zbog toga se ova dva pristupa mogu posmatrati kao farmakološki povezana, ali ne i kao osnova za direktno prenošenje redoks mehanizma erlotiniba na PI3K inhibitore.

Dizajnirani PI3K inhibitori ne sadrže sve redoks centre koji su utvrđeni kod erlotiniba, pri čemu se izdvaja terminalna acetilenska grupa, pa se njegov redukcioni mehanizam ne može direktno preneti na ova jedinjenja. Takođe, kod dizajniranih jedinjenja nije prisutno 4-anilinohinazolinsko jezgro, u okviru koga je oksidacija erlotiniba povezana sa sekundarnom aromatičnom amino grupom. Međutim, vodeće jedinjenje **B1** i niz dizajniranih derivata sadrže strukturne celine koje mogu biti značajne za potencijalnu elektrohemijšku aktivnost, kao što su triciklični sistemi sa aromatičnim i heteroaromatičnim delovima (**B1**, **H1**, **H2**, **D1–D11**, **D13**, **D14**, **D21**, **D23**), hinolinski ili hinolin-srodni fragmenti (**D12**, **D18–D20**, **VS5**), heterociklični fragmenti sa više atoma azota, uključujući triazolne ili imidazolne prstenove (**H1–H6**, **D1–D11**, **D13**, **D14**, **D16**, **D17**, **D20–D23**, **VS2**, **VS8**), kao i arilovani amino-fragmenti (**H3–H6**, **D1–D14**, **D18–D23**). Amidne, ureidne, karboksamidne i hidrazidne grupe verovatno ne bi predstavljale glavne redoks centre, ali mogu uticati na adsorpciju jedinjenja na površini elektrode i doprineti intermolekulskim interakcijama. Zbog toga metodologija primenjena u ispitivanju erlotiniba može biti korisna za planiranje budućih ispitivanja redoks

ponašanja dizajniranih PI3K inhibitora, dok bi se konkretni mehanizmi mogli razmatrati nakon eksperimentalne potvrde.

U pogledu moguće interakcije sa DNK, poređenje sa erlotinibom je takođe ograničeno, ali korisno za preliminarnu procenu. Kod erlotiniba je pokazano vezivanje za DNK, pri čemu aromatični i heteroaromatični delovi molekula, kao i polarni supstituenti, mogu doprineti ostvarivanju nekovalentnih interakcija. Slično tome, aromatične i heteroaromatične površine dizajniranih PI3K inhibitora mogle bi doprineti hidrofobnim i π - π interakcijama sa DNK. Sa druge strane, heteroatomi u amidnim, ureidnim, karboksamidnim, hidrazidnim i heterocikličnim fragmentima sa više atoma azota mogli bi učestvovati u vodoničnim ili elektrostatičkim interakcijama. Međutim, ova analiza ne ukazuje na konkretan način vezivanja, već samo na strukturni potencijal za buduća eksperimentalna ispitivanja interakcije dizajniranih PI3K inhibitora sa DNK.

4.3.11. Uporedna analiza rezultata studije sa podacima iz literature

Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim studijama PI3K inhibitora, u kojima je pokazano da razvoj selektivnih inhibitora predstavlja poseban izazov zbog izražene sličnosti katalitičkih domena PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ enzima. Selektivnost ovih inhibitora najčešće se ne zasniva na jednoj dominantnoj interakciji, već na kombinaciji vezivanja u različitim regionima aktivnog mesta, prvenstveno u P-petlji i hidrofobnom regionu II ostvarivanjem interakcija sa nekonzerviranim aminokiselinskim ostacima [160]. U tom smislu, prednost pristupa primenjenog u ovoj disertaciji ogleda se u tome što su razvijeni zasebni 3D-QSAR modeli za sve četiri klase I PI3K izoforme, a predviđene aktivnosti dizajniranih jedinjenja su zatim upoređene prema PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ . Time procena nije bila zasnovana samo na predviđenoj potentnosti prema ciljanoj PI3K α izoformi, već i na proceni potencijalne selektivnosti u odnosu na sve ostale PI3K izoforme.

Pošto je PI3K β model korišćen za procenu mogućeg *off-target* vezivanja PI3K α -usmerenih inhibitora, izbor šablona predstavljao je važan korak u ovoj studiji. U ranijim radovima su homologični modeli PI3K β građeni i na osnovu struktura drugih izoformi, uključujući PI3K γ i PI3K δ [524,525], što može predstavljati ograničenje u studijama selektivnosti zbog mogućeg gubitka lokalnih razlika u aktivnom mestu. Kasnije su korišćeni i šabloni iste izoforme, kao što je mišja PI3K β struktura (PDB ID: 4BFR) [526]. U ovoj disertaciji je kao šablon izabrana mišja PI3K β struktura (PDB ID: 2Y3A), koja sadrži p110 β /p85 β kompleks sa pan-PI3K inhibitorom GDC-0941 [527]. Iako 4BFR ima nešto bolju rezoluciju, po pojedinačnom p110 β lancu ima kraće strukturno pokrivanje i kokristalisana je sa PI3K β -selektivnim inhibitorom. Zbog toga je 2Y3A bila pogodnija za ovu studiju, jer je cilj bio procena vezivanja benzoksazepinskih i tiazolnih derivata koji deluju na PI3K α , a ne dizajn PI3K β -selektivnih inhibitora. Dodatno, nakon dokinga reprezentativnih liganada, dobijeni kompleksi su ispitani MD simulacijama, čime je početna struktura dodatno konformaciono prilagođena ispitivanim ligandima, dok su konformacije iz stabilizovanog dela trajektorije korišćene za ansambl doking i 3D-QSAR modelovanje.

Nalazi dobijeni primenom kriogene elektronske mikroskopije kod PI3K α u saglasnosti su sa rezultatima ove studije [162]. Strukture dobijene kriogenom elektronskom mikroskopijom pokazale su da PI3K α može zauzimati više konformacionih stanja, uključujući nevezanu formu, kompleks sa PI3K α -selektivnim inhibitorom BYL-719 i aktivirano stanje, što podržava značaj uključivanja konformacione fleksibilnosti u analizu vezivanja inhibitora. Ovi rezultati se poklapaju sa pristupom primenjenim u ovoj disertaciji, u kome su MD simulacije i ansambl doking korišćeni za procenu vezivanja dizajniranih jedinjenja. Pored toga, položaj ATP-kompetitivnog inhibitora u zglobnom regionu i afinitetnom/specifičnom džepu u skladu je sa strukturnim elementima koji su u ovoj disertaciji izdvojeni kao važni za vezivanje PI3K α inhibitora.

Novije *in silico* studije takođe su bile usmerene ka dizajnu PI3K α -selektivnih inhibitora, najčešće kroz kombinovanje strukturno zasnovanog dizajna, predviđanja aktivnosti i procene farmakokinetičkog profila. Halder i saradnici su nove potencijalne inhibitore generisali fragmentno zasnovanim dizajnom i bioizosternom zamenom, nakon čega su ih rangirali dokingom i MM/GBSA proračunima. Za najbolje rangirana jedinjenja dodatno su primenjeni predikcija *off-target* vezivanja SwissTargetPrediction servera, doking sa indukovanim prilagođavanjem vezivnog mesta, DFT analiza, MD simulacije i procena ADMET osobina [528]. Sličan pristup primenili su Dibia i saradnici, koji su virtuelni skrining, molekulski doking i 3D-QSAR modelovanje koristili za dizajn novog PI3K α inhibitora [529], dok su Wang i saradnici kombinovali CoMFA/CoMSIA 3D-QSAR modele sa DFT, ADMET predviđanjima, dokingom i MD analizama u cilju predlaganja novih PI3K α inhibitora [530]. Iako ovi radovi potvrđuju značaj kombinovanja više metodologija u dizajnu PI3K α inhibitora, njihova procena je uglavnom bila usmerena na ciljanu PI3K α izoformu, dok je selektivnost najčešće razmatrana kroz naknadne analize. Nasuprot tome, u ovoj disertaciji su MD-zasnovane konformacije sve četiri klase I PI3K izoforme korišćene za ansambl doking, a za PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ razvijeni su zasebni 3D-QSAR modeli. Time je omogućena istovremena procena predviđene aktivnosti prema ciljanoj PI3K α izoformi i potencijalne *off-target* aktivnosti dizajniranih jedinjenja na PI3K β , PI3K γ i PI3K δ izoforme, što predstavlja glavnu prednost ovog pristupa u dizajnu PI3K α -selektivnih kandidata.

5. ZAKLJUČAK

U okviru doktorske disertacije pod nazivom „Heminformatička analiza, dizajn i ispitivanje inhibitora lipidnih i protein kinaza kao potencijalno novih antineoplastika“ sprovedeno je integrisano istraživanje usmereno na ispitivanje kinaznih inhibitora primenom eksperimentalnih i računarskih metoda, sa posebnim osvrtom na njihovu permeabilnost kroz KMB, elektrohemijsko ponašanje i potencijal za interakciju sa DNK, kao i racionalni dizajn novih potencijalno selektivnih inhibitora PI3K α izoforme. Istraživanje je obuhvatilo tri međusobno povezana segmenta: 1) *in vitro* PAMPA-KMB ispitivanje permeabilnosti kinaznih inhibitora i strukturno srodnih jedinjenja, uz formiranje QSPR modela za predviđanje pasivne permeabilnosti kroz KMB; 2) voltametrijsko ispitivanje oksidoredukcionih osobina erlotiniba i njegove interakcije sa DNK uz *in silico* analizu; 3) primenu CADD metoda, uz kombinovanje metoda zasnovanih na strukturi liganda i strukturi ciljnog mesta dejstva, radi definisanja strategije za dizajn potencijalno selektivnih PI3K α inhibitora, nakon čega su dizajnirana jedinjenja analizirana primenom razvijenog CADD protokola.

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći najvažniji zaključci:

- PAMPA-KMB testom je pokazano da se ispitivani kinazni inhibitori i srodna jedinjenja međusobno značajno razlikuju u pogledu pasivne permeabilnosti kroz model KMB. Jedinjenja su, na osnovu eksperimentalno određenih logPe vrednosti, svrstana u grupe niske, srednje i visoke permeabilnosti, čime je omogućeno poređenje njihove sposobnosti prolaska kroz lipidnu membranu koja simulira KMB.
- Rezultati PAMPA-KMB ispitivanja pokazali su delimično slaganje sa poznatim farmakokinetičkim i kliničkim podacima o pojedinim kinaznim inhibitorima. Visoka permeabilnost predložena je za jedinjenja poput lapatiniba, everolimusa i fasudila, dok su za pojedine inhibitore uočena odstupanja između PAMPA rezultata i očekivanog ponašanja *in vivo*. Takva odstupanja ukazuju na ograničenja PAMPA-KMB modela, naročito kod jedinjenja čiji prolazak kroz KMB zavisi od aktivnog transporta, efluksa, vezivanja za proteine ili drugih bioloških faktora koji nisu obuhvaćeni ovim *in vitro* modelom.
- Formirani QSPR modeli pokazali su da se pasivna permeabilnost kroz KMB može opisati i predviđati na osnovu topološkog rasporeda strukturnih elemenata molekula, pre svega donora i akceptora vodoničnih veza, određenih atomskih parova i heteroatoma. Među razvijenim modelima, QSPR-SVR model se izdvojio kao pouzdan alat za procenu permeabilnosti novih jedinjenja unutar definisanog domena primenljivosti. Analiza najznačajnijih deskriptora ukazala je da smanjenje broja donora vodoničnih veza, odgovarajuća lipofilnost i povoljan raspored heteroatoma mogu doprineti poboljšanju pasivne permeabilnosti kroz KMB.
- Razvijeni QSPR model je pokazao praktičnu vrednost u usmeravanju strukturnih modifikacija kinaznih inhibitora, jer omogućava povezivanje promena u molekulskoj strukturi sa očekivanim promenama permeabilnosti kroz KMB. Na taj način je potvrđena primenljivost PAMPA-QSPR protokola kao ranog skrining alata za izbor i optimizaciju jedinjenja sa potencijalnom primenom u bolestima CNS-a.
- Voltametrijskim ispitivanjem erlotiniba na nemodifikovanoj GCE pokazano je da se na voltamogramima detektuje više oksidacionih i redukcionih pikova, odnosno strujnih signala koji odgovaraju elektrohemijskim procesima erlotiniba. Svi detektovani procesi bili su ireverzibilni. Najizraženiji oksidacioni proces, karakterisan pikom Ia, zavisi od pH sredine i u većem delu ispitivanog opsega odvija se uz prenos jednog elektrona i jednog protona, dok se u kiseloj sredini može pretpostaviti učešće dva elektrona i dva protona. Predloženo je da je ovaj proces povezan sa oksidacijom sekundarne aromatične amino grupe erlotiniba.
- Redukcioni proces karakterisan pikom Ic najverovatnije je povezan sa redukcijom hinazolinskog prstena uz učešće jednog elektrona i jednog protona, dok je pik IIc pripisan redukciji terminalne acetilenske grupe u bočnom lancu, naročito u kiseloj sredini. Na osnovu CV, DPV i SWV rezultata predložen je redoks mehanizam erlotiniba, čime je dopunjeno razumevanje njegovog elektrohemijskog ponašanja u zavisnosti od pH sredine.

- Ispitivanjem interakcije erlotiniba korišćenjem DNK-biosenzora uočeno je smanjenje intenziteta struje oksidacionog pika dezoksiadenozina sa porastom koncentracije ERL, uz vrlo male promene potencijala pika. Izračunata konstanta vezivanja iznosila je $K = 8,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, što ukazuje da erlotinib ostvaruje merljivu interakciju sa DNK. Na osnovu voltametrijskih rezultata, kao i rezultata molekulskog dokinga i molekulske dinamike, pretpostavljeno je da interkalacija predstavlja dominantniji način vezivanja ERL za DNK u uslovima primenjenog biosenzora, iako se ne može potpuno isključiti ni doprinos vezivanja u žljeb DNK.
- Računarsko modelovanje interakcije erlotiniba sa DNK dodatno je podržalo rezultate elektrohemijjskih ispitivanja. Molekulski doking je pokazao da ERL može zauzeti interkalacioni položaj između parova baza, dok su simulacije molekulske dinamike ukazale na stabilnost takvog kompleksa tokom analiziranog vremenskog intervala. Time je potvrđena korisnost kombinovanja voltametrijskih metoda i molekulskog modelovanja u ispitivanju potencijalnih interakcija kinaznih inhibitora sa DNK.
- U okviru PI3K studije je razvijen integrisani računarski protokol usmeren na racionalni dizajn novih potencijalno selektivnih inhibitora PI3K α . Homologni model PI3K β je pokazao zadovoljavajuće geometrijske i strukturne karakteristike, dok su MD simulacije kompleksa reprezentativnih liganada omogućile procenu njihove konformacione stabilnosti i izdvajanje reprezentativnih struktura iz stabilizovanog dela trajektorija za dalju primenu u ansambl dokingu. Kombinovanjem ansambl dokinga i 3D-QSAR modelovanja za PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ izoforme omogućeno je povezivanje značajnih GRIND-2 varijabli sa konkretnim interakcijama u aktivnim mestima PI3K izoformi, kao i razlikovanje strukturnih karakteristika koje povoljno ili nepovoljno utiču na aktivnost i selektivnost za sve četiri izoforme. Na osnovu ovih rezultata definisana je strategija dizajna PI3K α -selektivnih inhibitora, koja podrazumeva očuvanje akceptora vodonične veze za interakciju sa zglobnim regionom, optimizaciju hidrofobnih i sternih karakteristika dela molekula usmerenog ka afinitetnom džepu i pažljivo pozicioniranje fragmenta koji utiče na selektivnost, radi favorizovanja interakcija sa αGln859 , αAsn853 i susednim aminokiselinim ostacima, uz smanjenje povoljnih interakcija sa PI3K β , PI3K γ i PI3K δ izoformama.
- Na osnovu definisanih strukturnih smernica sproveden je racionalni dizajn novih potencijalno selektivnih PI3K α inhibitora. Kombinovanjem *scaffold hopping* pristupa, zamene R-grupa, ansambl dokinga i 3D-QSAR predikcije izdvojena su 23 dizajnirana jedinjenja kao reprezentativni potencijalni PI3K α inhibitori, pri čemu su se pojedina jedinjenja, posebno **D1**, **D13**, **D14** i **D23**, izdvojila po povoljnom predviđenom profilu aktivnosti i selektivnosti.
- Strukturno zasnovani virtuelni skrining omogućio je identifikaciju novih hemijskih klasa jedinjenja koji potencijalno mogu delovati na PI3K α . Od osam dodatno analiziranih jedinjenja dobijenih procesom virtuelnog skrininga, **VS1** i **VS2** su se izdvojili kao najperspektivniji kandidati za selektivnu inhibiciju PI3K α , dok ostala VS jedinjenja mogu predstavljati polazne strukture za dalju optimizaciju.
- Objedinjenom analizom rezultata dizajna, virtuelnog skrininga i *in silico* ADMET karakterizacije omogućena je konačna procena potencijala dizajniranih i VS jedinjenja za dalja istraživanja. Iako su kod pojedinih struktura predviđeni potencijalni problemi povezani sa farmakokinetičkim i toksičnim profilom, veći broj jedinjenja pokazao je povoljne osobine, prihvatljivu složenost sinteze i uravnotežen profil predviđenih ADMET karakteristika. Razmatranjem svih predviđenih karakteristika kao najperspektivniji kandidati izdvojeni su **D4**, **D5**, **D23** i **VS1**.
- Dodatna analiza primenom PAMPA-SVR QSPR modela pokazala je da značajan broj dizajniranih PI3K α inhibitora ima predviđenu srednju ili visoku pasivnu permeabilnost kroz KMB, što može biti značajno za dalju optimizaciju inhibitora sa potencijalnom primenom u neuroonkologiji.
- Komparativna strukturna analiza dizajniranih jedinjenja, zasnovana na poređenju potencijalno elektroaktivnih funkcionalnih grupa, kao i aromatičnih i heterocikličnih fragmenata sa

erlotinibom, omogućila je dodatno razmatranje njihovog mogućeg redoks ponašanja i potencijala za interakciju sa DNK.

Sveukupno, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da kombinovanje eksperimentalnih metoda i savremenih CADD pristupa može značajno doprineti razumevanju odnosa strukture i aktivnosti kinaznih inhibitora, kao i drugih relevantnih osobina. Dobijeni rezultati i razvijeni protokoli predstavljaju osnovu za dizajn, sintezu i dalju eksperimentalnu validaciju potencijalno novih antineoplastika sa povoljnijim profilima aktivnosti, selektivnosti, farmakokinetičkih osobina i bezbednosti.

6. LITERATURA

- [1] F. Bray, M. Laversanne, H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, I. Soerjomataram, A. Jemal, Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 74 (2024) 229–263. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21834>;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:15424863;WGROUP:STRING:PUBLICATION.
- [2] Cancer, (n.d.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed April 30, 2026).
- [3] The Genetics of Cancer - NCI, (n.d.). <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics> (accessed April 30, 2026).
- [4] S.B. Baylin, P.A. Jones, Epigenetic Determinants of Cancer, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8 (2016). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A019505>.
- [5] L.T. Kagohara, G.L. Stein-O'Brien, D. Kelley, E. Flam, H.C. Wick, L. V. Danilova, H. Easwaran, A. V. Favorov, J. Qian, D.A. Gaykalova, E.J. Fertig, Epigenetic regulation of gene expression in cancer: techniques, resources and analysis, *Brief. Funct. Genomics* 17 (2018) 49–63. <https://doi.org/10.1093/BFGP/ELX018>.
- [6] D. Hanahan, Hallmarks of Cancer: New Dimensions, *Cancer Discov.* 12 (2022) 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- [7] Cell Cycle, (n.d.). <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle> (accessed April 30, 2026).
- [8] Breast cancer, (n.d.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (accessed April 30, 2026).
- [9] Breast Cancer Biomarkers | Hormone Receptors, HER2, and Others - NCI, (n.d.). <https://www.cancer.gov/types/breast/diagnosis/breast-cancer-biomarker-tests> (accessed April 30, 2026).
- [10] Metastatic Cancer: When Cancer Spreads - NCI, (n.d.). <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer> (accessed April 30, 2026).
- [11] Cancer, (n.d.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed April 30, 2026).
- [12] Cancer, (n.d.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed April 30, 2026).
- [13] J. Li, C. Gong, H. Zhou, J. Liu, X. Xia, W. Ha, Y. Jiang, Q. Liu, H. Xiong, Kinase Inhibitors and Kinase-Targeted Cancer Therapies: Recent Advances and Future Perspectives, *Int. J. Mol. Sci.* 25 (2024). <https://doi.org/10.3390/IJMS25105489>.
- [14] Targeted Therapy for Cancer - NCI, (n.d.). <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies> (accessed May 4, 2026).
- [15] J.L.F. Teh, A.E. Aplin, Arrested developments: CDK4/6 inhibitor resistance and alterations in the tumor immune microenvironment, *Clin. Cancer Res.* 25 (2018) 921. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1967>.

