

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Milan T. Beljkaš

**Određivanje strukture farmakofore, dizajn, sinteza i
in vitro ispitivanje dualnih inhibitora histon
deacetilaza (HDAC) i Rho-vezanih protein kinaza
(ROCK)**

doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Milan T. Beljkaš

**Determination of the pharmacophore structure,
design, synthesis and *in vitro* evaluation of dual
inhibitors of histone deacetylases (HDAC) and Rho-
associated protein kinases (ROCK)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

Mentori doktorske disertacije:

Prof. dr Slavica Oljačić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Prof. dr Miloš Petković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Članovi komisije:

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

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

Dr sc. Predrag Jovanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Tatjana Srđić-Rajić, naučni savjetnik
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Dr sc. Selma Zukić, naučni saradnik
Hemijski Institut, Univerzitet u Tartuu, Estonija

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

„Stvari mogu da postoje i kad se ne vide jasno“

Pet godina, šezdeset mjeseci i 43200 sati kasnije, želim da izrazim svoju najdublju zahvalnost porodici, prijateljima i svim saradnicima na nesebičnoj podršci i pomoći tokom procesa izrade svega onoga što ćete moći pročitati u nastavku. Svjestan sam da nije bilo lako, da nekad nisam bio idealan unuk, sin, brat, saradnik, prijatelj, ali se nadam da će ova zahvalnica učiniti da zaboravite te loše momente – ipak ih nije bilo previše, bar se nadam!

Posebna zahvalnica ide mojim mentorima, Milošu Petkoviću, Slavici Oljačić, Katarini Nikolić i Dušanu Ružiću na svemu što su uradili za mene u samom procesu – hvala vam!

Veliku zahvalnost upućujem i Rudniku uglja A.D. Pljevlja i Opštini Pljevlja, čija je finansijska podrška u značajnoj meri doprinela realizaciji ove doktorske disertacije.

Za kraj, moram da izdvojim jednu osobu – svoju poslovnu sabornicu, psihoterapeuta i prijateljicu, koja je sa mnom podelila sve uspone i padove ovog puta, jer je mogla najbolje da me razume – i sama prolazeći kroz isti „sos“ zvan doktorat. Jero, oko moje – ništa bez tebe!

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojim roditeljima, Tihomiru i Mirjani.

„The most solid pleasure in this life is the empty pleasure of illusion“

SAŽETAK

Duktalni adenokarcinom pankreasa (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) i trostruko-negativni karcinom dojke (*triple-negative breast cancer*, TNBC) spadaju u tumore sa najlošijom prognozom što naglašava hitnu potrebu za novim terapijskim strategijama u cilju poboljšanja terapijskog ishoda. Epigenetički i kinazni signalni putevi imaju bitnu ulogu u tumorogenezi i progresiji ovih maligniteta. U tom kontekstu, histon-deacetilaze (*histone deacetylases*, HDAC) i *Rho*-vezane protein kinaze (*Rho-associated coiled-coil kinases*, ROCK) se ističu kao relevantni targeti u tretmanu različitih vrsta karcinoma, uključujući TNBC i PDAC. S obzirom na prednosti *multitarget* terapijskih pristupa, zabilježene sinergističke efekte između HDAC i ROCK inhibitora u *in vitro* i *in silico* studijama, kao i njihov značaj u patogenezi ovih tumora, dizajn i razvoj dualnih HDAC/ROCK inhibitora predstavlja inovativnu i obećavajuću strategiju za liječenje ovih agresivnih maligniteta.