- [16] J. Yan, L. Zhuang, Y. Wang, Y. Jiang, Z. Tu, C. Dong, Y. Chen, Y. Zhu, Inhibitors of cell cycle checkpoint target Wee1 kinase - a patent review (2003-2022), *Expert Opin. Ther. Pat.* 32 (2022) 1217–1244. <https://doi.org/10.1080/13543776.2022.2166827>.
- [17] T.L. Schmit, N. Ahmad, Regulation of mitosis via mitotic kinases: new opportunities for cancer management, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 1920–1931. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0781>.
- [18] R. Roskoski, Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2025 update, *Pharmacol. Res.* 216 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2025.107723>.
- [19] S. Yadav, P. Mathur, Orthosteric and allosteric modulation of human kinases: A mechanistic view, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 25 (2020) 1462–1487. <https://doi.org/10.2741/4864>.
- [20] S. Cheek, K. Ginalski, H. Zhang, N. V. Grishin, A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases, *BMC Struct. Biol.* 5 (2005) 6. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-5-6>.
- [21] D.D. Leipe, E. V. Koonin, L. Aravind, Evolution and Classification of P-loop Kinases and Related Proteins, *J. Mol. Biol.* 333 (2003) 781–815. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2003.08.040>.
- [22] F. Ardito, M. Giuliani, D. Perrone, G. Troiano, L. Lo Muzio, The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review), *Int. J. Mol. Med.* 40 (2017) 271–280. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2017.3036>.
- [23] K.S. Bhullar, N.O. Lagarón, E.M. McGowan, I. Parmar, A. Jha, B.P. Hubbard, H.P.V. Rupasinghe, Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions, *Mol. Cancer* 17 (2018) 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2>.
- [24] D. Fabbro, S.W. Cowan-Jacob, H. Moebitz, Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 2675–2700. <https://doi.org/10.1111/BPH.13096>.
- [25] Z. Gagic, D. Ruzic, N. Djokovic, T. Djikic, K. Nikolic, In silico Methods for Design of Kinase Inhibitors as Anticancer Drugs, *Front. Chem.* 7 (2020) 873. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2019.00873/BIBTEX>.
- [26] P. Theivendren, S. Kunjiappan, Y.M. Hegde, S. Vellaichamy, M. Gopal, S.R. Dhramalingam, S. Kumar, P. Theivendren, S. Kunjiappan, Y.M. Hegde, S. Vellaichamy, M. Gopal, S.R. Dhramalingam, S. Kumar, Importance of Protein Kinase and Its Inhibitor: A Review, (2021). <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.98552>.
- [27] S.S. Taylor, A.P. Kornev, Protein kinases: Evolution of dynamic regulatory proteins, *Trends Biochem. Sci.* 36 (2011) 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.006>.
- [28] K. Oruganty, N. Kannan, Design principles underpinning the regulatory diversity of protein kinases, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367 (2012) 2529. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2012.0015>.
- [29] D.R. Knighton, J. Zheng, L.F. Ten Eyck, V.A. Ashford, N.H. Xuong, S.S. Taylor, J.M. Sowadski, Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase, *Science* 253 (1991) 407–414. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1862342>.

- [30] M. Huse, J. Kuriyan, The conformational plasticity of protein kinases, *Cell* 109 (2002) 275–282. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00741-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00741-9).
- [31] J.A. Endicott, M.E.M. Noble, L.N. Johnson, The structural basis for control of eukaryotic protein kinases, *Annu. Rev. Biochem.* 81 (2012) 587–613. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-052410-090317>.
- [32] D.R. Knighton, J. Zheng, L.F. Ten Eyck, V.A. Ashford, N.H. Xuong, S.S. Taylor, J.M. Sowadski, Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase, *Science* 253 (1991) 407–414. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1862342>.
- [33] S. Röhm, A. Krämer, S. Knapp, Function, Structure and Topology of Protein Kinases, *Topics in Medicinal Chemistry* 36 (2020) 1–24. https://doi.org/10.1007/7355_2020_97.
- [34] Z. Gagic, D. Ruzic, N. Djokovic, T. Djikic, K. Nikolic, In silico Methods for Design of Kinase Inhibitors as Anticancer Drugs, *Front. Chem.* 7 (2020) 501168. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2019.00873/FULL>.
- [35] W. Hemmer, M. McGlone, I. Tsigelny, S.S. Taylor, Role of the glycine triad in the ATP-binding site of cAMP-dependent protein kinase, *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 16946–16954. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.16946>.
- [36] L. Xing, J. Klug-Mcleod, B. Rai, E.A. Lunney, Kinase hinge binding scaffolds and their hydrogen bond patterns, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 6520–6527. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2015.08.006>.
- [37] J. Li, C. Gong, H. Zhou, J. Liu, X. Xia, W. Ha, Y. Jiang, Q. Liu, H. Xiong, Kinase Inhibitors and Kinase-Targeted Cancer Therapies: Recent Advances and Future Perspectives, *Int. J. Mol. Sci.* 25 (2024). <https://doi.org/10.3390/IJMS25105489>.
- [38] R. Roskoski, Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs, *Pharmacol. Res.* 139 (2019) 471–488. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2018.11.035>.
- [39] J.D.R. Knight, B. Qian, D. Baker, R. Kothary, Conservation, Variability and the Modeling of Active Protein Kinases, *PLoS One* 2 (2007) e982. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000982>.
- [40] G. La Sala, L. Riccardi, R. Gaspari, A. Cavalli, O. Hantschel, M. De Vivo, HRD Motif as the Central Hub of the Signaling Network for Activation Loop Autophosphorylation in Abl Kinase, *J. Chem. Theory Comput.* 12 (2016) 5563–5574. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.6B00600>.
- [41] V. Modi, R.L. Dunbrack, Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (2019) 6818–6827. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1814279116;ISSUE:ISSUE:DOI>.
- [42] A.P. Kornev, S.S. Taylor, Defining the conserved internal architecture of a protein kinase, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 1804 (2010) 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.017>.
- [43] G. Zhu, K. Fujii, Y. Liu, V. Codrea, J. Herrero, S. Shaw, A single pair of acidic residues in the kinase major groove mediates strong substrate preference for P-2 or P-5 arginine in the AGC,

CAMK, and STE kinases families, *Journal of Biological Chemistry* 280 (2005) 36372–36379. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505031200>.

- [44] J. Hu, L.G. Ahuja, H.S. Meharena, N. Kannan, A.P. Kornev, S.S. Taylor, A.S. Shaw, Kinase regulation by hydrophobic spine assembly in cancer, *Mol. Cell. Biol.* 35 (2015) 264–276. <https://doi.org/10.1128/MCB.00943-14>.
- [45] A.P. Kornev, N.M. Haste, S.S. Taylor, L.F. Ten Eyck, Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 17783–17788. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0607656103>; WEBSITE: WEBSITE: PNAS-SITE; ISSUE: ISSUE: DOI.
- [46] C. Arter, L. Trask, S. Ward, S. Yeoh, R. Bayliss, Structural features of the protein kinase domain and targeted binding by small-molecule inhibitors, *J. Biol. Chem.* 298 (2022) 102247. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2022.102247>.
- [47] P. Furet, G. Caravatti, N. Lydon, J.P. Priestle, J.M. Sowadski, U. Trinks, P. Traxler, Modelling study of protein kinase inhibitors: binding mode of staurosporine and origin of the selectivity of CGP 52411, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 9 (1995) 465–472. <https://doi.org/10.1007/BF00124317>.
- [48] P. Traxler, P. Furet, Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors, *Pharmacol. Ther.* 82 (1999) 195–206. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00044-8).
- [49] P.M. Traxler, P. Furet, H. Mett, E. Buchdunger, T. Meyer, N. Lydon, 4-(Phenylamino)pyrrolopyrimidines: potent and selective, ATP site directed inhibitors of the EGF-receptor protein tyrosine kinase, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 2285–2292. <https://doi.org/10.1021/JM960118J>.
- [50] D. Fabbro, S. Ruetz, E. Buchdunger, S.W. Cowan-Jacob, G. Fendrich, J. Liebetanz, J. Mestan, T. O'Reilly, P. Traxler, B. Chaudhuri, H. Fretz, J. Zimmermann, T. Meyer, G. Caravatti, P. Furet, P.W. Manley, Protein kinases as targets for anticancer agents: From inhibitors to useful drugs, *Pharmacol. Ther.* 93 (2002) 79–98. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00179-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00179-1).
- [51] G. McMahon, L. Sun, C. Liang, C. Tang, Protein kinase inhibitors: structural determinants for target specificity, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 1 (1998) 131–146. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19649813>.
- [52] R.A. Engh, D. Bossemeyer, Structural aspects of protein kinase control - Role of conformational flexibility, *Pharmacol. Ther.* 93 (2002) 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00180-8).
- [53] R. Roskoski, A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors, *Pharmacol. Res.* 100 (2015) 1–23. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2015.07.010>.
- [54] J.A. Adams, Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases, *Chem. Rev.* 101 (2001) 2271–2290. <https://doi.org/10.1021/CR000230W>.
- [55] H. Möbitz, The ABC of protein kinase conformations, *Biochim. Biophys. Acta* 1854 (2015) 1555–1566. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2015.03.009>.

- [56] P.M.U. Ung, R. Rahman, A. Schlessinger, Redefining the Protein Kinase Conformational Space with Machine Learning, *Cell Chem. Biol.* 25 (2018) 916-924.e2. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2018.05.002>.
- [57] C. Arter, L. Trask, S. Ward, S. Yeoh, R. Bayliss, Structural features of the protein kinase domain and targeted binding by small-molecule inhibitors, *J. Biol. Chem.* 298 (2022) 102247. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2022.102247>.
- [58] H.S. Meharena, P. Chang, M.M. Keshwani, K. Oruganty, A.K. Nene, N. Kannan, S.S. Taylor, A.P. Kornev, Deciphering the structural basis of eukaryotic protein kinase regulation, *PLoS Biol.* 11 (2013). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001680>.
- [59] M. Azam, M.A. Seeliger, N.S. Gray, J. Kuriyan, G.Q. Daley, Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine, *Nature Structural & Molecular Biology* 2008 15:10 15 (2008) 1109–1118. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1486>.
- [60] F. Zuccotto, E. Ardini, E. Casale, M. Angiolini, Through the “Gatekeeper Door”: Exploiting the Active Kinase Conformation, *J. Med. Chem.* 53 (2009) 2681–2694. <https://doi.org/10.1021/JM901443H>.
- [61] S.S. Taylor, E. Radzio-Andzelm, T. Hunter, How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase, *FASEB J.* 9 (1995) 1255–1266. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.9.13.7557015>.
- [62] E.E. Thompson, A.P. Kornev, N. Kannan, C. Kim, L.F. Ten Eyck, S.S. Taylor, Comparative surface geometry of the protein kinase family, *Protein Sci.* 18 (2009) 2016–2026. <https://doi.org/10.1002/PRO.209>.
- [63] S.R. Hubbard, L. Wei, W.A. Hendrickson, Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor, *Nature* 372 (1994) 746–754. <https://doi.org/10.1038/372746A0>.
- [64] S. Sakkiiah, G. Ping Cao, S. P. Gupta, K. Woo Lee, Overview of the Structure and Function of Protein Kinases, *Curr. Enzym. Inhib.* 13 (2017). <https://doi.org/10.2174/1573408013666161226155608>.
- [65] K.C. Duong-Ly, J.R. Peterson, The Human Kinome and Kinase Inhibition, *Curr. Protoc. Pharmacol.* 60 (2013) 2.9.1-2.9.14. <https://doi.org/10.1002/0471141755.PH0209S60>.
- [66] G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome, *Science* 298 (2002) 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1075762>.
- [67] S.K. Hanks, Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective, *Genome Biol.* 4 (2003). <https://doi.org/10.1186/GB-2003-4-5-111>.
- [68] M.A. Lemmon, J. Schlessinger, Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 141 (2010) 1117–1134. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.06.011/ATTACHMENT/B383EB98-F844-43F4-878F-A14D3681EED4/MMC1.PDF>.
- [69] C. Wellbrock, M. Karasarides, R. Marais, The RAF proteins take centre stage, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 875–885. <https://doi.org/10.1038/NRM1498>.
- [70] G. Pearson, F. Robinson, T. Beers Gibson, B. Xu, M. Karandikar, K. Berman, M.H. Cobb, Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions, *Endocr. Rev.* 22 (2001) 153–183. <https://doi.org/10.1210/EDRV.22.2.0428>.

- [71] STE11 family | Enzymes | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY, (n.d.). <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=621> (accessed June 26, 2026).
- [72] U. Knippschild, M. Krüger, J. Richter, P. Xu, Balbina García-Reyes, C. Peifer, J. Halekotte, V. Bakulev, J. Bischof, The CK1 Family: Contribution to Cellular Stress Response and Its Role in Carcinogenesis, *Front. Oncol.* 4 (2014) 96. <https://doi.org/10.3389/FONC.2014.00096>.
- [73] R. Nusse, H.E. Varmus, Wnt genes, *Cell* 69 (1992) 1073–1087. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90630-U](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90630-U).
- [74] L.R. Pearce, D. Komander, D.R. Alessi, The nuts and bolts of AGC protein kinases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 9–22. <https://doi.org/10.1038/NRM2822>.
- [75] S.S. Hook, A.R. Means, Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41 (2001) 471–505. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.41.1.471>.
- [76] J.A. Ubersax, J.E. Ferrell, Mechanisms of specificity in protein phosphorylation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:7 8 (2007) 530–541. <https://doi.org/10.1038/nrm2203>.
- [77] L.R. Potter, Guanylyl cyclase structure, function and regulation, *Cell. Signal.* 23 (2011) 1921–1926. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2011.09.001>.
- [78] F.A. Barr, U. Gruneberg, Cytokinesis: placing and making the final cut, *Cell* 131 (2007) 847–860. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.11.011>.
- [79] G.K. Kanev, C. de Graaf, I.J.P. de Esch, R. Leurs, T. Würdinger, B.A. Westerman, A.J. Kooistra, The Landscape of Atypical and Eukaryotic Protein Kinases, *Trends Pharmacol. Sci.* 40 (2019) 818–832. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2019.09.002>.
- [80] D. Miranda-Saavedra, G.J. Barton, Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases, *Proteins* 68 (2007) 893–914. <https://doi.org/10.1002/PROT.21444>.
- [81] J. Middelbeek, K. Clark, H. Venselaar, M.A. Huynen, F.N. Van Leeuwen, The alpha-kinase family: an exceptional branch on the protein kinase tree, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2009) 875. <https://doi.org/10.1007/S00018-009-0215-Z>.
- [82] C.A. Lovejoy, D. Cortez, Common mechanisms of PIKK regulation, *DNA Repair (Amst)*. 8 (2009) 1004–1008. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.006>.
- [83] M. Laplante, D.M. Sabatini, mTOR signaling in growth control and disease, *Cell* 149 (2012) 274. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.03.017>.
- [84] R.A. Saxton, D.M. Sabatini, mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease, *Cell* 168 (2017) 960. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.02.004>.
- [85] X. Wang, X. Shen, Y. Yan, H. Li, Pyruvate dehydrogenase kinases (PDKs): an overview toward clinical applications, *Biosci. Rep.* 41 (2021) BSR20204402. <https://doi.org/10.1042/BSR20204402>.
- [86] N. LaRonde-LeBlanc, A. Wlodawer, The RIO kinases: An atypical protein kinase family required for ribosome biogenesis and cell cycle progression, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 1754 (2005) 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.037>.

- [87] P. Filippakopoulos, S. Knapp, Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation, *Nature Reviews Drug Discovery* 2014 13:5 13 (2014) 337–356. <https://doi.org/10.1038/nrd4286>.
- [88] R. Espinoza-Corral, P.K. Lundquist, The plastoglobule-localized protein AtABC1K6 is a Mn²⁺-dependent kinase necessary for timely transition to reproductive growth, *Journal of Biological Chemistry* 298 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101762>.
- [89] N. Jacquet, Y. Zhao, The ADCK Kinase Family: Key Regulators of Bioenergetics and Mitochondrial Function and Their Implications in Human Cancers, *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol. 26, Page 5783 26 (2025) 5783. <https://doi.org/10.3390/IJMS26125783>.
- [90] R.M. McAvera, L.J. Crawford, TIF1 Proteins in Genome Stability and Cancer, *Cancers (Basel)*. 12 (2020) 2094. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12082094>.
- [91] P. Wu, T.E. Nielsen, M.H. Clausen, Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs, *Drug Discov. Today* 21 (2016) 5–10. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2015.07.008>.
- [92] V. Asati, D.K. Mahapatra, S.K. Bharti, PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives, *Eur. J. Med. Chem.* 109 (2016) 314–341. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2016.01.012>.
- [93] B. Rah, R.A. Rather, G.R. Bhat, A.B. Baba, I. Mushtaq, M. Farooq, T. Yousuf, S.B. Dar, S. Parveen, R. Hassan, F. Mohammad, I. Qassim, A. Bhat, S. Ali, M.H. Zargar, D. Afroze, JAK/STAT Signaling: Molecular Targets, Therapeutic Opportunities, and Limitations of Targeted Inhibitions in Solid Malignancies, *Front. Pharmacol.* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.821344>.
- [94] C. Tomuleasa, A.B. Tigiu, R. Munteanu, C.S. Moldovan, D. Kegyes, A. Onaciu, D. Gulei, G. Ghiaur, H. Einsele, C.M. Croce, Therapeutic advances of targeting receptor tyrosine kinases in cancer, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2024 9:1 9 (2024) 201-. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01899-w>.
- [95] A. Mullard, FDA approves 100th small-molecule kinase inhibitor, *Nat. Rev. Drug Discov.* 24 (2025) 891–895. <https://doi.org/10.1038/D41573-025-00188-7>.
- [96] R. Roskoski, Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes, *Pharmacol. Res.* 103 (2016) 26–48. <https://doi.org/10.1016/J.PHR.2015.10.021>.
- [97] Z. Zhao, P.E. Bourne, Overview of Current Type I/II Kinase Inhibitors, in: *Next Generation Kinase Inhibitors: Moving Beyond the ATP Binding/Catalytic Sites*, Springer, Cham, 2020: pp. 13–28. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48283-1_2.
- [98] A.C. Dar, K.M. Shokat, The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling, *Annu. Rev. Biochem.* 80 (2011) 769–795. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-090308-173656>.
- [99] R. Martinez, A. Defnet, P. Shapiro, Avoiding or Co-Opting ATP Inhibition: Overview of Type III, IV, V, and VI Kinase Inhibitors, *Next Generation Kinase Inhibitors* (2020) 29. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48283-1_3.

- [100] L. Garuti, M. Roberti, G. Bottegoni, Irreversible protein kinase inhibitors, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 2981–2994. <https://doi.org/10.2174/092986711796391705>.
- [101] R.J. Thomson, M. Moshirfar, Y. Ronquillo, Tyrosine Kinase Inhibitors, *StatPearls* (2023).
- [102] X. Tian, H. Zhang, T. Heimbach, H. He, A. Buchbinder, M. Aghoghovbia, F. Hourcade-Potelleret, Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Overview of Nilotinib, a Selective Tyrosine Kinase Inhibitor, *J. Clin. Pharmacol.* 58 (2018) 1533–1540. <https://doi.org/10.1002/JCPH.1312>.
- [103] V.F. Roche, S.W. Zito, T.L. Lemke, D.A. Williams, Foye's principles of medicinal chemistry, (n.d.) 1626.
- [104] R. Buckingham, Martindale : the complete drug reference, (n.d.) 4852.
- [105] S. Wind, D. Schnell, T. Ebner, M. Freiwald, P. Stopfer, Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Afatinib, *Clin. Pharmacokinet.* 56 (2017) 235–250. <https://doi.org/10.1007/S40262-016-0440-1>.
- [106] D.R. Duckett, M.D. Cameron, Metabolism considerations for kinase inhibitors in cancer treatment, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 6 (2010) 1175–1193. <https://doi.org/10.1517/17425255.2010.506873>.
- [107] No Title, (n.d.). https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tyverb-epar-product-information_en.pdf.
- [108] D.T. Nardone-White, J.E. Bissada, A.A. Abouda, K.D. Jackson, Detoxication versus Bioactivation Pathways of Lapatinib in Vitro: UGT1A1 Catalyzes the Hepatic Glucuronidation of Debenzylated Lapatinib, *Drug Metabolism and Disposition* 49 (2021) 233–244. <https://doi.org/10.1124/DMD.120.000236/-/DC1>.
- [109] R.A. Gottlieb, P.K. Mehta, Cardio-oncology : principles, prevention and management, in: n.d.: p. 358.
- [110] G.J. Roth, R. Binder, F. Colbatzky, C. Dallinger, R. Schlenker-Herceg, F. Hilberg, S.L. Wollin, R. Kaiser, Nintedanib: from discovery to the clinic, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 1053–1063. <https://doi.org/10.1021/JM501562A>.
- [111] Overview | Nintedanib for treating idiopathic pulmonary fibrosis when forced vital capacity is above 80% predicted | Guidance | NICE, (n.d.).
- [112] I. Glaspole, F. Bonella, E. Bargagli, M.K. Glassberg, F. Caro, W. Stansen, M. Quaresma, L. Orsatti, E. Bendstrup, Efficacy and safety of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis who are elderly or have comorbidities, *Respir. Res.* 22 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12931-021-01695-Y/FIGURES/3>.
- [113] L. Wollin, E. Wex, A. Pautsch, G. Schnapp, K.E. Hostettler, S. Stowasser, M. Kolb, Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, *Eur. Respir. J.* 45 (2015) 1434. <https://doi.org/10.1183/09031936.00174914>.
- [114] P. Wu, T.E. Nielsen, M.H. Clausen, FDA-approved small-molecule kinase inhibitors, *Trends Pharmacol. Sci.* 36 (2015) 422–439. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2015.04.005>.

- [115] T. De Pas, L. Pala, C. Catania, F. Conforti, Molecular and clinical features of second-generation anaplastic lymphoma kinase inhibitors: ceritinib, <https://doi.org/10.2217/FON-2017-0262> 13 (2017) 2629–2644. <https://doi.org/10.2217/FON-2017-0262>.
- [116] L. Zhong, Y. Li, L. Xiong, W. Wang, M. Wu, T. Yuan, W. Yang, C. Tian, Z. Miao, T. Wang, S. Yang, Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 6:1 6 (2021) 1–48. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w>.
- [117] R. Roskoski, Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2023 update, *Pharmacol. Res.* 187 (2023). <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2022.106552>.
- [118] E.S. Ali, K. Mitra, S. Akter, S. Ramproshad, B. Mondal, I.N. Khan, M.T. Islam, J. Sharifi-Rad, D. Calina, W.C. Cho, Recent advances and limitations of mTOR inhibitors in the treatment of cancer, *Cancer Cell Int.* 22 (2022). <https://doi.org/10.1186/S12935-022-02706-8>.
- [119] K.H. Schreiber, S.I. Arriola Apelo, D. Yu, J.A. Brinkman, M.C. Velarde, F.A. Syed, C.Y. Liao, E.L. Baar, K.A. Carbajal, D.S. Sherman, D. Ortiz, R. Brunauer, S.E. Yang, S.T. Tzannis, B.K. Kennedy, D.W. Lamming, A novel rapamycin analog is highly selective for mTORC1 in vivo, *Nature Communications* 2019 10:1 10 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11174-0>.
- [120] EU/3/21/2559 | European Medicines Agency, (n.d.). <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu-3-21-2559> (accessed October 18, 2023).
- [121] O. Martín-Cámara, M. Arribas, G. Wells, M. Morales-Tenorio, Á. Martín-Requero, G. Porras, A. Martínez, G. Giorgi, P. López-Alvarado, I. Lastres-Becker, J.C. Menéndez, Multitarget Hybrid Fasudil Derivatives as a New Approach to the Potential Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis, *J. Med. Chem.* 65 (2022) 1867–1882. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.1C01255/SUPPL_FILE/JM1C01255_SI_004.CS V.
- [122] V. Gupta, N. Gupta, I.H. Shaik, R. Mehvar, I.F. McMurtry, M. Oka, E. Nozik-Grayck, M. Komatsu, F. Ahsan, Liposomal Fasudil, a Rho-Kinase Inhibitor, for Prolonged Pulmonary Preferential Vasodilation in Pulmonary Arterial Hypertension, *J. Control. Release* 167 (2013) 189. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2013.01.011>.
- [123] J.R. Brown, K.R. Auger, Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery, *BMC Evolutionary Biology* 2011 11:1 11 (2011) 4-. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-4>.
- [124] T.B. Ware, K.L. Hsu, Advances in chemical proteomic evaluation of lipid kinases – DAG kinases as a case study, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 65 (2021) 101. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2021.06.007>.
- [125] W.L. Santos, K.R. Lynch, Drugging Sphingosine Kinases, *ACS Chem. Biol.* 10 (2014) 225–233. <https://doi.org/10.1021/CB5008426>.
- [126] R. Diaz Escarcega, L.D. McCullough, A.S. Tsvetkov, The Functional Role of Sphingosine Kinase 2, *Front. Mol. Biosci.* 8 (2021) 683767. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2021.683767/BIBTEX>.

- [127] M. Sugiura, K. Kono, H. Liu, T. Shimizugawa, H. Minekura, S. Spiegel, T. Kohama, Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23294–23300. <https://doi.org/10.1074/JBC.M201535200>.
- [128] M. Bektas, S.G. Payne, H. Liu, S. Goparaju, S. Milstien, S. Spiegel, A novel acylglycerol kinase that produces lysophosphatidic acid modulates cross talk with EGFR in prostate cancer cells, *J. Cell Biol.* 169 (2005) 801–811. <https://doi.org/10.1083/JCB.200407123>.
- [129] L.M. Thorpe, H. Yuzugullu, J.J. Zhao, PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting, *Nature Reviews Cancer* 15:1 15 (2014) 7–24. <https://doi.org/10.1038/nrc3860>.
- [130] F. Janku, T.A. Yap, F. Meric-Bernstam, Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15 (2018) 273–291. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2018.28>.
- [131] Y. Liu, W.Z. Wan, Y. Li, G.L. Zhou, X.G. Liu, Recent development of ATP-competitive small molecule phosphatidylinositol-3-kinase inhibitors as anticancer agents, *Oncotarget* 8 (2017) 7181–7200. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.12742>.
- [132] L. Bi, I. Okabe, D.J. Bernard, R.L. Nussbaum, Early embryonic lethality in mice deficient in the p110 β catalytic subunit of PI 3-kinase, *Mamm. Genome* 13 (2002) 169–172. <https://doi.org/10.1007/BF02684023>.
- [133] L. Bi, I. Okabe, D.J. Bernard, A. Wynshaw-Boris, R.L. Nussbaum, Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110 α subunit of phosphoinositide 3-kinase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 10963–10968. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.16.10963>.
- [134] E. Clayton, G. Bardi, S.E. Bell, D. Chantry, C. Peter Downes, A. Gray, L.A. Humphries, D. Rawlings, H. Reynolds, E. Vigorito, M. Turner, A Crucial Role for the p110 δ Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase in B Cell Development and Activation, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 753. <https://doi.org/10.1084/JEM.20020805>.
- [135] T. Sasaki, J. Irie-Sasaki, R.G. Jones, A.J. Oliveira-Dos-Santos, W.L. Stanford, B. Bolon, A. Wakeham, A. Itie, D. Bouchard, I. Kozieradzki, N. Joza, T.W. Mak, P.S. Ohashi, A. Suzuki, J.M. Penninger, Function of PI3K γ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration, *Science* (1979). 287 (2000) 1040–1046. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5455.1040;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>.
- [136] L.E. Rameh, C.S. Chen, L.C. Cantley, Phosphatidylinositol (3,4,5)P $_3$ interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins, *Cell* 83 (1995) 821–830. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90195-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90195-7).
- [137] P. Rodriguez-Viciana, P.H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M.J. Fry, M.D. Waterfield, J. Downward, Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras, *Nature* 370 (1994) 527–532. <https://doi.org/10.1038/370527A0>.
- [138] S. Gupta, A.R. Ramjaun, P. Haiko, Y. Wang, P.H. Warne, B. Nicke, E. Nye, G. Stamp, K. Alitalo, J. Downward, Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110 α is required for ras-driven tumorigenesis in mice, *Cell* 129 (2007) 957–968. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.03.051>.

- [139] C. Brock, M. Schaefer, H.P. Reusch, C. Czupalla, M. Michalke, K. Spicher, G. Schultz, B. Nürnberg, Roles of G $\beta\gamma$ in membrane recruitment and activation of p110 γ /p101 phosphoinositide 3-kinase γ , *J. Cell Biol.* 160 (2003) 89. <https://doi.org/10.1083/JCB.200210115>.
- [140] O. Vadas, H.A. Dbouk, A. Shymanets, O. Perisic, J.E. Burke, W.F.A. Saab, B.D. Khalil, C. Harteneck, A.R. Bresnick, B. Nürnberg, J.M. Backer, R.L. Williams, Molecular determinants of PI3K γ -mediated activation downstream of G-protein-coupled receptors (GPCRs), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 18862–18867. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1304801110;WGROU:STRING:PUBLICATION>.
- [141] M.E. Pacold, S. Suire, O. Perisic, S. Lara-Gonzalez, C.T. Davis, E.H. Walker, P.T. Hawkins, L. Stephens, J.F. Eccleston, R.L. Williams, Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase γ , *Cell* 103 (2000) 931–944. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00196-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00196-3).
- [142] S. Jia, Z. Liu, S. Zhang, P. Liu, L. Zhang, S.H. Lee, J. Zhang, S. Signoretti, M. Loda, T.M. Roberts, J.J. Zhao, Essential roles of PI(3)K-p110 β in cell growth, metabolism and tumorigenesis, *Nature* 454 (2008) 776–779. <https://doi.org/10.1038/NATURE07091>.
- [143] H.A. Dbouk, O. Vadas, A. Shymanets, J.E. Burke, R.S. Salamon, B.D. Khalil, M.O. Barrett, G.L. Waldo, C. Surve, C. Hsueh, O. Perisic, C. Harteneck, P.R. Shepherd, T.K. Harden, A. V. Smrcka, R. Taussig, A.R. Bresnick, B. Nürnberg, R.L. Williams, J.M. Backer, G protein-coupled receptor-mediated activation of p110 β by G $\beta\gamma$ is required for cellular transformation and invasiveness, *Sci. Signal.* 5 (2012). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2003264>.
- [144] R. Fritsch, I. De Krijger, K. Fritsch, R. George, B. Reason, M.S. Kumar, M. Diefenbacher, G. Stamp, J. Downward, RAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms, *Cell* 153 (2013) 1050. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.04.031>.
- [145] J.K. Klarlund, A. Guilherme, J.J. Holik, J. V. Virbasius, A. Chawla, M.P. Czech, Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains, *Science* 275 (1997) 1927–1930. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5308.1927>.
- [146] H.C.E. Welch, W.J. Coadwell, C.D. Ellson, G.J. Ferguson, S.R. Andrews, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, P.T. Hawkins, L.R. Stephens, P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P $_3$ - and g $\beta\gamma$ -regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac, *Cell* 108 (2002) 809–821. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00663-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00663-3).
- [147] S. Krugmann, K.E. Anderson, S.H. Ridley, N. Risso, A. McGregor, J. Coadwell, K. Davidson, A. Eguinoa, C.D. Ellson, P. Lipp, M. Manifava, N. Ktistakis, G. Painter, J.W. Thuring, M.A. Cooper, Z.Y. Lim, A.B. Holmes, S.K. Dove, R.H. Michell, A. Grewal, A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, L.R. Stephens, P.T. Hawkins, Identification of ARAP3, a novel PI3K effector regulating both Arf and Rho GTPases, by selective capture on phosphoinositide affinity matrices, *Mol. Cell* 9 (2002) 95–108. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00434-3).
- [148] R. Parsons, Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway, *Semin. Cell Dev. Biol.* 15 (2004) 171–176. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2003.12.021>.

- [149] Y.R. Lee, M. Chen, P.P. Pandolfi, The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018 19:9 19 (2018) 547–562. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0015-0>.
- [150] S. Jia, Z. Liu, S. Zhang, P. Liu, L. Zhang, S.H. Lee, J. Zhang, S. Signoretti, M. Loda, T.M. Roberts, J.J. Zhao, Essential roles of PI(3)K-p110 β in cell growth, metabolism and tumorigenesis, *Nature* 454 (2008) 776–779. <https://doi.org/10.1038/NATURE07091>.
- [151] J. Guillermet-Guibert, K. Bjorklof, A. Salpekar, C. Gonella, F. Ramadani, A. Bilancio, S. Meek, A.J.H. Smith, K. Okkenhaug, B. Vanhaesebroeck, The p110 β isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 γ , *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 8292–8297. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0707761105>;WGROU:STRING:PUBLICATION.
- [152] S. Jia, X. Gao, S.H. Lee, S.M. Maira, X. Wu, E.C. Stack, S. Signoretti, M. Loda, J.J. Zhao, T.M. Roberts, Opposing effects of androgen deprivation and targeted therapy on prostate cancer prevention, *Cancer Discov.* 3 (2013) 44–51. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0262>.
- [153] F. Schmit, T. Utermark, S. Zhang, Q. Wang, T. Von, T.M. Roberts, J.J. Zhao, PI3K isoform dependence of PTEN-deficient tumors can be altered by the genetic context, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 6395–6400. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1323004111>.
- [154] G. Hoxhaj, B.D. Manning, The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism, *Nature Reviews Cancer* 2019 20:2 20 (2019) 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>.
- [155] B. Markman, R. Dienstmann, J. Tabernero, Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs., *Oncotarget* 1 (2010) 530–543. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.188>,.
- [156] D.A. Fruman, C. Rommel, PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities, *Nature Reviews Drug Discovery* 2014 13:2 13 (2014) 140–156. <https://doi.org/10.1038/nrd4204>.
- [157] Structural Basis for Regulation of Phosphoinositide Kinases and Their Involvement in Human Disease | Elsevier Enhanced Reader, (n.d.). <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1097276518306397?token=3A4E0265018961DD973972C1982F2076ED28E2492476C421BC1C1C002DC19223974C408CCF233E1473C44BBE32BE884&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220612190349> (accessed June 12, 2022).
- [158] C.H. Huang, D. Mandelker, O. Schmidt-Kittler, Y. Samuels, V.E. Velculescu, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, S.B. Gabelli, L.M. Amzel, The structure of a human p110 α /p85 α complex elucidates the effects of oncogenic PI3K α mutations, *Science* (1979). 318 (2007) 1744–1748. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1150799/SUPPL_FILE/HUANG-SOM.PDF.
- [159] S.B. Gabelli, D. Mandelker, O. Schmidt-Kittler, B. Vogelstein, L.M. Amzel, Somatic mutations in PI3K α : Structural basis for enzyme activation and drug design, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804 (2010) 533–540. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2009.11.020>.
- [160] M.S. Miller, P.E. Thompson, S.B. Gabelli, Structural determinants of isoform selectivity in pi3k inhibitors, *Biomolecules* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/BIOM9030082>,.

- [161] D. Mandelker, S.B. Gabelli, O. Schmidt-Kittler, J. Zhu, I. Cheong, C.H. Huang, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, L.M. Amzel, A frequent kinase domain mutation that changes the interaction between PI3K α and the membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 16996–17001. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0908444106>;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION.
- [162] X. Liu, S. Yang, J.R. Hart, Y. Xu, X. Zou, H. Zhang, Q. Zhou, T. Xia, Y. Zhang, D. Yang, M.W. Wang, P.K. Vogt, Cryo-EM structures of PI3K α reveal conformational changes during inhibition and activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118 (2021) e2109327118. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2109327118>;WEBSITE:WEBSITE:PNAS-SITE;WGROUPE:STRING:PUBLICATION.
- [163] J. Liang, J.M. Slingerland, Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression., *Cell Cycle* 2 (2003) 336–342. <https://doi.org/10.4161/cc.2.4.433>.
- [164] T. Bohnacker, A.E. Prota, F. Beaufils, J.E. Burke, A. Melone, A.J. Inglis, D. Rageot, A.M. Sele, V. Cmiljanovic, N. Cmiljanovic, K. Bargsten, A. Aher, A. Akhmanova, J.F. Díaz, D. Fabbro, M. Zvelebil, R.L. Williams, M.O. Steinmetz, M.P. Wymann, Deconvolution of Buparlisib's mechanism of action defines specific PI3K and tubulin inhibitors for therapeutic intervention, *Nat. Commun.* 8 (2017). <https://doi.org/10.1038/ncomms14683>.
- [165] B. Vanhaesebroeck, M.W.D. Perry, J.R. Brown, F. André, K. Okkenhaug, PI3K inhibitors are finally coming of age, *Nature Reviews Drug Discovery* 20:10 20 (2021) 741–769. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00209-1>.
- [166] Y. Zhang, H. Yan, Z. Xu, B. Yang, P. Luo, Q. He, Molecular basis for class side effects associated with PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 15 (2019) 767–774. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1663169>.
- [167] R. Mishra, H. Patel, S. Alanazi, M.K. Kilroy, J.T. Garrett, PI3K Inhibitors in Cancer: Clinical Implications and Adverse Effects, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22073464>.
- [168] A. Hanlon, D.M. Brander, Managing toxicities of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitors, *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2020 (2020) 346–356. <https://doi.org/10.1182/HEMATOLOGY.2020000119>.
- [169] P. Castel, E. Toska, J.A. Engelman, M. Scaltriti, The present and future of PI3K inhibitors for cancer therapy, *Nat. Cancer* 2 (2021) 587. <https://doi.org/10.1038/S43018-021-00218-4>.
- [170] D. Presti, E. Quaquarelli, The PI3K/AKT/mTOR and CDK4/6 Pathways in Endocrine Resistant HR+/HER2- Metastatic Breast Cancer: Biological Mechanisms and New Treatments, *Cancers (Basel)*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11091242>.
- [171] E. Remer, M. Badarni, E. Hikri, A. Dayan, L. Levi, A. Popovtzer, M. Iraqi, A. Porgador, B.Z. Joshua, G. Bachar, M. Elkabets, M. Scaltriti, A. Mizrachi, CDK 4/6 Inhibition Overcomes Acquired and Inherent Resistance to PI3K α Inhibition in Pre-Clinical Models of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *J. Clin. Med.* 9 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.3390/jcm9103214>.
- [172] Y. He, M.M. Sun, G.G. Zhang, J. Yang, K.S. Chen, W.W. Xu, B. Li, Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy, *Signal Transduct. Target. Ther.* 6 (2021). <https://doi.org/10.1038/S41392-021-00828-5>.

- [173] D. Kong, Z. Zhang, PI3K/AKT Inhibitors as Sensitizing Agents for Cancer Chemotherapy, Protein Kinase Inhibitors as Sensitizing Agents for Chemotherapy (2019) 187–205. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816435-8.00012-2>.
- [174] B. Markman, R. Dienstmann, J. Tabernero, Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs, *Oncotarget* 1 (2010) 530–543. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.188>.
- [175] X. Wu, Y. Xu, Q. Liang, X. Yang, J. Huang, J. Wang, H. Zhang, J. Shi, Recent Advances in Dual PI3K/mTOR Inhibitors for Tumour Treatment, *Front. Pharmacol.* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.875372>.
- [176] P.M. LoRusso, Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Solid Tumors, *Journal of Clinical Oncology* 34 (2016) 3803. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.0018>.
- [177] S.M. Maira, F. Stauffer, J. Brueggen, P. Furet, C. Schnell, C. Fritsch, S. Brachmann, P. Chène, A. De Pover, K. Schoemaker, D. Fabbro, D. Gabriel, M. Simonen, L. Murphy, P. Finan, W. Sellers, C. García-Echeverría, Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 1851–1863. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0017>.
- [178] G.I. Shapiro, K.M. Bell-McGuinn, J.R. Molina, J. Bendell, J. Spicer, E.L. Kwak, S.S. Pandya, R. Millham, G. Borzillo, K.J. Pierce, L. Han, B.E. Houk, J.D. Gallo, M. Alsina, I. Braña, J. Tabernero, First-in-Human Study of PF-05212384 (PKI-587), a Small-Molecule, Intravenous, Dual Inhibitor of PI3K and mTOR in Patients with Advanced Cancer, *Clin. Cancer Res.* 21 (2015) 1888–1895. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1306>.
- [179] Definition of PI3K/mTOR inhibitor LY3023414 - NCI Drug Dictionary - NCI, (n.d.). <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/samotolisib> (accessed May 6, 2026).
- [180] VIKTORIA-2: Breast Cancer - Celcuity, (n.d.). <https://www.celcuity.com/clinical-trials/viktoria-2/> (accessed May 6, 2026).
- [181] A. Akinleye, P. Avvaru, M. Furqan, Y. Song, D. Liu, Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics, *J. Hematol. Oncol.* 6 (2013). <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-88>.
- [182] X. Wang, J. Ding, L.H. Meng, PI3K isoform-selective inhibitors: Next-generation targeted cancer therapies, *Acta Pharmacol. Sin.* 36 (2015) 1170–1176. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.71>.
- [183] M. Graupera, J. Guillermet-Guibert, L.C. Foukas, L.K. Phng, R.J. Cain, A. Salpekar, W. Pearce, S. Meek, J. Millan, P.R. Cutillas, A.J.H. Smith, A.J. Ridley, C. Ruhrberg, H. Gerhardt, B. Vanhaesebroeck, Angiogenesis selectively requires the p110 α isoform of PI3K to control endothelial cell migration, *Nature* 2008 453:7195 453 (2008) 662–666. <https://doi.org/10.1038/nature06892>.
- [184] M. Frazzetto, C. Suphioglu, J. Zhu, O. Schmidt-Kittler, I.G. Jennings, S.L. Cranmer, S.P. Jackson, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, P.E. Thompson, Dissecting isoform selectivity of PI3K inhibitors: the role of non-conserved residues in the catalytic pocket, *Biochem. J.* 414 (2008) 383–390. <https://doi.org/10.1042/BJ20080512>.