U ovoj doktorskoj disertaciji istraživanje je sprovedeno u četiri faze. Prvo, primjenom kvantitativnih studija odnosa strukture i aktivnosti (*Quantitative structure-activity relationship*, QSAR) i molekuskog dokinga, razvijena je farmakofora ROCK1/ROCK2 inhibitora, na osnovu koje su dizajnirani novi ROCK inhibitori. Identifikovan je region fasudila, poznatog ROCK inhibitora, koji nije esencijalan za interakcije sa ROCK enzimima, što je omogućilo njegovu strukturnu modifikaciju i integraciju HDAC farmakofore. Na ovaj način su po prvi put dizajnirani dualni HDAC/ROCK inhibitori. U drugoj fazi istraživanja, dizajnirani ROCK i HDAC/ROCK inhibitori su sintetisani, nakon čega je u trećem segmentu istraživanja ispitana njihova enzimaska aktivnost, kao i antitumorska svojstva u dvodimenzionalnim i trodimenzionalnim ćelijskim kulturama TNBC (MDA-MB-231, MDA-MB-468) i PDAC (MiaPaCa-2, Panc-1). Finalno, na osnovu svih prethodnih rezultata, u četvrtoj fazi je uspostavljen detaljan *in silico* protokol za budući dizajn i optimizaciju strukture dualnih HDAC/ROCK inhibitora. Dati protokol se zasniva na kombinaciji metoda dizajna zasnovanog na strukturi ciljnog mjesta dejstva (*Structure-based drug desing*, SBDD) i dizajna zasnovanog na strukturi liganda (*Ligand-based drug design*, LBDD) koje uključuju molekulski doking, 2D-QSAR modele formirane korišćenjem algoritama mašinskog učenja i računanje slobodne energije vezivanja MM-GBSA metodom.

Među dizajniranim ROCK inhibitorima, jedinjenje **C-19** se izdvojilo po svojoj inhibitornoj aktivnosti na ROCK1 ($IC_{50} = 4,22 \mu M$) i ROCK2 ($IC_{50} = 6,13 \mu M$), kao i po citotoksičnom efektu na MiaPaCa-2 i Panc-1 ćelijama ($IC_{50} = 19,10 \mu M$ i $35,03 \mu M$). Takođe, **C-19** je ispoljilo anti-migratorna i anti-invazivna svojstva, uporediva sa fasudilom.

Najperspektivnije među sintetisanim HDAC/ROCK dualnim inhibitorima je jedinjenje **C-9**, koje je pokazalo snažnu inhibiciju ROCK1 ($IC_{50} = 800 nM$), ROCK2 ($IC_{50} = 700 nM$) i HDAC6 ($IC_{50} = 185 nM$). U ispitivanjima citotoksičnosti, **C-9** je pokazalo značajno bolju aktivnost od poznatih inhibitora fasudila i tubastatina A, sa IC_{50} vrijednostima od $5,81 \mu M$ za MDA-MB-231, $3,87 \mu M$ za MiaPaCa-2 i $19,57 \mu M$ za Panc-1. Pored toga, **C-9** je demonstrirao visok stepen efikasnosti u 3D tumorskim sferoidnim modelima, inhibirajući formiranje i vijabilnost Panc-1 i MiaPaCa-2 sferoida. Takođe, **C-9** je nadmašilo fasudil u smanjenju migracije i invazije MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 ćelija, što ga definiše kao obećavajućeg kandidata za dalju prekliničku evaluaciju u tretmanu metastatskih karcinoma.

Na osnovu ovih rezultata, **C-9** je identifikovan kao vodeći molekul (*lead*) i njegova struktura je dalje optimizovana u skladu sa prethodno definisanom ROCK farmakoforom, što je dovelo do dizajniranja i sinteze novih HDAC/ROCK dualnih inhibitora. Primjenom metoda SBDD razvijena je serija novih dualnih HDAC/ROCK inhibitora. Molekulski doking i analiza slobodne energije vezivanja primjenom MM-GBSA metode su potvrdile snažne i specifične interakcije sa katalitičkim mjestima oba enzima. Na osnovu dobijenih *in silico* rezultata, sintetisano je deset jedinjenja koja su zatim biološki evaluirana.