- [185] Z. Zheng, S.I. Amran, P.E. Thompson, I.G. Jennings, Isoform-selective inhibition of phosphoinositide 3-kinase: Identification of a New Region of nonconserved amino acids critical for p110 α inhibition, *Mol. Pharmacol.* 80 (2011) 657–664. <https://doi.org/10.1124/mol.111.072546>.
- [186] A. Berndt, S. Miller, O. Williams, D.D. Le, B.T. Houseman, J.I. Pacold, F. Gorrec, W.C. Hon, Y. Liu, C. Rommel, P. Gaillard, T. Rückle, M.K. Schwarz, K.M. Shokat, J.P. Shaw, R.L. Williams, The p110 δ structure: mechanisms for selectivity and potency of new PI(3)K inhibitors, *Nature Chemical Biology* 2010 6:2 6 (2010) 117–124. <https://doi.org/10.1038/nchembio.293>.
- [187] T. Wilhoit, PharmD, J. M. Patrick, PharmD, BCOP, M. B. May, PharmD, BCOP, Alpelisib: A Novel Therapy for Patients With PIK3CA-Mutated Metastatic Breast Cancer, *J. Adv. Pract. Oncol.* 11 (2020) 768. <https://doi.org/10.6004/JADPRO.2020.11.7.9>.
- [188] S. Loibl, P. Poortmans, M. Morrow, C. Denkert, G. Curigliano, Breast cancer, *The Lancet* 397 (2021) 1750–1769. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32381-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32381-3).
- [189] S. Dent, J. Cortés, Y.H. Im, V. Diéras, N. Harbeck, I.E. Krop, T.R. Wilson, N. Cui, F. Schimmoller, J.Y. Hsu, J. He, M. De Laurentiis, S. Sousa, P. Drullinsky, W. Jacot, Phase III randomized study of taselisib or placebo with fulvestrant in estrogen receptor-positive, PIK3CA-mutant, HER2-negative, advanced breast cancer: the SANDPIPER trial, *Ann. Oncol.* 32 (2020) 197. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.10.596>.
- [190] H.A. Blair, Inavolisib: First Approval, *Drugs* 85 (2025) 271–278. <https://doi.org/10.1007/S40265-024-02136-Y>.
- [191] De, S. K., Inavolisib: A Selective Inhibitor of Mutant PI3K α for the Treatment of Breast Cancer, <Http://Www.Xiahepublishing.Com/> 0 (2025) 0–0. <https://doi.org/10.14218/ONA.2025.00012>.
- [192] A. Varkaris, E. Pazolli, H. Gunaydin, Q. Wang, L. Pierce, A.A. Boezio, A. Bulku, L. Dipietro, C. Fridrich, A. Frost, F. Giordanetto, E.P. Hamilton, K. Harris, M. Holliday, T.L. Hunter, A. Iskandar, Y. Ji, A. Larivée, J.R. Larochelle, A. Lescarbeau, F. Llambi, B. Lormil, M.M. Mader, B.G. Mar, I. Martin, T.H. McLean, K. Michelsen, Y. Pechersky, E. Puente-Poushnejad, K. Raynor, D. Rogala, R. Samadani, A.M. Schram, K. Shortsleeves, S. Swaminathan, S. Tajmir, G. Tan, Y. Tang, R. Valverde, B. Wehrenberg, J. Wilbur, B.R. Williams, H. Zeng, H. Zhang, W.P. Walters, B.B. Wolf, D.E. Shaw, D.A. Bergstrom, J. Watters, J.S. Fraser, P.D. Fortin, D.R. Kipp, Discovery and Clinical Proof-of-Concept of RLY-2608, a First-in-Class Mutant-Selective Allosteric PI3K α Inhibitor That Decouples Antitumor Activity from Hyperinsulinemia, *Cancer Discov.* 14 (2023) 240. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-0944>.
- [193] L. Buckbinder, D.J. St. Jean, T. Tieu, B. Ladd, B. Hilbert, W. Wang, J.T. Alltucker, S. Manimala, G. V. Kryukov, N. Brooijmans, G. Dowdell, P. Jonsson, M. Huff, A. Guzman-Perez, E.L. Jackson, M.D. Goncalves, D.D. Stuart, STX-478, a Mutant-Selective, Allosteric PI3K α Inhibitor Spares Metabolic Dysfunction and Improves Therapeutic Response in PI3K α -Mutant Xenografts, *Cancer Discov.* 13 (2023) 2432. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-23-0396>.
- [194] Definition of mutant-selective PI3K-alpha H1047R inhibitor LOXO-783 - NCI Drug Dictionary - NCI, (n.d.). <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/mutant-selective-pi3k-alpha-h1047r-inhibitor-loxo-783> (accessed May 6, 2026).

- [195] M. Yu, J. Chen, Z. Xu, B. Yang, Q. He, P. Luo, H. Yan, X. Yang, Development and safety of PI3K inhibitors in cancer, *Arch. Toxicol.* 97 (2023) 635. <https://doi.org/10.1007/S00204-023-03440-4>.
- [196] P. Wu, T.E. Nielsen, M.H. Clausen, FDA-approved small-molecule kinase inhibitors, *Trends Pharmacol. Sci.* 36 (2015) 422–439. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2015.04.005>.
- [197] S.K. Niazi, Z. Mariam, Computer-Aided Drug Design and Drug Discovery: A Prospective Analysis, *Pharmaceuticals* 17 (2023) 22. <https://doi.org/10.3390/ph17010022>.
- [198] L. Li, S. Liu, B. Wang, F. Liu, S. Xu, P. Li, Y. Chen, An Updated Review on Developing Small Molecule Kinase Inhibitors Using Computer-Aided Drug Design Approaches, *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 13953 24 (2023) 13953. <https://doi.org/10.3390/IJMS241813953>.
- [199] R.A. Goodnow, Hit and lead identification: Integrated technology-based approaches, *Drug Discov. Today Technol.* 3 (2006) 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2006.12.009>.
- [200] E. Martin, S. Knapp, R.A. Engh, H. Moebitz, T. Varin, B. Roux, J. Meiler, V. Berdini, A. Baumann, M. Vieth, Perspective on Computational and Structural Aspects of Kinase Discovery from IPK2014, *Biochim. Biophys. Acta* 1854 (2015) 1595. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.03.014>.
- [201] V. Pratap Reddy Gajulapalli, Development of Kinase-Centric Drugs: A Computational Perspective, *ChemMedChem* 18 (2023) e202200693. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200693>.
- [202] F. Miljković, J. Bajorath, Kinase Drug Discovery: Impact of Open Science and Artificial Intelligence, *Mol. Pharm.* 21 (2024) 4849–4859. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.4c00659>.
- [203] A. V. Sadybekov, V. Katritch, Computational approaches streamlining drug discovery, *Nature* 2023 616:7958 616 (2023) 673–685. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05905-z>.
- [204] G. Sliwoski, S. Kothiwale, J. Meiler, E.W. Lowe, Computational Methods in Drug Discovery, *Pharmacol. Rev.* 66 (2014) 334. <https://doi.org/10.1124/PR.112.007336>.
- [205] S.J.Y. Macalino, V. Gosu, S. Hong, S. Choi, Role of computer-aided drug design in modern drug discovery, *Arch. Pharm. Res.* 38 (2015) 1686–1701. <https://doi.org/10.1007/S12272-015-0640-5>.
- [206] H. Wei, J.A. McCammon, Structure and dynamics in drug discovery, *Npj Drug Discovery* 2024 1:1 1 (2024) 1-. <https://doi.org/10.1038/s44386-024-00001-2>.
- [207] J. Vázquez, M. López, E. Gibert, E. Herrero, F. Javier Luque, Merging Ligand-Based and Structure-Based Methods in Drug Discovery: An Overview of Combined Virtual Screening Approaches, *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 4723 25 (2020) 4723. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25204723>.
- [208] C. Acharya, A. Coop, J. E. Polli, A. D. MacKerell, Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach, *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* 7 (2011) 10–22. <https://doi.org/10.2174/157340911793743547>.
- [209] S.S. Ou-Yang, J.Y. Lu, X.Q. Kong, Z.J. Liang, C. Luo, H. Jiang, Computational drug discovery, *Acta Pharmacol. Sin.* 33 (2012) 1131–1140. <https://doi.org/10.1038/APS.2012.109>.

- [210] L.G. Ferreira, R.N. Dos Santos, G. Oliva, A.D. Andricopulo, Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies, *Molecules* 2015, Vol. 20, Pages 13384-13421 20 (2015) 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES200713384>.
- [211] PDB Reaches a New Milestone: 200,000+ Entries, (n.d.). <https://www.rcsb.org/news/639b9e337f8444f313d20414> (accessed February 21, 2026).
- [212] T.L. Blundell, S. Patel, High-throughput X-ray crystallography for drug discovery, *Curr. Opin. Pharmacol.* 4 (2004) 490–496. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2004.04.007>.
- [213] A. Cavalli, X. Salvatella, C.M. Dobson, M. Vendruscolo, Protein structure determination from NMR chemical shifts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 9615–9620. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0610313104;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>.
- [214] K.M. Yip, N. Fischer, E. Paknia, A. Chari, H. Stark, Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM, *Nature* 2020 587:7832 587 (2020) 157–161. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2833-4>.
- [215] E.W. Sayers, J. Beck, E.E. Bolton, J.R. Brister, J. Chan, R. Connor, M. Feldgarden, A.M. Fine, K. Funk, J. Hoffman, S. Kannan, C. Kelly, W. Klimke, S. Kim, S. Lathrop, A. Marchler-Bauer, T.D. Murphy, C. O’Sullivan, E. Schmieder, Y. Skripchenko, A. Stine, F. Thibaud-Nissen, J. Wang, J. Ye, E. Zellers, V.A. Schneider, K.D. Pruitt, Database resources of the National Center for Biotechnology Information in 2025, *Nucleic Acids Res.* 53 (2024) D20. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae979>.
- [216] E.P. Carpenter, K. Beis, A.D. Cameron, S. Iwata, Overcoming the challenges of membrane protein crystallography, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (2008) 581. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.07.001>.
- [217] Y. Guo, Be Cautious with Crystal Structures of Membrane Proteins or Complexes Prepared in Detergents, *Crystals* 2020, Vol. 10, Page 86 10 (2020) 86. <https://doi.org/10.3390/cryst10020086>.
- [218] M.A. Martí-Renom, A.C. Stuart, A. Fiser, R. Sánchez, F. Melo, A. Šali, Comparative protein structure modeling of genes and genomes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29 (2000) 291–325. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.291>.
- [219] M.M. Gromiha, R. Nagarajan, S. Selvaraj, Protein Structural Bioinformatics: An Overview, *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* 1–3 (2019) 445–459. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20278-1>.
- [220] V. de A. Paiva, I. de S. Gomes, C.R. Monteiro, M.V. Mendonça, P.M. Martins, C.A. Santana, V. Gonçalves-Almeida, S.C. Izidoro, R.C. de Melo-Minardi, S. de A. Silveira, Protein structural bioinformatics: An overview, *Comput. Biol. Med.* 147 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2022.105695>.
- [221] L.M.F. Bertoline, A.N. Lima, J.E. Krieger, S.K. Teixeira, Before and after AlphaFold2: An overview of protein structure prediction, *Frontiers in Bioinformatics* 3 (2023) 1120370. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2023.1120370>.
- [222] L. Chen, Q. Li, K.F.A. Nasif, Y. Xie, B. Deng, S. Niu, S. Pouriyeh, Z. Dai, J. Chen, C.Y. Xie, AI-Driven Deep Learning Techniques in Protein Structure Prediction, *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 8426 25 (2024) 8426. <https://doi.org/10.3390/IJMS25158426>.

- [223] J. Abramson, J. Adler, J. Dunger, R. Evans, T. Green, A. Pritzel, O. Ronneberger, L. Willmore, A.J. Ballard, J. Bambrick, S.W. Bodenstein, D.A. Evans, C.C. Hung, M. O'Neill, D. Reiman, K. Tunyasuvunakool, Z. Wu, A. Žemgulytė, E. Arvaniti, C. Beattie, O. Bertolli, A. Bridgland, A. Cherepanov, M. Congreve, A.I. Cowen-Rivers, A. Cowie, M. Figurnov, F.B. Fuchs, H. Gladman, R. Jain, Y.A. Khan, C.M.R. Low, K. Perlin, A. Potapenko, P. Savy, S. Singh, A. Stecula, A. Thillaisundaram, C. Tong, S. Yakneen, E.D. Zhong, M. Zielinski, A. Židek, V. Bapst, P. Kohli, M. Jaderberg, D. Hassabis, J.M. Jumper, Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3, *Nature* 2024 630:8016 630 (2024) 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.
- [224] F.A. Binbay, D.C. Rathod, A.A.P. George, D. Imhof, Quality Assessment of Selected Protein Structures Derived from Homology Modeling and AlphaFold, *Pharmaceuticals (Basel)* 16 (2023). <https://doi.org/10.3390/PH16121662>.
- [225] A. Jabeen, J.G. Oakeshott, S.F. Lee, S. Ranganathan, P.W. Taylor, Template-based modeling of insect odorant receptors outperforms AlphaFold3 for ligand binding predictions, *Scientific Reports* 2024 14:1 14 (2024) 29084-. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-80094-x>.
- [226] A. Comte, M. Lalis, L. Brajon, R. Moracci, N. Montagné, J. Topin, E.J. Joly, S. Fiorucci, Accelerating Ligand Discovery for Insect Odorant Receptors, *Int. J. Biol. Sci.* 21 (2025) 2101–2117. <https://doi.org/10.7150/ijbs.105648>.
- [227] D.B. Kitchen, H. Decornez, J.R. Furr, J. Bajorath, Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 935–949. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>.
- [228] S.A. Hollingsworth, R.O. Dror, Molecular Dynamics Simulation for All, *Neuron* 99 (2018) 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>.
- [229] E. Lionta, G. Spyrou, D. Vassilatis, Z. Cournia, Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances, *Curr. Top. Med. Chem.* 14 (2014) 1923–1938. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140929124445>.
- [230] F. Ban, K. Dalal, H. Li, E. LeBlanc, P.S. Rennie, A. Cherkasov, Best Practices of Computer-Aided Drug Discovery: Lessons Learned from the Development of a Preclinical Candidate for Prostate Cancer with a New Mechanism of Action, *J. Chem. Inf. Model.* 57 (2017) 1018–1028. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.7B00137>.
- [231] M.A. Martí-Renom, A.C. Stuart, A. Fiser, R. Sánchez, F. Melo, A. Šali, Comparative protein structure modeling of genes and genomes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29 (2000) 291–325. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.291>.
- [232] M.T. Muhammed, E. Aki-Yalcin, Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives, *Chem. Biol. Drug Des.* 93 (2019) 12–20. <https://doi.org/10.1111/CBDD.13388>.
- [233] T. Hameduh, Y. Haddad, V. Adam, Z. Heger, Homology modeling in the time of collective and artificial intelligence, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18 (2020) 3494–3506. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.007>.
- [234] R. PW, P. A, A. A, B. C, B. AR, C. CH, C. LD, D. JM, D. S, F. Z, G. RK, G. DS, H. B, K. T, L. R, P. E, R. C, R. AS, S. C, T. YP, V. Y, V. M, W. JD, W. J, Y. H, Y. JY, Z. C, B. HM, B. SK, The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1000>.

- [235] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- [236] M. Remmert, A. Biegert, A. Hauser, J. Söding, HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment, *Nature Methods* 2011 9:2 9 (2011) 173–175. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1818>.
- [237] B. Wallner, A. Elofsson, All are not equal: A benchmark of different homology modeling programs, *Protein Sci.* 14 (2005) 1315. <https://doi.org/10.1110/ps.041253405>.
- [238] M. Levitt, Accurate modeling of protein conformation by automatic segment matching, *J. Mol. Biol.* 226 (1992) 507–533. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90964-L](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90964-L).
- [239] A. Šali, T.L. Blundell, Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 779–815. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1993.1626>.
- [240] D. Petrey, Z. Xiang, C.L. Tang, L. Xie, M. Gimpelev, T. Mitros, C.S. Soto, S. Goldsmith-Fischman, A. Kernysky, A. Schlessinger, I.Y.Y. Koh, E. Alexov, B. Honig, Using multiple structure alignments, fast model building, and energetic analysis in fold recognition and homology modeling, *Proteins* 53 Suppl 6 (2003) 430–435. <https://doi.org/10.1002/prot.10550>.
- [241] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944;CTYPE:STRING:JOURNAL>.
- [242] C. Colovos, T.O. Yeates, Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions, *Protein Sci.* 2 (1993) 1511–1519. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>.
- [243] M. Wiederstein, M.J. Sippl, ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W407–W410. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM290>.
- [244] J.M. Paggi, A. Pandit, R.O. Dror, The Art and Science of Molecular Docking, *Annu. Rev. Biochem.* 93 (2024) 389–410. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030222-120000>.
- [245] L.G. Ferreira, R.N. Dos Santos, G. Oliva, A.D. Andricopulo, Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies, *Molecules* 2015, Vol. 20, Pages 13384-13421 20 (2015) 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- [246] Z. Ma, A. Ajibade, X. Zou, Docking strategies for predicting protein-ligand interactions and their application to structure-based drug design, *Commun. Inf. Syst.* 24 (2024) 199–230. <https://doi.org/10.4310/CIS.241021221101>.
- [247] R.A. Friesner, J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shelley, J.K. Perry, D.E. Shaw, P. Francis, P.S. Shenkin, Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1739–1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>.
- [248] G.M. Morris, H. Ruth, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- [249] M.L. Verdonk, J.C. Cole, M.J. Hartshorn, C.W. Murray, R.D. Taylor, Improved protein-ligand docking using GOLD, *Proteins* 52 (2003) 609–623. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>.

- [250] J. Li, A. Fu, L. Zhang, An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular Docking, *Interdiscip. Sci.* 11 (2019) 320–328. <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>.
- [251] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 455. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [252] R.G. Coleman, M. Carchia, T. Sterling, J.J. Irwin, B.K. Shoichet, Ligand Pose and Orientational Sampling in Molecular Docking, *PLoS One* 8 (2013) e75992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075992>.
- [253] R. Abagyan, M. Rueda, G. Bottegoni, Recipes for the Selection of Experimental Protein Conformations for Virtual Screening, *J. Chem. Inf. Model.* 50 (2009) 186–193. <https://doi.org/10.1021/ci9003943>.
- [254] B.D. Bursulaya, M. Totrov, R. Abagyan, C.L. Brooks, Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 17 (2003) 755–763. <https://doi.org/10.1023/B:JCAM.0000017496.76572.6F/METRICS>.
- [255] S.A. Adcock, J.A. McCammon, Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins, *Chem. Rev.* 106 (2006) 1589–1615. <https://doi.org/10.1021/CR040426M>.
- [256] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kalé, K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/JCC.20289>.
- [257] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general Amber force field, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/JCC.20035;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>.
- [258] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, A.D. Mackerell, CHARMM General Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 671. <https://doi.org/10.1002/JCC.21367>.
- [259] M.A. Cuendet, W.F. Van Gunsteren, On the calculation of velocity-dependent properties in molecular dynamics simulations using the leapfrog integration algorithm, *Journal of Chemical Physics* 127 (2007). <https://doi.org/10.1063/1.2779878/928429>.
- [260] Non-bonded interactions (NAMD 2.14 User's Guide), (n.d.). <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.14/ug/node25.html> (accessed May 21, 2026).
- [261] Periodic boundary conditions - GROMACS 2026.1 documentation, (n.d.). <https://manual.gromacs.org/current/reference-manual/algorithms/periodic-boundary-conditions.html> (accessed April 14, 2026).
- [262] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* 103 (1995) 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- [263] D.R. Roe, B.R. Brooks, A protocol for preparing explicitly solvated systems for stable molecular dynamics simulations, *J. Chem. Phys.* 153 (2020) 054123. <https://doi.org/10.1063/5.0013849>.

- [264] A.B. Guliaev, S. Cheng, B. Hang, Protein dynamics via computational microscope, *World J. Methodol.* 2 (2012) 42. <https://doi.org/10.5662/WJM.V2.I6.42>.
- [265] J.A. Lemkul, Introductory Tutorials for Simulating Protein Dynamics with GROMACS, *J. Phys. Chem. B* 128 (2024) 9418. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.4C04901>.
- [266] O.M.H. Salo-Ahen, I. Alanko, R. Bhadane, A.M. Alexandre, R.V. Honorato, S. Hossain, A.H. Juffer, A. Kabedev, M. Lahtela-Kakkonen, A.S. Larsen, E. Lescrinier, P. Marimuthu, M.U. Mirza, G. Mustafa, A. Nunes-Alves, T. Pantsar, A. Saadabadi, K. Singaravelu, M. Vanmeert, *Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development, Processes* 2021, Vol. 9, Page 71 9 (2020) 71. <https://doi.org/10.3390/PR9010071>.
- [267] D.L. Mobley, M.K. Gilson, Predicting Binding Free Energies: Frontiers and Benchmarks, *Annu. Rev. Biophys.* 46 (2017) 531–558. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-070816-033654>.
- [268] H. Fu, Y. Zhu, Q. Chen, Free energy calculations in biomolecule-nanomaterial interactions, *Front. Phys.* 12 (2024) 1469515. <https://doi.org/10.3389/FPHY.2024.1469515/FULL>.
- [269] S. Genheden, U. Ryde, The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities, *Expert Opin. Drug Discov.* 10 (2015) 449–461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>.
- [270] J.D. Chodera, D.L. Mobley, M.R. Shirts, R.W. Dixon, K. Branson, V.S. Pande, Alchemical free energy methods for drug discovery: progress and challenges, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21 (2011) 150–160. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2011.01.011>.
- [271] J. Rydzewski, W. Nowak, Ligand diffusion in proteins via enhanced sampling in molecular dynamics, *Phys. Life Rev.* 22–23 (2017) 58–74. <https://doi.org/10.1016/J.PLREV.2017.03.003>.
- [272] E. Wang, H. Sun, J. Wang, Z. Wang, H. Liu, J.Z.H. Zhang, T. Hou, End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design, *Chem. Rev.* 119 (2019) 9478–9508. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.9B00055>.
- [273] S. Genheden, U. Ryde, The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities, *Expert Opin. Drug Discov.* 10 (2015) 449–461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>.
- [274] P.A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan, W. Wang, O. Donini, P. Cieplak, J. Srinivasan, D.A. Case, T.E. Cheatham, Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 889–897. <https://doi.org/10.1021/AR000033J>.
- [275] T. Hou, J. Wang, Y. Li, W. Wang, Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (2010) 69–82. <https://doi.org/10.1021/CI100275A>.
- [276] N. Homeyer, H. Gohlke, Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area Method, *Mol. Inform.* 31 (2012) 114–122. <https://doi.org/10.1002/MINF.201100135>.

- [277] M. Réau, F. Langenfeld, J.F. Zagury, N. Lagarde, M. Montes, Decoys selection in benchmarking datasets: Overview and perspectives, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 328937. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00011>.
- [278] T.L. Offutt, R. V. Swift, R.E. Amaro, Enhancing Virtual Screening Performance of Protein Kinases with Molecular Dynamics Simulations, *J. Chem. Inf. Model.* 56 (2016) 1923–1935. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00261>.
- [279] F. Spyrakis, P. Benedetti, S. Decherchi, W. Rocchia, A. Cavalli, S. Alcaro, F. Ortuso, M. Baroni, G. Cruciani, A Pipeline to Enhance Ligand Virtual Screening: Integrating Molecular Dynamics and Fingerprints for Ligand and Proteins, *J. Chem. Inf. Model.* 55 (2015) 2256–2274. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.5B00169/SUPPL_FILE/CI5B00169_SI_001.PDF.
- [280] M. Bacilieri, S. Moro, Ligand-based drug design methodologies in drug discovery process: an overview, *Curr. Drug Discov. Technol.* 3 (2006) 155–165. <https://doi.org/10.2174/157016306780136781>.
- [281] C. Acharya, A. Coop, J. E. Polli, A. D. MacKerell, Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach, *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* 7 (2011) 10–22. <https://doi.org/10.2174/157340911793743547>.
- [282] D. Giordano, C. Biancaniello, M.A. Argenio, A. Facchiano, Drug Design by Pharmacophore and Virtual Screening Approach, *Pharmaceuticals (Basel)* 15 (2022). <https://doi.org/10.3390/ph15050646>.
- [283] H. Wu, J. Liu, R. Zhang, Y. Lu, G. Cui, Z. Cui, Y. Ding, A review of deep learning methods for ligand based drug virtual screening, *Fundamental Research* 4 (2024) 715–737. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2024.02.011>.
- [284] A. Cherkasov, E.N. Muratov, D. Fourches, A. Varnek, I.I. Baskin, M. Cronin, J. Dearden, P. Gramatica, Y.C. Martin, R. Todeschini, V. Consonni, V.E. Kuz'Min, R. Cramer, R. Benigni, C. Yang, J. Rathman, L. Terfloeth, J. Gasteiger, A. Richard, A. Tropsha, QSAR modeling: where have you been? Where are you going to?, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 4977–5010. <https://doi.org/10.1021/jm4004285>.
- [285] S. Yousefinejad, B. Hemmateenejad, Chemometrics tools in QSAR/QSPR studies: A historical perspective, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 149 (2015) 177–204. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.06.016>.
- [286] OECD, (Q)SAR Assessment Framework: Guidance for the regulatory assessment of (Quantitative) Structure Activity Relationship models and predictions, OECD Series on Testing and Assessment (2023). <https://doi.org/10.1787/d96118f6-en>.
- [287] A. Tropsha, Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation, *Mol. Inform.* 29 (2010) 476–488. <https://doi.org/10.1002/minf.201000061>.
- [288] A. Cherkasov, E.N. Muratov, D. Fourches, A. Varnek, I.I. Baskin, M. Cronin, J. Dearden, P. Gramatica, Y.C. Martin, R. Todeschini, V. Consonni, V.E. Kuz'Min, R. Cramer, R. Benigni, C. Yang, J. Rathman, L. Terfloeth, J. Gasteiger, A. Richard, A. Tropsha, QSAR modeling: where have you been? Where are you going to?, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 4977–5010. <https://doi.org/10.1021/jm4004285>.

- [289] M. Damale, S. Harke, F. Kalam Khan, D. Shinde, J. Sangshetti, Recent advances in multidimensional QSAR (4D-6D): a critical review, *Mini Rev. Med. Chem.* 14 (2014) 35–55. <https://doi.org/10.2174/13895575113136660104>.
- [290] Danishuddin, A.U. Khan, Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design, *Drug Discov. Today* 21 (2016) 1291–1302. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.013>.
- [291] J. Li, T. Zhao, Q. Yang, S. Du, L. Xu, A review of quantitative structure-activity relationship: The development and current status of data sets, molecular descriptors and mathematical models, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 256 (2025) 105278. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2024.105278>.
- [292] A. Mauri, V. Consonni, R. Todeschini, Molecular Descriptors, *Handbook of Computational Chemistry* (2017) 2065–2093. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27282-5_51.
- [293] Danishuddin, A.U. Khan, Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design, *Drug Discov. Today* 21 (2016) 1291–1302. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.013>.
- [294] K. Roy, R. Das, A review on principles, theory and practices of 2D-QSAR, *Curr. Drug Metab.* 15 (2014) 346–379. <https://doi.org/10.2174/1389200215666140908102230>.
- [295] C.H. Andrade, K.F.M. Pasqualoto, E.I. Ferreira, A.J. Hopfinger, 4D-QSAR: Perspectives in Drug Design, *Molecules* 15 (2010) 3281. <https://doi.org/10.3390/molecules15053281>.
- [296] R. Todeschini, V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors*, (2000). <https://doi.org/10.1002/9783527613106>.
- [297] R. Guha, E. Willighagen, A Survey of Quantitative Descriptions of Molecular Structure, *Curr. Top. Med. Chem.* 12 (2012) 1946. <https://doi.org/10.2174/156802612804910278>.
- [298] R. Gozalbes, J.P. Doucet, F. Derouin, Application of topological descriptors in QSAR and drug design: history and new trends, *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2 (2002) 93–102. <https://doi.org/10.2174/1568005024605909>.
- [299] D.H. Smith, R.E. Carhart, R. Venkataraghavan, Atom pairs as molecular features in structure-activity studies: definition and applications, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 25 (2002) 64–73. <https://doi.org/10.1021/ci00046a002>.
- [300] M. Reutlinger, C.P. Koch, D. Reker, N. Todoroff, P. Schneider, T. Rodrigues, G. Schneider, Chemically Advanced Template Search (CATS) for Scaffold-Hopping and Prospective Target Prediction for ‘Orphan’ Molecules, *Mol. Inform.* 32 (2013) 133. <https://doi.org/10.1002/minf.201200141>.
- [301] M.C. Hemmer, V. Steinhauer, J. Gasteiger, Deriving the 3D structure of organic molecules from their infrared spectra, *Vib. Spectrosc.* 19 (1999) 151–164. [https://doi.org/10.1016/s0924-2031\(99\)00014-4](https://doi.org/10.1016/s0924-2031(99)00014-4).
- [302] J.H. Schuur, P. Selzer, J. Gasteiger, The Coding of the Three-Dimensional Structure of Molecules by Molecular Transforms and Its Application to Structure-Spectra Correlations and Studies of Biological Activity, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 36 (1996) 334–344. <https://doi.org/10.1021/ci950164c>.

- [303] P. Gramatica, N. Navas, R. Todeschini, 3D-modelling and prediction by WHIM descriptors. Part 9. Chromatographic relative retention time and physico-chemical properties of polychlorinated biphenyls (PCBs), *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 40 (1998) 53–63. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(97\)00079-8](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(97)00079-8).
- [304] V. Consonni, R. Todeschini, M. Pavan, Structure/Response Correlations and Similarity/Diversity Analysis by GETAWAY Descriptors. 1. Theory of the Novel 3D Molecular Descriptors, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 42 (2002) 682–692. <https://doi.org/10.1021/ci015504a>.
- [305] M. Karelson, V.S. Lobanov, A.R. Katritzky, Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies, *Chem. Rev.* 96 (1996) 1027–1043. <https://doi.org/10.1021/cr950202r>.
- [306] R. Naef, W.E. Acree, Calculation of Five Thermodynamic Molecular Descriptors by Means of a General Computer Algorithm Based on the Group-Additivity Method: Standard Enthalpies of Vaporization, Sublimation and Solvation, and Entropy of Fusion of Ordinary Organic Molecules and..., *Molecules* 2017, Vol. 22, Page 1059 22 (2017) 1059. <https://doi.org/10.3390/molecules22071059>.
- [307] P. Goodford, The Basic Principles of GRID, in: *Molecular Interaction Fields: Applications in Drug Discovery and ADME Prediction*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006: pp. 1–25. <https://doi.org/10.1002/3527607676.ch1>.
- [308] R.C. Wade, Calculation and Application of Molecular Interaction Fields, *Molecular Interaction Fields: Applications in Drug Discovery and ADME Prediction* 27 (2006) 27–42. <https://doi.org/10.1002/3527607676.ch2>.
- [309] M. Pastor, G. Cruciani, I. McLay, S. Pickett, S. Clementi, GRid-INdependent Descriptors (GRIND): A Novel Class of Alignment-Independent Three-Dimensional Molecular Descriptors, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3233–3243. <https://doi.org/10.1021/jm000941m>.
- [310] R.D. Cramer, D.E. Patterson, J.D. Bunce, Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (2002) 5959–5967. <https://doi.org/10.1021/ja00226a005>.
- [311] G. Klebe, U. Abraham, T. Mietzner, Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules to Correlate and Predict Their Biological Activity, *J. Med. Chem.* 37 (2002) 4130–4146. <https://doi.org/10.1021/jm00050a010>.
- [312] M. Pastor, G. Cruciani, I. McLay, S. Pickett, S. Clementi, GRid-INdependent descriptors (GRIND): A novel class of alignment-independent three-dimensional molecular descriptors, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3233–3243. <https://doi.org/10.1021/JM000941M/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JM000941MN00001.GIF>.
- [313] Á. Durán, I. Zamora, M. Pastor, Suitability of GRIND-based principal properties for the description of molecular similarity and ligand-based virtual screening, *J. Chem. Inf. Model.* 49 (2009) 2129–2138. <https://doi.org/10.1021/ci900228x>.
- [314] Á. Durán, G.C. Martínez, M. Pastor, Development and validation of AMANDA, a new algorithm for selecting highly relevant regions in molecular interaction fields, *J. Chem. Inf. Model.* 48 (2008) 1813–1823. https://doi.org/10.1021/CI800037T/SUPPL_FILE/CI800037T_SI_003.XLS.

- [315] Á. Durán Alcaide, Development of high-performance algorithms for a new generation of versatile molecular descriptors. The Pentacle software, 2010. <https://hdl.handle.net/10803/7201> (accessed April 17, 2026).
- [316] S. Priya, G. Tripathi, D.B. Singh, P. Jain, A. Kumar, Machine learning approaches and their applications in drug discovery and design, *Chem. Biol. Drug Des.* 100 (2022) 136–153. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14057>.
- [317] B. Vasilev, M. Atanasova, A (Comprehensive) Review of the Application of Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) in the Prediction of New Compounds with Anti-Breast Cancer Activity, *Applied Sciences* 2025, Vol. 15, Page 1206 15 (2025) 1206. <https://doi.org/10.3390/APP15031206>.
- [318] C. Arnold, L. Biedebach, A. Küpfer, M. Neunhoeffler, The role of hyperparameters in machine learning models and how to tune them, *Political Sci. Res. Methods* 12 (2024) 841–848. <https://doi.org/10.1017/PSRM.2023.61>.
- [319] E.C. Alexopoulos, Introduction to Multivariate Regression Analysis, *Hippokratia* 14 (2010) 23. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3049417/> (accessed March 11, 2026).
- [320] C. Yap, H. Li, Z. Ji, Y. Chen, Regression methods for developing QSAR and QSPR models to predict compounds of specific pharmacodynamic, pharmacokinetic and toxicological properties, *Mini Rev. Med. Chem.* 7 (2007) 1097–1107. <https://doi.org/10.2174/138955707782331696>.
- [321] P. Liu, W. Long, Current Mathematical Methods Used in QSAR/QSPR Studies, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 1978. <https://doi.org/10.3390/ijms10051978>.
- [322] M. Goodarzi, B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, Feature selection methods in QSAR studies, *J. AOAC Int.* 95 (2012) 636–651. https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE_Goodarzi.
- [323] Stepwise Multiple Regression, (n.d.). <https://docs.tibco.com/pub/stat/14.0.0/doc/html/UsersGuide/GUID-2BFEC43-AFA6-4022-AD88-9E57C4CC65AA.html> (accessed March 11, 2026).
- [324] V. Aguiar-Pulido, M. Gestal, M. Cruz-Monteagudo, J. Rabunal, J. Dorado, C. Munteanu, Evolutionary computation and QSAR research, *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* 9 (2013) 206–225. <https://doi.org/10.2174/1573409911309020006>.
- [325] S. Wold, M. Sjöström, L. Eriksson, PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58 (2001) 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1).
- [326] P. Geladi, B.R. Kowalski, Partial least-squares regression: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 185 (1986) 1–17. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(86\)80028-9](https://doi.org/10.1016/0003-2670(86)80028-9).
- [327] H. Abdi, Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression), *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* 2 (2010) 97–106. <https://doi.org/10.1002/wics.51>.
- [328] K. Varmuza, P. Filzmoser, M. Dehmer, Multivariate linear QSPR/QSAR models: Rigorous evaluation of variable selection for PLS, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 5 (2013) e201302007. <https://doi.org/10.5936/csbj.201302007>.

- [329] N. Montañez-Godínez, A.C. Martínez-Olguín, O. Deeb, R. Garduño-Juárez, G. Ramírez-Galicia, QSAR/QSPR as an application of artificial neural networks, *Methods Mol. Biol.* 1260 (2015) 319–333. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2239-0_19.
- [330] F. Ghasemi, A. Mehridehnavi, A. Pérez-Garrido, H. Pérez-Sánchez, Neural network and deep-learning algorithms used in QSAR studies: merits and drawbacks, *Drug Discov. Today* 23 (2018) 1784–1790. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2018.06.016>.
- [331] Statistica Automated Neural Networks (SANN) - Neural Networks Overview, (n.d.). <https://docs.tibco.com/pub/stat/14.0.0/doc/html/UsersGuide/GUID-F60C241F-CD88-4714-A8C8-1F28473C52EE.html> (accessed April 2, 2026).
- [332] J. Johnson, P. Picton, How to train a neural network: An introduction to the new computational paradigm, *Complexity* 1 (1996) 13–28. <https://doi.org/10.1002/CPLX.6130010606;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>.
- [333] D.A. Winkler, T.C. Le, Performance of Deep and Shallow Neural Networks, the Universal Approximation Theorem, Activity Cliffs, and QSAR, *Mol. Inform.* 36 (2017). <https://doi.org/10.1002/MINF.201600118>.
- [334] B. Playe, V. Stoven, Evaluation of deep and shallow learning methods in chemogenomics for the prediction of drugs specificity, *Journal of Cheminformatics* 2020 12:1 12 (2020) 11-. <https://doi.org/10.1186/S13321-020-0413-0>.
- [335] C. Cortes, V. Vapnik, L. Saitta, Support-vector networks, *Machine Learning* 1995 20:3 20 (1995) 273–297. <https://doi.org/10.1007/BF00994018>.
- [336] A.J. Smola, B. Schölkopf, A tutorial on support vector regression, *Statistics and Computing* 2004 14:3 14 (2004) 199–222. <https://doi.org/10.1023/B:STCO.0000035301.49549.88>.
- [337] R. Rodríguez-Pérez, J. Bajorath, Evolution of Support Vector Machine and Regression Modeling in Chemoinformatics and Drug Discovery, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 36 (2022) 355–362. <https://doi.org/10.1007/S10822-022-00442-9>.
- [338] A. Sengupta, S.K. Singh, R. Kumar, Support Vector Machine-Based Prediction Models for Drug Repurposing and Designing Novel Drugs for Colorectal Cancer, *ACS Omega* 9 (2024) 18584–18592. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.4C01195>.
- [339] Support Vector Machines Introductory Overview, (n.d.). <https://docs.tibco.com/pub/stat/14.0.0/doc/html/UsersGuide/GUID-1D973B41-0C45-4873-97A1-D58828E542F4.html> (accessed April 9, 2026).
- [340] C.-W. Hsu, C.-C. Chang, C.-J. Lin, A Practical Guide to Support Vector Classification, (n.d.). <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin> (accessed April 24, 2026).
- [341] P.K. Ojha, K. Roy, Comparative QSARs for antimalarial endochins: Importance of descriptor-thinning and noise reduction prior to feature selection, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 109 (2011) 146–161. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2011.08.007>.
- [342] S. Arlot, A. Celisse, A survey of cross-validation procedures for model selection, *Stat. Surv.* 4 (2009) 40–79. <https://doi.org/10.1214/09-SS054>.
- [343] A. Tropsha, Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation, *Mol. Inform.* 29 (2010) 476–488. <https://doi.org/10.1002/MINF.201000061>.

- [344] P.K. Ojha, I. Mitra, R.N. Das, K. Roy, Further exploring rm2 metrics for validation of QSPR models, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 107 (2011) 194–205. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2011.03.011>.
- [345] K. Roy, I. Mitra, S. Kar, P.K. Ojha, R.N. Das, H. Kabir, Comparative studies on some metrics for external validation of QSPR models, *J. Chem. Inf. Model.* 52 (2012) 396–408. <https://doi.org/10.1021/CI200520G>.
- [346] N. Chirico, P. Gramatica, Real external predictivity of QSAR models: How to evaluate It? Comparison of different validation criteria and proposal of using the concordance correlation coefficient, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (2011) 2320–2335. https://doi.org/10.1021/CI200211N/SUPPL_FILE/CI200211N_SI_001.PDF.
- [347] K. Roy, S. Kar, P. Ambure, On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 145 (2015) 22–29. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2015.04.013>.
- [348] D. Gadaleta, G.F. Mangiatordi, M. Catto, A. Carotti, O. Nicolotti, Applicability Domain for QSAR models: where theory meets reality, *International Journal of Quantitative Structure-Property Relationships* 1 (2016) 45–63. <https://doi.org/10.4018/IJQSPR.2016010102>.
- [349] F. Sahigara, K. Mansouri, D. Ballabio, A. Mauri, V. Consonni, R. Todeschini, Comparison of Different Approaches to Define the Applicability Domain of QSAR Models, *Molecules* 2012, Vol. 17, Pages 4791–4810 17 (2012) 4791–4810. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES17054791>.
- [350] J. Jaworska, N. Nikolova-Jeliazkova, T. Aldenberg, QSAR applicability domain estimation by projection of the training set descriptor space: a review, *Altern. Lab. Anim.* 33 (2005) 445–459. <https://doi.org/10.1177/026119290503300508>.
- [351] P. Gramatica, On the Development and Validation of QSAR Models, in: *Computational Toxicology*, Humana Press, Totowa, NJ, 2013: pp. 499–526. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-059-5_21.
- [352] Y.; Chang, B.A.; Hawkins, J.J.; Du, P.W.; Groundwater, D.E.; Hibbs, F. Lai, Y. Chang, B.A. Hawkins, J.J. Du, P.W. Groundwater, D.E. Hibbs, F. Lai, A Guide to In Silico Drug Design, *Pharmaceutics* 15 (2022) 49. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010049>.
- [353] S. Wang, G. Dong, C. Sheng, Structural simplification: an efficient strategy in lead optimization, *Acta Pharm. Sin. B* 9 (2019) 880–901. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.05.004>.
- [354] V.D. Mouchlis, A. Afantitis, A. Serra, M. Fratello, A.G. Papadiamantis, V. Aidinis, I. Lynch, D. Greco, G. Melagraki, Advances in De Novo Drug Design: From Conventional to Machine Learning Methods, *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 1676 22 (2021) 1676. <https://doi.org/10.3390/ijms22041676>.
- [355] Z.Z. Wang, X.X. Shi, G.Y. Huang, G.F. Hao, G.F. Yang, Fragment-based drug design facilitates selective kinase inhibitor discovery, *Trends Pharmacol. Sci.* 42 (2021) 551–565. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.04.001>.
- [356] H. Sun, G. Tawa, A. Wallqvist, Classification of scaffold-hopping approaches, *Drug Discov. Today* 17 (2012) 310–324. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.10.024>.