Među sintetisanim jedinjenjima, **C-35** i **C-40** su pokazala izrazitu citotoksičnost prema TNBC ćelijskim linijama, sa IC_{50} vrijednostima od 17 μM i 27 μM na MDA-MB-231 ćelijama, odnosno 35 μM na MDA-MB-468 ćelijama. Njihova aktivnost je premašila poznate selektivne HDAC6 i ROCK inhibitore, poput tubastatina A i fasudila. Dalje mehanističke studije su pokazale da ova jedinjenja indukuju ranu apoptozu, izazivaju zastoje u ćelijskom ciklusu i dovode do smanjenja ekspresije imunosupresivnog markera PD-L1 (ligand programirane smrti 1, *programmed death-ligand 1*). Posebno je značajno što je tretman **C-35** dodatno uzrokovao povećanje ekspresije MICA proteina (*MHC class I polypeptide-related sequence A*) u MDA-MB-468 ćelijama, a tretman **C-9** smanjenje ekspresije PVR (*poliovirus receptor*), što može doprinijeti poboljšanoj imunološkoj prepoznatljivosti i eliminaciji tumorskih ćelija od strane efektorskih imunskih ćelija.

U cilju dodatne racionalizacije optimizacije struktura, sintetisana jedinjenja i njihove eksperimentalno određene IC_{50} vrijednosti na enzimima su dalje korišćene za formiranje seta za slijepu validaciju, koji je poslužio za razvoj QSAR modela baziranih na algoritmima mašinskog učenja (*Random Forest*) za HDAC6 i ROCK2. Ovi modeli, razvijeni po prvi put za oba targeta istovremeno, pokazali su visoke prediktivne performanse i integrisani su u sveobuhvatan CADD (*computer-aided drug design*) protokol koji kombinuje pristupe SBDD (molekulski doking, MM-GBSA) i LBDD (QSAR) za dizajn i optimizaciju novih HDAC/ROCK dualnih inhibitora.

Ova doktorska disertacija predstavlja sveobuhvatan pristup dizajnu, sintezi i evaluaciji novih dualnih HDAC/ROCK inhibitora uz primjenu računarske hemije, enzimskih ispitivanja i prekliničkih ćelijskih modela. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije ukazuju na izraženi antitumorski, antiinvazivni, antimigratorni i imunomodulatorni potencijal dualnih HDAC/ROCK inhibitora. Dobijeni rezultati predstavljaju čvrstu osnovu za dalju optimizaciju i preklinički razvoj *multitarget* terapija namenjenih tretmanu metastatskih formi maligniteta kao što su duktalni adenokarcinom pankreasa i trostruko-negativni karcinom dojke.

Ključne riječi: histon deacetilaze, rho-vezane protein kinaze, dualni inhibitori, racionalni dizajn lijekova, molekulski doking, mašinsko učenje, QSAR, trostruko-negativni tumor dojke, duktalni adenokarcinom pankreasa.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutsko-medicinska hemija i strukturna analiza

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and triple-negative breast cancer (TNBC) are among the most aggressive malignancies with extremely poor prognoses, highlighting the urgent need for innovative therapeutic strategies to improve treatment outcomes. Epigenetic mechanisms and kinase signaling pathways play a crucial role in the tumorigenesis and progression of these cancers, with histone deacetylases (HDACs) and Rho-associated protein kinases (ROCKs) emerging as relevant therapeutic targets. Given the advantages of multi-target therapeutic approaches, the observed synergistic effects between HDAC and ROCK inhibitors in *in vitro* and *in silico* studies, and their critical roles in the pathogenesis of these tumors, the design and development of dual HDAC/ROCK inhibitors represent an innovative and promising strategy for treating these aggressive malignancies.