- [357] N. Brown, Identifying and representing scaffolds, *Scaffold Hopping in Medicinal Chemistry* 58 (2013) 1–14. <https://doi.org/10.1002/9783527665143.ch01>.
- [358] S. Wang, R. Zhang, X. Li, F. Cai, X. Ma, Y. Tang, C. Xu, L. Wang, P. Ren, L. Liu, S. Wu, Q. Qian, & Fang Bai, Recent advances in molecular representation methods and their applications in scaffold hopping, *Npj Drug Discovery* 2025 2:1 2 (2025) 14-. <https://doi.org/10.1038/s44386-025-00017-2>.
- [359] N. Brown, *Scaffold hopping in medicinal chemistry*, wiley, 2013. <https://doi.org/10.1002/9783527665143>.
- [360] M. Slater, A. Vinter, The xed force field and spark, in: *Scaffold Hopping in Medicinal Chemistry*, wiley, 2013: pp. 195–214. <https://doi.org/10.1002/9783527665143.ch13>.
- [361] T.P. Heffron, Small Molecule Kinase Inhibitors for the Treatment of Brain Cancer, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 10030–10066. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.6B00618/SUPPL_FILE/JM6B00618_SI_001.PDF.
- [362] T.P. Heffron, Challenges of developing small-molecule kinase inhibitors for brain tumors and the need for emphasis on free drug levels, *Neuro. Oncol.* 20 (2018) 307. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOX179>.
- [363] L.K. Chico, L.J. Van Eldik, D.M. Watterson, Targeting protein kinases in central nervous system disorders, *Nature Reviews Drug Discovery* 2009 8:11 8 (2009) 892–909. <https://doi.org/10.1038/nrd2999>.
- [364] D.Z. Liu, B.P. Ander, Cell cycle inhibition without disruption of neurogenesis is a strategy for treatment of aberrant cell cycle diseases: an update, *ScientificWorldJournal*. 2012 (2012). <https://doi.org/10.1100/2012/491737>.
- [365] A. Lui, J. Vanleuven, D. Perekopskiy, D. Liu, D. Xu, O. Alzayat, T. Elgokhy, T. Do, M. Gann, R. Martin, D.Z. Liu, FDA-Approved Kinase Inhibitors in Preclinical and Clinical Trials for Neurological Disorders, *Pharmaceuticals* 15 (2022). <https://doi.org/10.3390/PH15121546/S1>.
- [366] S.H. Lee, K. Suk, Emerging roles of protein kinases in microglia-mediated neuroinflammation, *Biochem. Pharmacol.* 146 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2017.06.137>.
- [367] M.S. Thomsen, N. Humle, E. Hede, T. Moos, A. Burkhardt, L.B. Thomsen, The blood-brain barrier studied in vitro across species, *PLoS One* 16 (2021) e0236770. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0236770>.
- [368] E. Jagtiani, M. Yeolekar, S. Naik, V. Patravale, In vitro blood brain barrier models: An overview, *Journal of Controlled Release* 343 (2022) 13–30. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.01.011>.
- [369] N.J. Abbott, A.A.K. Patabendige, D.E.M. Dolman, S.R. Yusof, D.J. Begley, Structure and function of the blood-brain barrier, *Neurobiol. Dis.* 37 (2010) 13–25. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2009.07.030>.
- [370] M. Campisi, Y. Shin, T. Osaki, C. Hajal, V. Chiono, R.D. Kamm, 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes, *Biomaterials* 180 (2018) 117–129. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2018.07.014>.

- [371] J. Bicker, G. Alves, A. Fortuna, A. Falcão, Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87 (2014) 409–432. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2014.03.012>.
- [372] I. Cockerill, J.A. Oliver, H. Xu, B.M. Fu, D. Zhu, Blood-brain barrier integrity and clearance of amyloid- β from the BBB, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1097 (2018) 261–278. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96445-4_14.
- [373] S. Singh, D. Bradford, S. Chatterjee, X. Li, S.L. Aungst, A.M. Skinner, C.P. Miller, S. Kim-McOlash, J.F. Zirkelbach, Y. Xiong, Y. Bi, Y.H. Wang, Y. Yang, J. Sun, J. Kraft, R. Charlab, S.S. Shord, S. Tang, B. Scepura, I. Bulatao, O. Udoka, H. Saber, N.A. Rahman, R. Pazdur, H. Singh, M. Donoghue, N. Drezner, FDA Approval Summary: Tovorafenib for Relapsed or Refractory BRAF-Altered Pediatric Low-Grade Glioma, *Clin. Cancer Res.* 31 (2025) 1383–1389. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-24-3439>.
- [374] FDA grants accelerated approval to tovorafenib for patients with relapsed or refractory BRAF-altered pediatric low-grade glioma | FDA, (n.d.). <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-tovorafenib-patients-relapsed-or-refractory-braf-altered-pediatric> (accessed April 21, 2026).
- [375] M.I. Barbato, J. Nashed, D. Bradford, Y. Ren, S. Khasar, C.P. Miller, B.S. Zolnik, H. Zhao, Y. Li, Y. Bi, S.S. Shord, A.K. Amatya, P.S. Mishra-Kalyani, B. Scepura, R.A. Al-Matari, R. Pazdur, P.G. Kluetz, M. Donoghue, H. Singh, N. Drezner, FDA Approval Summary: Dabrafenib in combination with trametinib for BRAF V600E mutation-positive low-grade glioma, *Clin. Cancer Res.* 30 (2024) 263. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-23-1503>.
- [376] FDA approves dabrafenib with trametinib for pediatric patients with low-grade glioma with a BRAF V600E mutation | FDA, (n.d.). <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-dabrafenib-trametinib-pediatric-patients-low-grade-glioma-braf-v600e-mutation> (accessed April 21, 2026).
- [377] D.A. Krueger, M.M. Care, K. Holland, K. Agricola, C. Tudor, P. Mangeshkar, K.A. Wilson, A. Byars, T. Sahmoud, D.N. Franz, Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis, *N. Engl. J. Med.* 363 (2010) 1801–1811. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1001671>.
- [378] D.N. Franz, E. Belousova, S. Sparagana, E.M. Bebin, M. Frost, R. Kuperman, O. Witt, M.H. Kohrman, J.R. Flamini, J.Y. Wu, P. Curatolo, P.J. De Vries, V.H. Whittemore, E.A. Thiele, J.P. Ford, G. Shah, H. Cauwel, D. Lebowhl, T. Sahmoud, S. Jozwiak, Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): A multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial, *The Lancet* 381 (2013) 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61134-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61134-9).
- [379] T.P. Heffron, C.O. Ndubaku, L. Salphati, B. Alicke, J. Cheong, J. Drobnick, K. Edgar, S.E. Gould, L.B. Lee, J.D. Lesnick, C. Lewis, J. Nonomiya, J. Pang, E.G. Plise, S. Sideris, J. Wallin, L. Wang, X. Zhang, A.G. Olivero, Discovery of Clinical Development Candidate GDC-0084, a Brain Penetrant Inhibitor of PI3K and mTOR, *ACS Med. Chem. Lett.* 7 (2016) 351–356. <https://doi.org/10.1021/ACSMEDCHEMLETT.6B00005>.
- [380] P.Y. Wen, T.F. Cloughesy, A.G. Olivero, K.M. Morrissey, T.R. Wilson, X. Lu, L.U. Mueller, A.F. Coimbra, B.M. Ellingson, E. Gerstner, E.Q. Lee, J. Rodon, First-in-Human Phase I Study to Evaluate the Brain-Penetrant PI3K/mTOR Inhibitor GDC-0084 in Patients with Progressive

or Recurrent High-Grade Glioma, *Clin. Cancer Res.* 26 (2020) 1820–1828. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2808>.

- [381] S.T. Durant, L. Zheng, Y. Wang, K. Chen, L. Zhang, T. Zhang, Z. Yang, L. Riches, A.G. Trinidad, J.H.L. Fok, T. Hunt, K.G. Pike, J. Wilson, A. Smith, N. Colclough, V.P. Reddy, A. Sykes, A. Janefeldt, P. Johnström, K. Varnäs, A. Takano, S. Ling, J. Orme, J. Stott, C. Roberts, I. Barrett, G. Jones, M. Roudier, A. Pierce, J. Allen, J. Kahn, A. Sule, J. Karlin, A. Cronin, M. Chapman, K. Valerie, R. Illingworth, M. Pass, The brain-penetrant clinical ATM inhibitor AZD1390 radiosensitizes and improves survival of preclinical brain tumor models, *Sci. Adv.* 4 (2018). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAT1719>.
- [382] A. Jucaite, P. Stenkrona, Z. Cselényi, S. De Vita, N. Buil-Bruna, K. Varnäs, A. Savage, A. Varrone, P. Johnström, M. Schou, C. Davison, A. Sykes, V. Pilla Reddy, M. Hoch, A. Vazquez-Romero, M.M. Moein, C. Halldin, M.S. Merchant, M. Pass, L. Farde, Brain exposure of the ATM inhibitor AZD1390 in humans-a positron emission tomography study, *Neuro. Oncol.* 23 (2021) 687–696. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAA238>.
- [383] J. Wu, Y. Yuan, D.A.L. Priel, D. Fink, C.J. Peer, T.M. Sissung, Y.T. Su, Y. Pang, G. Yu, M.K. Butler, T.R. Mendoza, E. Vera, S. Ahmad, C. Bryla, M. Lindsley, E. Grajkowska, K. Mentges, L. Boris, R. Antony, N. Garren, C. Siegel, N. Lollo, C. Cordova, O. Aboud, B.J. Theeler, E.M. Burton, M. Penas-Prado, H. Leeper, J. Gonzales, T.S. Armstrong, K.R. Calvo, W.D. Figg, D.B. Kuhns, J.I. Gallin, M.R. Gilbert, Phase I Study of Zotiraciclib in Combination with Temozolomide for Patients with Recurrent High-grade Astrocytomas, *Clin. Cancer Res.* 27 (2021) 3298–3306. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4730>.
- [384] E. Le Rhun, T. Gorlia, J. Felsberg, J. Jongen, C.A. Maurage, F. Ducray, D. Gramatzki, P. Hau, O.L. Chinot, M. Preusser, S. Cartalat, P. Roth, M. van den Bent, J. Furtner, M. Collienne, G. Reifenberger, M. Weller, Zotiraciclib (TG02) for newly diagnosed glioblastoma in the elderly or for recurrent glioblastoma: The EORTC 1608 STEAM trial, *Eur. J. Cancer* 198 (2024). <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2023.113475>.
- [385] A. Ranjan, Y. Pang, M. Butler, M. Merchant, O. Kim, G. Yu, Y.T. Su, M.R. Gilbert, D. Levens, J. Wu, Targeting CDK9 for the Treatment of Glioblastoma, *Cancers (Basel)*. 13 (2021) 3039. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13123039>.
- [386] B. Chaulagain, A. Gothwal, R.N.L. Lamptey, R. Trivedi, A.K. Mahanta, B. Layek, J. Singh, Experimental Models of In Vitro Blood-Brain Barrier for CNS Drug Delivery: An Evolutionary Perspective, *Int. J. Mol. Sci.* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/IJMS24032710>.
- [387] Y.Y. Zhang, H. Liu, S.G. Summerfield, C.N. Luscombe, J. Sahi, Integrating in Silico and in Vitro Approaches To Predict Drug Accessibility to the Central Nervous System, *Mol. Pharm.* 13 (2016) 1540–1550. <https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.6B00031>.
- [388] P.A. Nielsen, O. Andersson, S.H. Hansen, K.B. Simonsen, G. Andersson, Models for predicting blood–brain barrier permeation, *Drug Discov. Today* 16 (2011) 472–475. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2011.04.004>.
- [389] S. Bagchi, T. Chhibber, B. Lahooti, A. Verma, V. Borse, R.D. Jayant, In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies: an overview, *Drug Des. Devel. Ther.* 13 (2019) 3591. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S218708>.

- [390] L. Di, E.H. Kerns, K. Fan, O.J. McConnell, G.T. Carter, High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier, *Eur. J. Med. Chem.* 38 (2003) 223–232. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(03)00012-6).
- [391] Q. Wang, J.D. Rager, K. Weinstein, P.S. Kardos, G.L. Dobson, J. Li, I.J. Hidalgo, Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier, *Int. J. Pharm.* 288 (2005) 349–359. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2004.10.007>.
- [392] É. Hellinger, S. Veszélka, A.E. Tóth, F. Walter, Á. Kittel, M.L. Bakk, K. Tihanyi, V. Háda, S. Nakagawa, T. Dinh Ha Duy, M. Niwa, M.A. Deli, M. Vastag, Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82 (2012) 340–351. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2012.07.020>.
- [393] G. Schiera, S. Sala, A. Gallo, M.P. Raffa, G.L. Pitarresi, G. Savettieri, I. Di Liegro, Permeability properties of a three-cell type in vitro model of blood-brain barrier, *J. Cell. Mol. Med.* 9 (2005) 373–379. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2005.TB00362.X>.
- [394] D.M. Wuest, A.M. Wing, K.H. Lee, Membrane configuration optimization for a murine in vitro blood-brain barrier model, *J. Neurosci. Methods* 212 (2013) 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.10.016>.
- [395] S. Santaguida, D. Janigro, M. Hossain, E. Oby, E. Rapp, L. Cucullo, Side by side comparison between dynamic versus static models of blood-brain barrier in vitro: a permeability study, *Brain Res.* 1109 (2006) 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2006.06.027>.
- [396] J.D. Wang, E.S. Khafagy, K. Khanafer, S. Takayama, M.E.H. Elsayed, Organization of Endothelial Cells, Pericytes, and Astrocytes into a 3D Microfluidic in Vitro Model of the Blood–Brain Barrier, *Mol. Pharm.* 13 (2016) 895–906. <https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.5B00805>.
- [397] M. Kansy, F. Senner, K. Gubernator, Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 1007–1010. <https://doi.org/10.1021/jm970530e>.
- [398] H. Liu, C. Sabus, G.T. Carter, C. Du, A. Avdeef, M. Tischler, In vitro permeability of poorly aqueous soluble compounds using different solubilizers in the PAMPA assay with liquid chromatography/mass spectrometry detection, *Pharm. Res.* 20 (2003) 1820–1826. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000003380.44755.5A>.
- [399] B.J. Aungst, Advancements in techniques for analyzing cell permeability, *Heliyon* 11 (2025) e43832. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.12.002>.
- [400] R. Kato, L. Zhang, N. Kinatukara, R. Huang, A. Asthana, C. Weber, M. Xia, X. Xu, P. Shah, Investigating blood–brain barrier penetration and neurotoxicity of natural products for central nervous system drug development, *Scientific Reports* 2025 15:1 15 (2025) 7431-. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90888-2>.
- [401] W.M. Pardridge, The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development, *NeuroRx* 2 (2005) 3–14. <https://doi.org/10.1602/NEURORX.2.1.3>.
- [402] L.K. Chico, L.J. Van Eldik, D.M. Watterson, Targeting protein kinases in central nervous system disorders, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 892. <https://doi.org/10.1038/NRD2999>.

- [403] E. Angeli, G. Bousquet, Brain Metastasis Treatment: The Place of Tyrosine Kinase Inhibitors and How to Facilitate Their Diffusion across the Blood–Brain Barrier, *Pharmaceutics* 2021, Vol. 13, Page 1446 13 (2021) 1446. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13091446>.
- [404] A. Avdeef, S. Bendels, L. Di, B. Faller, M. Kansy, K. Sugano, Y. Yamauchi, PAMPA - Critical factors for better predictions of absorption, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 2893–2909. <https://doi.org/10.1002/jps.21068>.
- [405] J. Müller, K. Ezzo, G. Dargó, Á. Könczöl, G.T. Balogh, Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 79 (2015) 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.08.019>.
- [406] A. Fortuna, G. Alves, P. Soares-da-silva, A. Falcão, Optimization of a parallel artificial membrane permeability assay for the fast and simultaneous prediction of human intestinal absorption and plasma protein binding of drug candidates: application to dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide derivatives, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 530–540. <https://doi.org/10.1002/JPS.22796>.
- [407] O. Tsinman, K. Tsinman, N. Sun, A. Avdeef, Physicochemical Selectivity of the BBB Microenvironment Governing Passive Diffusion—Matching with a Porcine Brain Lipid Extract Artificial Membrane Permeability Model, *Pharm. Res.* 28 (2010) 337. <https://doi.org/10.1007/S11095-010-0280-X>.
- [408] A. Vincze, G. Dékány, R. Bicsak, A. Formanek, Y. Moreau, G. Koplányi, G. Takács, G. Katona, D. Balogh-Weiser, Á. Arany, G.T. Balogh, Natural Lipid Extracts as an Artificial Membrane for Drug Permeability Assay: In Vitro and In Silico Characterization, *Pharmaceutics* 15 (2023) 899. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15030899/S1>.
- [409] A. Avdeef, P.E. Nielsen, O. Tsinman, PAMPA - A drug absorption in vitro model: 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 22 (2004) 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.04.009>.
- [410] J. Bicker, G. Alves, A. Fortuna, A. Falcão, Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87 (2014) 409–432. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.012>.
- [411] L. Hu, Y. Liu, S. Cheng, Simultaneous determination of six analytes by HPLC-UV for high throughput analysis in permeability assessment, *J. Chromatogr. Sci.* 49 (2011) 124–128. <https://doi.org/10.1093/CHRSKI/49.2.124>.
- [412] L. Munoz, Non-kinase targets of protein kinase inhibitors, *Nature Reviews Drug Discovery* 2017 16:6 16 (2017) 424–440. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.266>.
- [413] S. Klaeger, S. Heinzlmeir, M. Wilhelm, H. Polzer, B. Vick, P.A. Koenig, M. Reinecke, B. Ruprecht, S. Petzoldt, C. Meng, J. Zecha, K. Reiter, H. Qiao, D. Helm, H. Koch, M. Schoof, G. Canevari, E. Casale, S. Re Depaolini, A. Feuchtinger, Z. Wu, T. Schmidt, L. Rueckert, W. Becker, J. Huenges, A.K. Garz, B.O. Gohlke, D.P. Zolg, G. Kayser, T. Vooder, R. Preissner, H. Hahne, N. Tönisson, K. Kramer, K. Götz, F. Bassermann, J. Schlegl, H.C. Ehrlich, S. Aiche, A. Walch, P.A. Greif, S. Schneider, E.R. Felder, J. Ruland, G. Médard, I. Jeremias, K. Spiekermann, B. Kuster, The target landscape of clinical kinase drugs, *Science* 358 (2017). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN4368>.

- [414] M. Mobasher, M. Vogt, E. Xerxa, J. Bajorath, Comprehensive Data-Driven Assessment of Non-Kinase Targets of Inhibitors of the Human Kinome, *Biomolecules* 14 (2024). <https://doi.org/10.3390/BIOM14030258>.
- [415] B. Dogan-Topal, B. Bozal-Palabiyik, S.A. Ozkan, B. Uslu, Investigation of anticancer drug lapatinib and its interaction with dsDNA by electrochemical and spectroscopic techniques, *Sens. Actuators B Chem.* 194 (2014) 185–194. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2013.12.088>.
- [416] A.H. Hegde, J. Seetharamappa, Fluorescence and circular dichroism studies on binding and conformational aspects of an anti-leukemic drug with DNA, *Mol. Biol. Rep.* 41 (2014) 67–71. <https://doi.org/10.1007/S11033-013-2838-2>.
- [417] Y.J. Luo, B.L. Wang, S.B. Kou, Z.Y. Lin, K.L. Zhou, Y.Y. Lou, J.H. Shi, Assessment on the binding characteristics of dasatinib, a tyrosine kinase inhibitor to calf thymus DNA: insights from multi-spectroscopic methodologies and molecular docking as well as DFT calculation, *https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1676824* 38 (2019) 4210–4220. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1676824>.
- [418] E. Kiss, A. Mirzahosseini, Á. Hubert, A. Ambrus, L. Órfi, P. Horváth, DNA binding of sunitinib: Spectroscopic evidence via circular dichroism and nuclear magnetic resonance, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 150 (2018) 355–361. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.12.004>.
- [419] D. Doenecke, Ethidium bromide (EB) binding to nucleosomal DNA: Effects on DNA cleavage patterns, *Exp. Cell Res.* 109 (1977) 309–315. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90010-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90010-6).
- [420] G. Barone, A. Terenzi, A. Lauria, A.M. Almerico, J.M. Leal, N. Busto, B. García, DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: Structure–affinity relationships, *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 2848–2862. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2013.02.023>.
- [421] M.M. Aleksi}, V. Kapetanovi}, An Overview of the Optical and Electrochemical Methods for Detection of DNA-Drug Interactions, *Acta Chim. Slov* 61 (2014) 555–573.
- [422] Voet's Principles of Biochemistry Global Edition, Wiley, 2018. <https://www.wiley.com/en-ie/Voet's+Principles+of+Biochemistry%2C+Global+Edition%2C+5th+Edition-p-9781119455134R150> (accessed April 23, 2026).
- [423] O. Kennard, O. Kennard, DNA-drug interactions, *Pure and Applied Chemistry* 65 (1993) 1213–1222. <https://doi.org/10.1351/PAC199365061213>.
- [424] L.R. Ferguson, W.A. Denny, Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 623 (2007) 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.014>.
- [425] S. Bhaduri, N. Ranjan, D.P. Arya, An overview of recent advances in duplex DNA recognition by small molecules, *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 14 (2018) 1051–1086. <https://doi.org/10.3762/BJOC.14.93>.
- [426] K.R. Vann, A.A. Oviatt, N. Osheroff, Topoisomerase II Poisons: Converting Essential Enzymes into Molecular Scissors, *Biochemistry* 60 (2021) 1630–1641. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.1C00240>.
- [427] S.P. Jackson, J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature* 2009 461:7267 461 (2009) 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>.