This research was conducted in four phases. Initially, using quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) studies and molecular docking, a pharmacophore model for ROCK1/ROCK2 inhibitors was developed, leading to the design of novel ROCK inhibitors. A non-essential region of fasudil, a known ROCK inhibitor, was identified by molecular docking study, enabling its structural modification and the incorporation of an HDAC pharmacophore while preserving ROCK inhibitory activity. This approach resulted in the first-ever designed dual HDAC/ROCK inhibitors. In the second phase, the designed ROCK and HDAC/ROCK inhibitors were synthesized, followed by the third phase, which involved evaluating their enzymatic activity and anticancer properties using two-dimensional and three-dimensional cell culture models of TNBC (MDA-MB-231) and PDAC (MiaPaCa-2, Panc-1). Finally, based on all previous findings, the fourth phase established a comprehensive *in silico* protocol for the future design and structural optimization of dual HDAC/ROCK inhibitors. This protocol integrates structure-based drug design (SBDD) and ligand-based drug design (LBDD) methodologies, incorporating molecular docking, 2D-QSAR models developed using machine learning algorithms, and binding free energy calculations performed using the MM-GBSA approach.

Among the designed ROCK inhibitors, compound **C-19** demonstrated notable inhibitory activity against ROCK1 ($IC_{50} = 4.22 \mu M$) and ROCK2 ($IC_{50} = 6.13 \mu M$), as well as cytotoxic effects on MiaPaCa-2 and Panc-1 cells ($IC_{50} = 19.10 \mu M$ and $35.03 \mu M$). Additionally, **C-19** exhibited significant anti-migratory and anti-invasive properties, comparable to fasudil.

The most promising of the synthesized HDAC/ROCK dual inhibitors was **C-9**, which showed potent inhibition of ROCK1 ($IC_{50} = 800 \text{ nM}$), ROCK2 ($IC_{50} = 700 \text{ nM}$), and HDAC6 ($IC_{50} = 185 \text{ nM}$). In cytotoxicity assays, **C-9** demonstrated significantly higher activity than the well-known inhibitors fasudil and tubastatin A, with IC_{50} values of $5.81 \mu M$ for MDA-MB-231, $3.87 \mu M$ for MiaPaCa-2, and $19.57 \mu M$ for Panc-1. Moreover, **C-9** exhibited strong efficacy in 3D tumor spheroid models, effectively inhibiting the formation and viability of Panc-1 and MiaPaCa-2 spheroids. Additionally, **C-9** outperformed fasudil in reducing the migration and invasion of MDA-MB-231 and MiaPaCa-2 cells, establishing itself as a promising candidate for further preclinical evaluation in the treatment of metastatic cancers.

Based on these results, **C-9** was identified as the lead compound, and its structure was further optimized according to the previously defined ROCK pharmacophore model. Structure-based drug design (SBDD) was used to develop a series of novel HDAC/ROCK dual inhibitors. Molecular docking and MM-GBSA binding free energy analysis confirmed strong and specific interactions with the catalytic sites of both targets. Based on these computational insights, ten compounds were synthesized and biologically evaluated using enzyme inhibition and cancer cell assays.

Among the synthesized compounds, **C-35** and **C-40** showed remarkable cytotoxic activity against TNBC cell lines, with IC_{50} values of 17 μ M and 27 μ M against MDA-MB-231 cells and 35 μ M against MDA-MB-468 cells, respectively, outperforming known selective HDAC6 and ROCK inhibitors such as tubastatin A and fasudil. Further mechanistic studies revealed that these compounds induce early apoptosis, arrest cell cycle progression and downregulate PD-L1 (programmed death-ligand 1) expression. Remarkably, **C-35** also increased the expression of MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) in MDA-MB-468 cells, possibly promoting the recognition and elimination of tumor cells by immune cells.

To further support rational drug optimization, we used synthesized compounds and their IC_{50} values for the enzymes to form an external blind validation set that enabled the development of machine learning-based 2D-QSAR models for HDAC6 and ROCK2. These models, developed for the first time for both targets, showed strong predictive performance and were integrated into a comprehensive CADD (computer-aided drug desing) workflow combining structure-based (molecular docking and MM-GBSA) and ligand-based (QSAR) methods for drug development.