- [428] M.M. Aleksi}, V. Kapetanovi}, An Overview of the Optical and Electrochemical Methods for Detection of DNA-Drug Interactions, *Acta Chim. Slov* 61 (2014) 555–573.
- [429] W. Bauer, J. Vinograd, The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes: III. Dependence of the buoyant density upon superhelix density and base composition, *J. Mol. Biol.* 54 (1970) 281–298. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90430-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90430-4).
- [430] Z. Morávek, S. Neidle, B. Schneider, Protein and drug interactions in the minor groove of DNA, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 1182. <https://doi.org/10.1093/NAR/30.5.1182>.
- [431] S. Neidle, DNA minor-groove recognition by small molecules, *Nat. Prod. Rep.* 18 (2001) 291–309. <https://doi.org/10.1039/A705982E>.
- [432] S. Neidle, Principles of Nucleic Acid Structure, *Principles of Nucleic Acid Structure* (2007) 1–289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369507-9.X5001-8>.
- [433] D. Suh, J.B. Chaires, Criteria for the mode of binding of DNA binding agents, *Bioorg. Med. Chem.* 3 (1995) 723–728. [https://doi.org/10.1016/0968-0896\(95\)00053-J](https://doi.org/10.1016/0968-0896(95)00053-J).
- [434] S.A. Ozkan, H.Y. Aboul-Enein, Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation Article in *Chromatographia*, (2012). <https://doi.org/10.1007/s10337-012-2268-7>.
- [435] Instrumentalne metode - Mirjana Medenica, Nataša Pejić: knjiga | KorisnaKnjiga.com, n.d. <https://www.korisnknjiga.com/instrumentalne-metode-naslov-129111> (accessed April 27, 2026).
- [436] 11: Electrochemical Methods - Chemistry LibreTexts, (n.d.). [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_\(Harvey\)/11%3A_Electrochemical_Methods](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey)/11%3A_Electrochemical_Methods) (accessed March 15, 2026).
- [437] S.A. Ozkan, J.-M. Kauffmann, P. Zuman, *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, (2015). <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47138-8>.
- [438] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Third Edition, *Analytical Electrochemistry*, Third Edition (2006) 1–250. <https://doi.org/10.1002/0471790303>.
- [439] A.J.. Bard, L.R.. Faulkner, H.S.. White, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, (2022) 1044. https://books.google.com/books/about/Electrochemical_Methods.html?hl=sr&id=eZ6HDAEACAAJ (accessed June 1, 2026).
- [440] N. Elgrishi, K.J. Rountree, B.D. McCarthy, E.S. Rountree, T.T. Eisenhart, J.L. Dempsey, A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Educ.* 95 (2017) 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>.
- [441] S. Hason, A. Daňhel, K. Schwarzová-Pecková, M. Fojta, Carbon Electrodes in Electrochemical Analysis of Biomolecules and Bioactive Substances: Roles of Surface Structures and Chemical Groups, *Nanotechnology and Biosensors* (2018) 51–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813855-7.00003-9>.
- [442] S.A. Ozkan, J.-M. Kauffmann, P. Zuman, *Electroanalytical in Pharmaceutical Analysis and Their Applications*, (2015) 235–266. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47138-8_8.

- [443] S.A. Ozkan, *Electroanalytical methods in pharmaceutical analysis and their validation*, (2012) 350.
- [444] D. Harvey, *Analytical Chemistry 2.0—an open-access digital textbook*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010 399:1 399 (2010) 149–152. <https://doi.org/10.1007/S00216-010-4316-1>.
- [445] R.G. Compton, C.E. Banks, *Understanding voltammetry*, 2nd edition, *Understanding Voltammetry*, 2nd Edition (2010) 1–430. https://doi.org/10.1142/P726/SUPPL_FILE/P726_CHAP03.PDF.
- [446] S. Hason, A. Daňhel, K. Schwarzová-Pecková, M. Fojta, *Carbon Electrodes in Electrochemical Analysis of Biomolecules and Bioactive Substances: Roles of Surface Structures and Chemical Groups*, in: *Nanotechnology and Biosensors*, Elsevier, 2018: pp. 51–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813855-7.00003-9>.
- [447] R. Holze, C.M.A. Brett, A.M.O. Brett: *Electrochemistry — Principles, methods and applications*, Oxford University Press, Oxford, ISBN 0-19-855388-9, 1993, 427 pages, £ 25.00, *Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie* 98 (1994) 1350–1350. <https://doi.org/10.1002/BBPC.19940981033>.
- [448] A. Hill, A. Hill, A. Paganini-Hill, *The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves*, *J. Physiol.* (n.d.).
- [449] S. Ramotowska, A. Ciesielska, M. Makowski, *What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions?*, *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 3478 26 (2021) 3478. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26113478>.
- [450] K.J. Atkins, P. W., de Paula J., *Physical Chemistry*, 11th ed, Oxford University Press, Oxford (2017) 944.
- [451] L. Di, E.H. Kerns, *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery: Optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side Effects for Peripheral Drugs*, *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery: Optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side Effects for Peripheral Drugs* (2015) 1–586. <https://doi.org/10.1002/9781118788523>.
- [452] V. Pavlovic, M. Petkovic, S. Popovic, V. Savic, *Synthesis of 4-Aryl-2-aminopyridine Derivatives and Related Compounds*, [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/00397910902898601](http://Dx.Doi.Org/10.1080/00397910902898601) 39 (2009) 4249–4263. <https://doi.org/10.1080/00397910902898601>.
- [453] N.R. Filipović, H. Elshaflu, S. Grubišić, L.S. Jovanović, M. Rodić, I. Novaković, A. Malešević, I.S. Djordjević, H. Li, N. Šojić, A. Marinković, T.R. Todorović, *Co(III) complexes of (1,3-selenazol-2-yl)hydrazones and their sulphur analogues*, *Dalton Transactions* 46 (2017) 2910–2924. <https://doi.org/10.1039/C6DT04785H>.
- [454] H. Elshaflu, T.R. Todorović, M. Nikolić, A. Lolić, A. Višnjevac, S. Hagenow, J.M. Padrón, A.T. García-Sosa, I.S. Djordjevic, S. Grubišic, H. Stark, N.R. Filipović, *Selenazolyl-hydrazones as novel selective MAO inhibitors with antiproliferative and antioxidant activities: Experimental and In-silico studies*, *Front. Chem.* 6 (2018) 247. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2018.00247/BIBTEX>.
- [455] D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, S. Shrivastava, M. Hassanali, P. Stothard, Z. Chang, J. Woolsey, *DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration*, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKJ067>.

- [456] T. Sander, J. Freyss, M. Von Korff, C. Rufener, DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis, *J. Chem. Inf. Model.* 55 (2015) 460–473. https://doi.org/10.1021/CI500588J/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CI-2014-00588J_0016.GIF.
- [457] M. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, H. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, J.L. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, T. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, F. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, R. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, J. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, C. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, P. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, J. V. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, and D.J.F. Ortiz, J. Cioslowski, Gaussian 09, (2009).
- [458] Dragon 6.5, (n.d.).
- [459] Simulations Plus Inc., ADMET Predictor, Simulations Plus Inc.: Lancaster, CA, USA (2015). <http://www.simulations-plus.com/Products.aspx?grpID=1&cID=10&pID=13>.
- [460] S. Inc, “Statistica,” Data Analysis Software System, (n.d.).
- [461] P.K. Ojha, K. Roy, Comparative QSARs for antimalarial endochins: Importance of descriptor-thinning and noise reduction prior to feature selection, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 109 (2011) 146–161. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2011.08.007>.
- [462] P.K. Ojha, I. Mitra, R.N. Das, K. Roy, Further exploring rm2 metrics for validation of QSPR models, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 107 (2011) 194–205. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2011.03.011>.
- [463] N. Chirico, P. Gramatica, Real external predictivity of QSAR models: How to evaluate It? Comparison of different validation criteria and proposal of using the concordance correlation coefficient, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (2011) 2320–2335. https://doi.org/10.1021/CI200211N/SUPPL_FILE/CI200211N_SI_001.PDF.
- [464] PASW Statistics for Windows, Version 18.0, (n.d.).
- [465] J. Rutar, V. Dobričić, J. Brborić, O. Čudina, M.M. Aleksić, Square wave voltammetric study of interaction between 9-acridinyl amino acid derivatives and DNA, *Bioelectrochemistry* 149 (2023) 108323. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECHEMA.2022.108323>.
- [466] X.J. Chen, B.L. Wang, K.L. Zhou, Y.Y. Lou, S.B. Kou, Z.Y. Lin, J.H. Shi, Characterizing the Binding Interaction between Erlotinib and Calf Thymus DNA In Vitro Using Multi-Spectroscopic Methodologies and Viscosity Measurement Combined with Molecular Docking and DFT Calculation, *ChemistrySelect* 4 (2019) 3774–3781. <https://doi.org/10.1002/SLCT.201900089>.
- [467] Lapatinib: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online, (n.d.). <https://go.drugbank.com/drugs/DB01259> (accessed February 3, 2023).

- [468] B. Dogan-Topal, B. Bozal-Palabiyik, S.A. Ozkan, B. Uslu, Investigation of anticancer drug lapatinib and its interaction with dsDNA by electrochemical and spectroscopic techniques, *Sens. Actuators B Chem.* 194 (2014) 185–194. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2013.12.088>.
- [469] H.K. Srivastava, M. Chourasia, D. Kumar, G.N. Sastry, Comparison of computational methods to model DNA minor groove binders, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (2011) 558–571. <https://doi.org/10.1021/CI100474N>.
- [470] J. Huang, S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B.L. De Groot, H. Grubmüller, A.D. MacKerell, CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins, *Nat. Methods* 14 (2016) 71–73. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4067>.
- [471] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, A.D. Mackerell, CHARMM General Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 671. <https://doi.org/10.1002/JCC.21367>.
- [472] H. Liu, T. Hou, CaFE: a tool for binding affinity prediction using end-point free energy methods, *Bioinformatics* 32 (2016) 2216–2218. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW215>.
- [473] B. Webb, A. Sali, Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER, *Current Protocols in Bioinformatics / Editorial Board, Andreas D. Baxevanis ... [et Al.]* 54 (2016) 5.6.1. <https://doi.org/10.1002/CPBI.3>.
- [474] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/JCC.20084>.
- [475] M. Shen, A. Sali, Statistical potential for assessment and prediction of protein structures, *Protein Science* 15 (2006) 2507–2524. <https://doi.org/10.1110/PS.062416606>.
- [476] C. Colovos, T.O. Yeates, Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions, *Protein Science* 2 (1993) 1511–1519. <https://doi.org/10.1002/PRO.5560020916>.
- [477] M. Torrens-Fontanals, P. Tournas, S. Doerr, G. De Fabritiis, PlayMolecule Viewer: A Toolkit for the Visualization of Molecules and Other Data, *J. Chem. Inf. Model.* 64 (2024) 584–589. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.3C01776/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CI3C01776_0005.GIF.
- [478] G. Jones, P. Willett, R.C. Glen, A.R. Leach, R. Taylor, Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, *J. Mol. Biol.* 267 (1997) 727–748. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0897>.
- [479] S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer, W. Im, CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM, *J. Comput. Chem.* 29 (2008) 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/JCC.20945>.
- [480] J. Lee, X. Cheng, J.M. Swails, M.S. Yeom, P.K. Eastman, J.A. Lemkul, S. Wei, J. Buckner, J.C. Jeong, Y. Qi, S. Jo, V.S. Pande, D.A. Case, C.L. Brooks, A.D. MacKerell, J.B. Klauda, W. Im, CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field, *J. Chem. Theory Comput.* 12 (2016) 405–413. https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.5B00935/ASSET/IMAGES/LARGE/CT-2015-00935E_0005.JPEG.

- [481] J.C. Phillips, D.J. Hardy, J.D.C. Maia, J.E. Stone, J. V. Ribeiro, R.C. Bernardi, R. Buch, G. Fiorin, J. Hénin, W. Jiang, R. McGreevy, M.C.R. Melo, B.K. Radak, R.D. Skeel, A. Singharoy, Y. Wang, B. Roux, A. Aksimentiev, Z. Luthey-Schulten, L. V. Kalé, K. Schulten, C. Chipot, E. Tajkhorshid, Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD, *J. Chem. Phys.* 153 (2020) 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>.
- [482] R.J. Gowers, M. Linke, J. Barnoud, T.J.E. Reddy, M.N. Melo, S.L. Seyler, J. Domański, D.L. Dotson, S. Buchoux, I.M. Kenney, O. Beckstein, MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations, *Scipy* (2016) 98–105. <https://doi.org/10.25080/MAJORA-629E541A-00E>.
- [483] N. Michaud-Agrawal, E.J. Denning, T.B. Woolf, O. Beckstein, MDAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations, *J. Comput. Chem.* 32 (2011) 2319–2327. <https://doi.org/10.1002/JCC.21787>;SUBPAGE:STRING:FULL.
- [484] L.A. Kelley, S.P. Gardner, M.J. Sutcliffe, An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally related subfamilies, *Protein Eng.* 9 (1996) 1063–1065. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/9.11.1063>.
- [485] BIOVIA Discovery Studio - BIOVIA - Dassault Systèmes®, (n.d.). <https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/> (accessed February 13, 2023).
- [486] Pentacle, (2009). <http://www.moldiscovery.com/software/pentacle/>.
- [487] Á. Durán Alcaide, Development of high-performance algorithms for a new generation of versatile molecular descriptors. The Pentacle software, 2011. <http://hdl.handle.net/10230/12143> (accessed August 26, 2025).
- [488] M. Baroni, G. Costantino, G. Cruciani, D. Riganelli, R. Valigi, S. Clementi, Generating Optimal Linear PLS Estimations (GOLPE): An Advanced Chemometric Tool for Handling 3D-QSAR Problems, *Quantitative Structure-Activity Relationships* 12 (1993) 9–20. <https://doi.org/10.1002/QSAR.19930120103>.
- [489] T. Cheeseright, M. Mackey, S. Rose, A. Vinter, Molecular field extreme as descriptors of biological activity: Definition and validation, *J. Chem. Inf. Model.* 46 (2006) 665–676. <https://doi.org/10.1021/CI050357S>.
- [490] M. Slater, A. Vinter, The xed force field and spark, in: *Scaffold Hopping in Medicinal Chemistry*, wiley, 2013: pp. 195–214. <https://doi.org/10.1002/9783527665143.CH13>;CSUBTYPE:STRING:EDITED.
- [491] M. Baroni, G. Cruciani, S. Sciabola, F. Perruccio, J.S. Mason, A common reference framework for analyzing/comparing proteins and ligands. Fingerprints for Ligands and Proteins (FLAP): Theory and application, *J. Chem. Inf. Model.* 47 (2007) 279–294. <https://doi.org/10.1021/CI600253E>.
- [492] S. Cross, M. Baroni, L. Goracci, G. Cruciani, GRID-based three-dimensional pharmacophores I: FLAPpharm, a novel approach for pharmacophore elucidation, *J. Chem. Inf. Model.* 52 (2012) 2587–2598. <https://doi.org/10.1021/CI300153D>/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CI-2012-00153D_0010.GIF.
- [493] S. Christmann-Franck, G.J.P. Van Westen, G. Papadatos, F. Beltran Escudie, A. Roberts, J.P. Overington, D. Domine, Unprecedentedly Large-Scale Kinase Inhibitor Set Enabling the

Accurate Prediction of Compound-Kinase Activities: A Way toward Selective Promiscuity by Design?, J. Chem. Inf. Model. 56 (2016) 1654–1675. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.6B00122/SUPPL_FILE/CI6B00122_SI_001.PDF.

- [494] M.T. Burger, M. Knapp, A. Wagman, Z.J. Ni, T. Hendrickson, G. Atallah, Y. Zhang, K. Frazier, J. Verhagen, K. Pfister, S. Ng, A. Smith, S. Bartulis, H. Merrit, M. Weismann, X. Xin, J. Haznedar, C.F. Voliva, E. Iwanowicz, S. Pecchi, Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of phosphoinositide-3-kinase inhibitors, ACS Med. Chem. Lett. 2 (2011) 34–38. <https://doi.org/10.1021/ML1001932>.
- [495] N.M. O’Boyle, M. Banck, C.A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, G.R. Hutchison, Open Babel: An open chemical toolbox, J. Cheminform. 3 (2011). <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>.
- [496] N.T. Kochev, V.H. Paskaleva, N. Jeliaskova, Ambit-tautomer: An open source tool for tautomer generation, Mol. Inform. 32 (2013) 481–504. <https://doi.org/10.1002/MINF.201200133>; JOURNAL: JOURNAL:15213838.
- [497] M.R. Berthold, N. Cebron, F. Dill, G. Di Fatta, T.R. Gabriel, F. Georg, T. Meinl, P. Ohl, C. Sieb, B. Wiswedel, KNIME: The konstanz information miner, 4th International Industrial Simulation Conference 2006, ISC 2006 (2006) 58–61. <https://doi.org/10.1145/1656274.1656280>; GROUPTOPIC: TOPIC: ACM-PUBTYPE.
- [498] R.M. Stein, Y. Yang, T.E. Balius, M.J. O’Meara, J. Lyu, J. Young, K. Tang, B.K. Shoichet, J.J. Irwin, Property-Unmatched Decoys in Docking Benchmarks, J. Chem. Inf. Model. 61 (2021) 699–714. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.0C00598/SUPPL_FILE/CI0C00598_SI_009.XLSX.
- [499] E.F. van Vliet, M.J. Knol, R.M. Schiffelers, M. Caiazzo, M.H.A.M. Fens, Levodopa-loaded nanoparticles for the treatment of Parkinson’s disease, Journal of Controlled Release 360 (2023) 212–224. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2023.06.026>.
- [500] G.N. Sekhar, A.L. Fleckney, S.T. Boyanova, H. Rupawala, R. Lo, H. Wang, D.B. Farag, K.M. Rahman, M. Broadstock, S. Reeves, S.A. Thomas, Region-specific blood-brain barrier transporter changes leads to increased sensitivity to amisulpride in Alzheimer’s disease, BioRxiv (2019) 582387. <https://doi.org/10.1101/582387>.
- [501] P. Breedveld, D. Pluim, G. Cipriani, P. Wielinga, O. Van Tellingen, A.H. Schinkel, J.H.M. Schellens, The Effect of Bcrp1 (Abcg2) on the In vivo Pharmacokinetics and Brain Penetration of Imatinib Mesylate (Gleevec): Implications for the Use of Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein Inhibitors to Enable the Brain Penetration of Imatinib in Pa..., Cancer Res. 65 (2005) 2577–2582. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2416>.
- [502] P.F. Peddi, S.A. Huvitz, PI3K pathway inhibitors for the treatment of brain metastases with a focus on HER2+ breast cancer, J. Neurooncol. 117 (2014) 7. <https://doi.org/10.1007/S11060-014-1369-6>.
- [503] Q. Wang, L.J. Song, Z. Bin Ding, Z. Chai, J.Z. Yu, B.G. Xiao, C.G. Ma, Advantages of Rho-associated kinases and their inhibitor fasudil for the treatment of neurodegenerative diseases, Neural Regen. Res. 17 (2022) 2623–2631. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.335827>.
- [504] K. Sato, S. Nakagawa, Y. Morofuji, Y. Matsunaga, T. Fujimoto, D. Watanabe, T. Izumo, M. Niwa, F.R. Walter, J.P. Vigh, A.R. Santa-Maria, M.A. Deli, T. Matsuo, Effects of fasudil on

blood-brain barrier integrity, *Fluids Barriers CNS* 19 (2022). <https://doi.org/10.1186/S12987-022-00336-W>.