This dissertation presents an integrative and multidisciplinary approach for the rational design, synthesis and biological evaluation of novel dual HDAC/ROCK inhibitors using computational chemistry, enzymatic assays and preclinical cancer cell models. The research shows that the developed multitarget compounds exhibit potent antitumor, anti-invasive, anti-migratory and immunomodulatory properties. These biological effects are supported by both *in silico* and experimental data highlighting their efficacy in influencing key oncogenic signaling pathways. The results provide a solid foundation for further optimization and preclinical development of multitarget therapeutics, particularly for the treatment of metastatic cancers such as pancreatic ductal adenocarcinoma and triple negative breast cancer.

Key words: histone deacetylases, rho-associated coiled-coil kinases, dual inhibitors, rational drug design, molecular docking, machine learning, QSAR, triple-negative breast cancer, pancreatic ductal adenocarcinoma.

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

Spisak skraćenica

AD	Domen primjenljivosti
AR	Androgeni receptori
BRAF	B-Raf serin-treonin kinaze
CADD	Računarske tehnike racionalnog dizajna lijekova
CAP	Heterociklus koji intereaguje sa spoljašnjim džepom katalitičkog domena histon-deacetilaza
CD1/2	Katalitički domeni 1/2
CDK4/6	Ciklin zavisna kinaza 4/6
DCM	Dihlormetan
DMF	Dimetilformamid
ECM	Ekstracelularni matriks
EGFR	Receptor za epidermalni faktor rasta
EMT	Epitelno-mezenhimska tranzicija
FAK	Fokalna adhezijska kinaza
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove
FITC	Fluorescein izotiocijanat
GRIND	GRID promjenljive nezavisne od poravnanja
HAT	Histon-acetil transferaze
HDAC	Histon-deacetilaze
HIF-1 α	Hipoksijom inducibilni faktor 1 α
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i> – šaperonski protein
HTS	Visokopropusni skrining
LBDD	Dizajn zasnovan na strukturi liganda
LBVS	Virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda
LSD1	Lizin specifična demetilaza 1
MAPK	Mitogenom aktivirane protein kinaze
MIF	Molekulska polja interakcije
ML	Mašinsko učenje
MLC-II	Laki lanac miozina II
MMP	Matriksne metaloproteinaze
MTDL	Ligandi sa višestrukim ciljnim mjestom dejstva
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida
MYPT1	Subjedinica miozin fosfataze 1
NCI	Nacionalni institut za karcinom
NF- κ B	Nuklearni faktor kapa B
NMR	Nuklearna magnetna rezonanca
PAK	P21 aktivirane kinaze
PD-1	Protein programirane smrti 1
PDAC	Duktalni adenokarcinom pankreasa
PDB	Proteinska banka podataka
PD-L1	Ligand programirane smrti 1
PI	Propidijum-jodida
PI3K	Fosfatidilinozitol-3-kinaza
PRESS	Suma kvadrata predviđenih reziduala
QSAR	Studije kvantitativnog odnosa između strukture i aktivnosti
RF	Algoritam slučajnih šuma
RMSEP	Greška predviđanja test seta
RMSD	Koren srednjeg kvadratnog odstupanja atomskih pozicija
RMSEE	Greška predviđanja trening seta
ROCK	Rho-vezana kinaza
SBDD	Dizajn zasnovan na strukturi ciljnog mjesta djelovanja
SBVS	Virtuelni skrining zasnovan na strukturi ciljnog mjesta djelovanja
TFA	Trifluorosirćetna kiselina
TLC	Tankoslojna hromatografija
TNBC	Trostruko-negativni karcinom dojke
TPP1	Protein koji podstiče polimerizaciju tubulina
VEGF	Vaskularni endotelni faktor rasta
VS	Virtuelni skrining
ZBG	Cink-vezujuća grupa

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Tumor – (NE)pobjediv zdravstveni izazov savremenog društva	2
1.1.1. Kratak historijski osvrt na različite teorije objašnjavanja tumorogeneze	2
1.1.2. Savremeni izazovi i napredak u terapiji tumora: od osnovnih pristupa do inovativnih strategija sa višestrukim ciljnim mjestom dejstva	4
1.1.3. Pristupi u razvoju MTDLs	7
1.2. Acetilacija histona: Centralna uloga u posttranslacionim histonskim modifikacijama	9
1.3. Histon deacetilaze – regulatori epigenetske mašinerije.....	9
1.3.1. Supstrati i funkcije histon deacetilaza u biološkim procesima	11
1.3.2. Histon deacetilaze: Ključni saveznici ili sporedni igrači u borbi protiv tumora?	12
1.3.3. HDAC Inhibitori: dizajn farmakofore i pregled registrovanih lijekova	13
1.4. HDAC6: Perspektivan target za razvoj selektivnih HDAC inhibitora	15
1.4.1. Jedinstvena strukturna specifičnost HDAC6 izoforme	15
1.4.2. Biološka specifičnost HDAC6 i njena povezanost sa tumorom	16
1.4.3. Selektivni HDAC6 inhibitori: farmakofora, predstavnici i izazovi koji su podstakli inovativna rješenja	20
1.4.4. Dualni HDAC6 inhibitori: strukturna raznolikost i terapijski potencijal.....	22
1.5. Validacija nove <i>multi-target</i> HDAC strategije	28
1.6. ROCK kinaze.....	29
1.6.1. Struktura, regulacija aktivnosti i biološka funkcija ROCK kinaza	29
1.6.2. Uloga ROCK u patogenezi i progresiji tumora.....	33
1.6.3. ROCK inhibitori – okosnica za terapiju tumora	36
1.7. Potencijalni mehanizmi sinergističkih efekata kombinacije HDAC i ROCK inhibitora	37
1.8. Tehnike racionalnog dizajna u otkriću lijekova (<i>Computer-Aided Drug Design, CADD</i>)	39
1.8.1. Dizajn zasnovan na strukturi ciljnog mjesta (<i>Structure-based Drug Design, SBDD</i>)....	44
1.8.2. Dizajn zasnovan na strukturi liganda (<i>Ligand-Based Drug Design, LBDD</i>)	50
1.8.3. Razvoj novih lijekova: od visokopropusnog do virtuelnog skrininga	59
1.9. HDAC i ROCK enzimski testovi kao ključni korak u validaciji dualnih inhibitora	62
1.10. Biološki modeli za evaluaciju aktivnosti HDAC/ROCK <i>multitarget</i> inhibitora.....	64

1.10.1.	Ispitivanje citotoksičnosti antineoplastika putem MTT testa	65
1.10.2.	Testovi za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na apoptozu ćelija	65
1.10.3.	Test za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na ćelijski ciklus tumorskih ćelija	68
1.10.4.	Testovi za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na ćelijsku migraciju i invaziju	69
2.	CILJEVI RADA.....	71
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	75
3.1.	Studije 2D-QSAR, 3D-QSAR analize, molekuskog dokinga i LBVS u dizajnu novih ROCK inhibitora i multitarget HDAC/ROCK inhibitora	77
3.1.1.	Priprema molekula za 2D-QSAR, 3D-QSAR i molekulski doking.....	77
3.1.2.	Studije molekuskog dokinga.....	78
3.1.3.	2D-QSAR studije ROCK2 i HDAC6 inhibitora	80
3.1.4.	3D-QSAR studije	82
3.1.5.	Virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda (<i>Ligand-based virtual screening</i> , LBVS)	84
3.2.	Sintetske procedure.....	85
3.2.1.	Hemikalije i oprema.....	85
3.2.2.	Sinteza benzil-bromid derivata – Opšta procedura A	85
3.2.3.	Sinteza derivata sekundarnih amina – Opšta procedura B	86
3.2.4.	Sinteza bromo-hidroksamskih derivata – Opšta procedura C	86
3.2.5.	Sinteza novih ROCK inhibitora – Opšta procedura D	86
3.2.6.	Sinteza <i>multitarget</i> HDAC/ROCK inhibitora – Opšta procedura E	87
3.3.	Biološka evaluacija novosintetisanih jedinjenja.....	87
3.3.1.	<i>In vitro</i> evaluacija korišćenjem enzimskih testova	87
3.3.2.	<i>In vitro</i> evaluacija primjenom ćelijskih kultura	89
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	95
4.1.	Identifikacija farmakofore i dizajn novih ROCK inhibitora.....	96
4.1.1.	Rezultati 3D-QSAR studije za ROCK1 i ROCK2 inhibitore	96
4.1.2.	Rezultati studije molekuskog dokinga	101
4.1.3.	Dizajn novih potencijalnih ROCK inhibitora	107
4.2.	Sinteza i karakterizacija dizajniranih ROCK inhibitora.....	111
4.3.	Rezultati <i>in vitro</i> enzimске evaluacije potencijalnih ROCK inhibitora.....	115
4.4.	Rezultati <i>in vitro</i> ćelijske evaluacije najaktivnijih ROCK inhibitora	116
4.4.1.	Ispitivanje citotoksičnih efekata novodizajniranih i sintetisanih ROCK inhibitora	116