- [505] E.G. Leprieur, V. Fallet, J. Cadranet, M. Wislez, Spotlight on crizotinib in the first-line treatment of ALK-positive advanced non-small-cell lung cancer: patients selection and perspectives, *Lung Cancer: Targets and Therapy* 7 (2016) 83. <https://doi.org/10.2147/LCTT.S99303>.
- [506] L. Di, E.H. Kerns, Blood-Brain Barrier in Drug Discovery: Optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side Effects for Peripheral Drugs, *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery: Optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side Effects for Peripheral Drugs* (2015) 1–586. <https://doi.org/10.1002/9781118788523>.
- [507] R. Todeschini, V. Consonni, Handbook of Molecular Descriptors, (2000). <https://doi.org/10.1002/9783527613106>.
- [508] L. Zhang, H. Zhu, T.I. Oprea, A. Golbraikh, A. Tropsha, QSAR modeling of the blood-brain barrier permeability for diverse organic compounds, *Pharm. Res.* 25 (2008) 1902–1914. <https://doi.org/10.1007/S11095-008-9609-0>.
- [509] D. Barn, W. Caulfield, P. Cowley, R. Dickins, W. Iwema Bakker, R. McGuire, J. Richard Morphy, Z. Rankovic, M. Thorn, Design and synthesis of a maximally diverse and druglike screening library using REM resin methodology, *J. Comb. Chem.* 3 (2001) 534–541. <https://doi.org/10.1021/CC000096T>.
- [510] T.T. Wager, X. Hou, P.R. Verhoest, A. Villalobos, Moving beyond rules: The development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties, *ACS Chem. Neurosci.* 1 (2010) 435–449. https://doi.org/10.1021/CN100008C/SUPPL_FILE/CN100008C_SI_003.PDF.
- [511] D.K. Gosser, *Cyclic voltammetry : simulation and analysis of reaction mechanisms*, Published in 1993 in New York NY) by VCH (1993) 154. <https://lib.ugent.be/catalog/rug01:000316153> (accessed June 15, 2023).
- [512] M. Gumustas, S.A. Ozkan, Electrochemical evaluation and determination of antiretroviral drug fosamprenavir using boron-doped diamond and glassy carbon electrodes, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 189–203. <https://doi.org/10.1007/S00216-009-3334-3>.
- [513] Fda, HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION, (n.d.). www.fda.gov/medwatch. (accessed May 28, 2023).
- [514] N.K. Bakirhan, T.T. Tok, S.A. Ozkan, The redox mechanism investigation of non-small cell lung cancer drug: Erlotinib via theoretical and experimental techniques and its host–guest detection by B-Cyclodextrin nanoparticles modified glassy carbon electrode, *Sens. Actuators B Chem.* 278 (2019) 172–180. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2018.09.090>.
- [515] J. Rutar, M.M. Aleksić, V. Dobričić, J. Brborić, O. Čudina, An electrochemical study of 9-chloroacridine redox behavior and its interaction with double-stranded DNA, *Bioelectrochemistry* 135 (2020) 107579. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECHEM.2020.107579>.
- [516] A.M. Nowicka, E. Zabost, B. Klim, Z. Mazerska, Z. Stojek, Interactions of Dissolved dsDNA with Intercalating Drug by Anodic Voltammetry and Spectroscopy. Influence of pH, *Electroanalysis* 21 (2009) 52–60. <https://doi.org/10.1002/ELAN.200804464>.

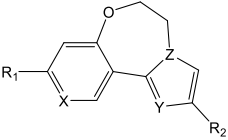
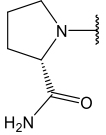
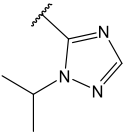
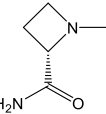
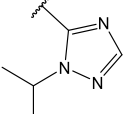
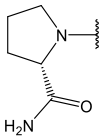
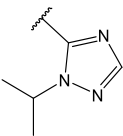
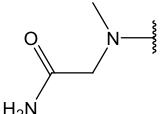
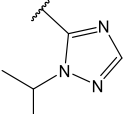
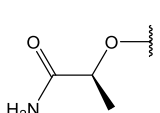
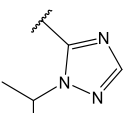
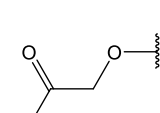
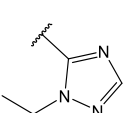
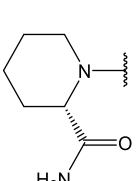
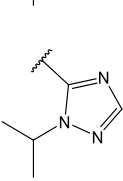
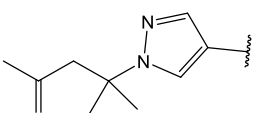
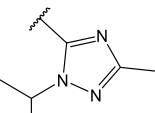
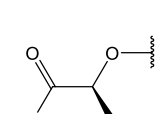
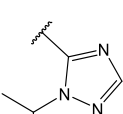
- [517] A.M. Chiorcea-Paquim, A.M. Oliveira-Brett, DNA Electrochemical Biosensors for In Situ Probing of Pharmaceutical Drug Oxidative DNA Damage, *Sensors (Basel)* 21 (2021) 1–26. <https://doi.org/10.3390/S21041125>.
- [518] S. Ramotowska, A. Ciesielska, M. Makowski, What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions?, *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 3478 26 (2021) 3478. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26113478>.
- [519] B. Dogan-Topal, B. Bozal-Palabiyik, S.A. Ozkan, B. Uslu, Investigation of anticancer drug lapatinib and its interaction with dsDNA by electrochemical and spectroscopic techniques, *Sens. Actuators B Chem.* 194 (2014) 185–194. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2013.12.088>.
- [520] S. Bilge, B. Dogan-Topal, T. Taskin Tok, E.B. Atici, A. Sınağ, S.A. Ozkan, Investigation of the interaction between anticancer drug ibrutinib and double-stranded DNA by electrochemical and molecular docking techniques, *Microchemical Journal* 180 (2022) 107622. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2022.107622>.
- [521] M.L. Pedano, G.A. Rivas, Immobilization of DNA at Glassy Carbon Electrodes: A Critical Study of Adsorbed Layer, *Sensors* 2005, Vol. 5, Pages 424–447 5 (2005) 424–447. <https://doi.org/10.3390/S5060424>.
- [522] D. Eskiköy Bayraktepe, C. Yıldız, Z. Yazan, The development of electrochemical DNA biosensor based on poly-L-methionine and bimetallic AuPt nanoparticles coating: Picomolar detection of Imatinib and Erlotinib, *Talanta* 257 (2023). <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2023.124361>.
- [523] W. Bouali, N. Erk, A.A. Genc, H.E.H. AHMED, M. Soylak, A new and powerful electrochemical sensing platform based on MWCNTs@Fe₃O₄@CuAl₂O₄ for the determination of the anticancer agent Alpelisib in bulk and biological fluids, *Microchemical Journal* 195 (2023). <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2023.109478>.
- [524] B. Barlaam, S. Cosulich, S. Degorce, M. Fitzek, S. Green, U. Hancox, C. Lambert-Van Der Brempt, J.J. Lohmann, M. Maudet, R. Morgentin, M.J. Pasquet, A. Péru, P. Plé, T. Saleh, M. Vautier, M. Walker, L. Ward, N. Warin, Discovery of (R)-8-(1-(3,5-difluorophenylamino)ethyl)-N,N-dimethyl-2-morpholino-4-oxo-4H-chromene-6-carboxamide (AZD8186): a potent and selective inhibitor of PI3K β and PI3K δ for the treatment of PTEN-deficient cancers, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 943–962. <https://doi.org/10.1021/JM501629P>.
- [525] T.P. Heffron, B. Wei, A. Olivero, S.T. Staben, V. Tsui, S. Do, J. Dotson, A.J. Folkes, P. Goldsmith, R. Goldsmith, J. Gunzner, J. Lesnick, C. Lewis, S. Mathieu, J. Nonomiya, S. Shuttleworth, D.P. Sutherlin, N.C. Wan, S. Wang, C. Wiesmann, B.Y. Zhu, Rational design of phosphoinositide 3-kinase inhibitors that exhibit selectivity over the phosphoinositide 3-kinase isoform, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 7815–7833. https://doi.org/10.1021/JM2007084/SUPPL_FILE/JM2007084_SI_001.PDB.
- [526] M. Al Hasan, M. Sabirianov, G. Redwine, K. Goettsch, S.X. Yang, H.A. Zhong, Binding and selectivity studies of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors, *J. Mol. Graph. Model.* 121 (2023) 108433. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2023.108433>.
- [527] X. Zhang, O. Vadas, O. Perisic, K.E. Anderson, J. Clark, P.T. Hawkins, L.R. Stephens, R.L. Williams, Structure of Lipid Kinase p110 β /p85 β Elucidates an Unusual SH2-Domain-

Mediated Inhibitory Mechanism, *Mol. Cell* 41 (2011) 567–578.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.01.026>.

- [528] D. Halder, S. Mukherjee, R.S. Jeyaparakash, Exploring target selectivity in designing and identifying PI3K α inhibitors for triple negative breast cancer with fragment-based and bioisosteric replacement approach, *Scientific Reports* 2025 15:1 15 (2025) 1890-.
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-83030-1>.
- [529] K. Tochukwu Dibia, S. Nneka Van-Dibia, P. Kanwulia Igbokwe, Rational drug design from phosphatidylinositol 3-kinase- α inhibitors through molecular docking and 3D-QSAR methodologies for cancer immunotherapy, *INNOSC Theranostics and Pharmacological Sciences* 7 (2024) 2340. <https://doi.org/10.36922/ITPS.2340>.
- [530] M. Wang, X. Liu, X. Chen, J. Li, R. Liu, L. Zou, W. Yang, Y. He, M. Shu, Design of Novel PI3K α Inhibitors by Combining 3D-QSAR, ADMET Screening, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulations, *Chemistry Africa* 2025 8:9 8 (2025) 4527–4545.
<https://doi.org/10.1007/S42250-025-01398-7>.

7. PRILOZI

Tabela P1.1. Jedinjenja iz seta podataka benzoksazepinskog (Bzo) klastera i njihove pK_i vrednosti za PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ izoforme.

										
Oznaka jedinjenja	ChEMBL identifikator	X	Y	Z	R ₁	R ₂	PI3K α pK_i	PI3K β pK_i	PI3K γ pK_i	PI3K δ pK_i
B1	ChEMBL3770993	C	N	N			10,523	8,253	8,697	9,654
B2	ChEMBL3770306	C	N	N			10,000	8,161	8,328	9,137
B3	ChEMBL3770709	N	N	N			10,000	7,550	7,955	8,569
B4	ChEMBL3770325	N	N	N			9,699	7,569	8,046	8,699
B5	ChEMBL3771364	C	N	N			9,699	7,575	7,991	8,398
B6	ChEMBL3770140	C	N	N			9,523	8,319	8,620	9,523
B7	ChEMBL3770717	C	N	N			9,523	7,007	7,327	8,319
B8	ChEMBL2387080	C	N	N			9,523	8,032	9,004	9,921
B9	ChEMBL3769854	C	N	N			9,301	7,086	7,577	8,071

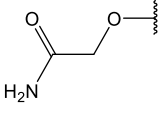
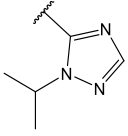
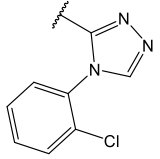
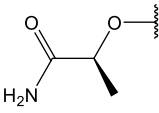
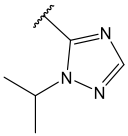
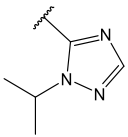
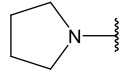
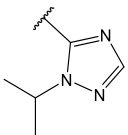
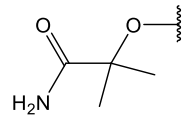
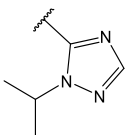
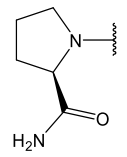
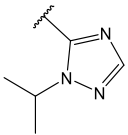
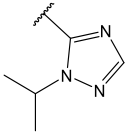
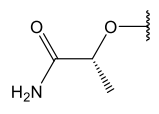
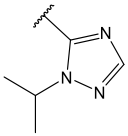
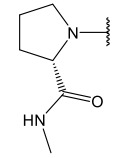
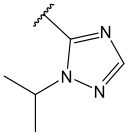
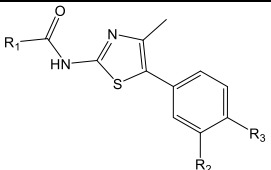
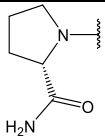
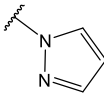
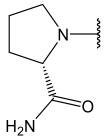
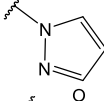
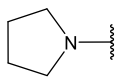
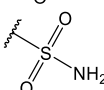
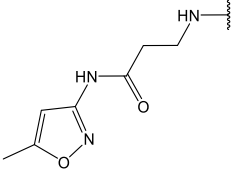
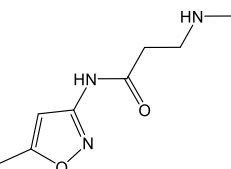
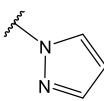
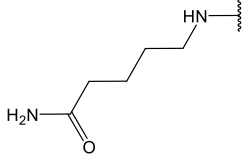
B10	ChEMBL3769966	N	N	N			9,046	7,393	8,233	8,321
B11	ChEMBL3770332	C	S	C			9,000	7,284	8,886	8,745
B12	ChEMBL3770824	N	N	N			9,000	6,857	7,602	8,066
B13	ChEMBL3770630	N	N	N			8,921	7,807	9,018	8,642
B14	ChEMBL3770092	N	N	N			8,886	7,886	9,187	9,041
B15	ChEMBL3769972	N	N	N			8,509	7,147	7,395	8,147
B16	ChEMBL3769603	N	N	N			8,495	6,696	7,173	8,349
B17	ChEMBL3770615	N	N	N			8,444	7,365	8,489	8,489
B18	ChEMBL3770644	C	N	N			8,444	7,165	8,330	8,444
B19	ChEMBL3769857	N	N	N			7,523	6,268	6,979	7,921

Tabela P1.2. Jedinjenja iz seta podataka tiazolnog (Thz) klastera i njihove pK_i vrednosti za PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ izoforme.

								
Oznaka jedinjenja	ChEMBL identifikator	R ₁	R ₂	R ₃	PI3K α pK_i	PI3K β pK_i	PI3K γ pK_i	PI3K δ pK_i
T1	ChEMBL2071332				8,301	5,699	6,276	6,658
T2	ChEMBL2071333				7,959	6,260	7,495	7,495
T3	ChEMBL2071328				7,699	>5,000	5,943	5,943
T4	ChEMBL2071331				7,553	6,060	7,215	7,215
T5	ChEMBL2071336				7,523	5,845	6,959	6,959
T6	ChEMBL2071326				7,456	5,886	7,244	7,244
T7	ChEMBL2071340				7,347	6,119	7,208	7,208
T8	ChEMBL2071330				7,301	>5,000	5,236	5,236
T9	ChEMBL1986603				6,959	5,712	5,514	5,514
T10	ChEMBL2071335				6,959	6,066	6,921	8,523
T11	ChEMBL2071334				6,914	5,851	6,738	6,914
T12	ChEMBL2071327				6,824	6,469	5,991	8,398
T13	ChEMBL2071342				6,728	>5,000	6,585	5,441
T14	ChEMBL2069328				6,721	6,387	6,959	6,721

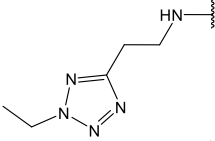
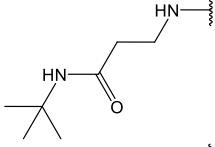
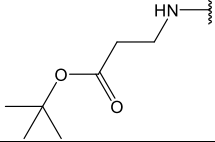
T15	ChEMBL2071341				6,699	5,866	6,638	6,699
T16	ChEMBL2071332				5,854	6,495	7,444	6,328
T17	ChEMBL2071333				5,724	6,602	7,056	6,131
T18	ChEMBL2071328				5,672	7,046	7,699	6,420

Tabela P1.3. Eksperimentalne i predviđene $\log P_e$ vrednosti dobijene PAMPA-KMB QSPR modelima

Jedinjenje	Eksperimentalni $\log P_e$	MLR predviđeni $\log P_e$	SVM predviđeni $\log P_e$	ANN predviđeni $\log P_e$
Trening set				
Jedinjenje 2	-5,950	-5,776	-5,846	-5,725
Vemurafenib	-5,930	-6,002	-5,833	-5,891
Afatinib	-5,830	-5,510	-5,733	-5,587
Nintedanib	-5,800	-5,666	-5,731	-5,739
Jedinjenje 5	-5,790	-5,585	-5,593	-5,582
Jedinjenje 16	-5,790	-5,648	-5,621	-5,639
Jedinjenje 7	-5,700	-5,617	-5,600	-5,611
Jedinjenje 14	-5,680	-5,553	-5,583	-5,549
Jedinjenje 17	-5,640	-5,553	-5,583	-5,549
Nilotinib	-5,620	-5,606	-5,594	-5,689
Jedinjenje 11	-5,600	-5,493	-5,500	-5,483
Jedinjenje 9	-5,550	-5,617	-5,600	-5,611
Jedinjenje 4	-5,530	-5,617	-5,600	-5,611
Jedinjenje 6	-5,510	-5,648	-5,621	-5,639
Crizotinib	-5,460	-5,521	-5,553	-5,515
Erlotinib	-5,420	-5,638	-5,522	-5,717
Jedinjenje 12	-5,410	-5,585	-5,593	-5,582
Imatinib	-5,320	-5,333	-5,351	-5,281
Dabrafenib	-5,310	-5,457	-5,414	-5,439
Lapatinib	-5,310	-5,365	-5,411	-5,324
Jedinjenje 15	-5,280	-5,585	-5,593	-5,582
Fasudil	-5,170	-5,056	-5,273	-5,111
Everolimus	-5,120	-5,218	-5,223	-5,168
Axitinib	-4,930	-5,041	-5,026	-4,948
Palbociclib	-4,680	-4,651	-4,785	-4,674
Test set				
Jedinjenje 1	-5,800	-5,808	-5,892	-5,742
Jedinjenje 8*	-5,750	-5,617	-5,626	-5,615
Gefitinib	-5,620	-5,482	-5,509	-5,556
Jedinjenje 10*	-5,610	-5,585	-5,585	-5,581
Jedinjenje 13	-5,590	-5,585	-5,585	-5,582
Jedinjenje 3*	-5,490	-5,648	-5,668	-5,647
RKI-1447	-5,430	-5,350	-5,320	-5,370
N-dezmetilimatinib*	-5,270	-5,333	-5,324	-5,260
Ruxolitinib	-5,120	-5,122	-5,115	-5,047

*Verifikacioni *set jedinjenja* u ANN modelu.

Biografija autora

Milan J. Jovanović rođen je u Beogradu. Završio je Prvu beogradsku gimnaziju 2013. godine kao nosilac Vukove diplome. Iste godine upisao je integrisane akademske studije Farmacija na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, koje je završio 2018. godine sa prosečnom ocenom 8,56. Završni rad pod nazivom „3D-QSAR studija selektivnih inhibitora PI3K- α kinaze kao potencijalnih antineoplastika“ uradio je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Katarine Nikolić, i odbranio sa ocenom 10. Doktorske akademske studije upisao je 2018. godine na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu, na modulu Farmaceutska hemija, pod mentorstvom prof. dr Katarine Nikolić i prof. dr Milkice Crevar.

Od novembra 2018. godine angažovan je kao saradnik u nastavi/saradnik van radnog odnosa na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od 2022. godine zaposlen je u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“ – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, kao istraživač pripravnik, a od 2023. godine kao istraživač saradnik, gde je angažovan na istraživačkoj temi pod nazivom „Preklinička i klinička ispitivanja psihijatrijskih i neurodegenerativnih bolesti“.

Kao autor i koautor objavio tri rada u vodećim međunarodnim časopisima kategorije M21, jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu kategorije M22, jedan rad u nacionalnom časopisu kategorije M52, tri saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini kategorije M33 i tri saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu kategorije M34.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Milan Jovanović

Broj indeksa: 11/2018

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Heminformatička analiza, dizajn i ispitivanje inhibitora lipidnih i protein kinaza kao potencijalno novih antineoplastika“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Obrazac 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Milan Jovanović

Broj indeksa: 11/2018

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada: Heminformatička analiza, dizajn i ispitivanje inhibitora lipidnih i protein kinaza kao potencijalno novih antineoplastika

Mentori:

Prof. dr Katarina Nikolić, redovni profesor na Katedri za farmaceutsku hemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Miloš Petković, vanredni profesor na Katedri za farmaceutsku hemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Heminformatička analiza, dizajn i ispitivanje inhibitora lipidnih i protein kinaza kao potencijalno novih antineoplastika“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

③ Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.