4.4.2.	Ispitivanje uticaja C-19 na apoptozu.....	117
4.4.3.	Ispitivanja uticaja C-19 na ćelijski ciklus MiaPaCa-2 i Panc-1 tumorskih ćelija.....	119
4.4.5.	Ispitivanje uticaja C – 19 na produkciju reaktivnih oblika kiseonika.....	121
4.4.6.	Analiza efikasnosti C-19 u 3D tumorskim modelima.....	122
4.4.7.	Ispitivanje uticaja C-19 na ćelijsku migraciju i invaziju u <i>in vitro</i> uslovima	123
4.5.	Farmakofora i dizajn prvih <i>multitarget</i> HDAC/ROCK inhibitora	125
4.6.	Rezultati molekulske doking studije za dualne HDAC/ROCK inhibitore	127
4.7.	Sinteza i karakterizacija dualnih HDAC/ROCK inhibitora.....	131
4.8.	Rezultati <i>in vitro</i> enzimske evaluacije HDAC/ROCK dualnih inhibitora	134
4.9.	Rezultati <i>in vitro</i> ćelijske evaluacije dualnih HDAC/ROCK inhibitora	136
4.9.1.	Evaluacija citotoksičnosti dualnih HDAC/ROCK inhibitora	136
4.9.2.	Ispitivanje uticaja C-9 na translokaciju fosfatidilserina na ćelijskoj membrani u MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 ćelijama.....	137
4.9.5.	Ispitivanje uticaja C-9 na promjene ćelijskog ciklusa kod MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 tumorskih ćelija	143
4.9.6.	Ispitivanje efikasnosti C-9 pomoću 3D tumorskih modela.....	144
4.9.7.	Ispitivanje uticaja C-9 na migraciju i invaziju tumorskih ćelija u <i>in vitro</i> uslovima....	147
4.10.	Dizajn i virtuelni skrining novih HDAC/ROCK inhibitora zasnovan na korišćenju strukture prethodno identifikovanog <i>lead</i> molekula C-9.....	149
4.10.1.	Molekulski doking i MM-GBSA računanja slobodne energije vezivanja novodizajniranih <i>multitarget</i> HDAC/ROCK inhibitora.....	151
4.11.	Sinteza i karakterizacija novodizajniranih HDAC/ROCK inhibitora.....	153
4.12.	Rezultati <i>in vitro</i> enzimske evaluacije novodizajniranih HDAC/ROCK inhibitora	158
4.13.	Rezultati <i>in vitro</i> ćelijske evaluacije novodizajniranih HDAC/ROCK inhibitora	160
4.13.1.	Ispitivanje citotoksičnosti novodizajniranih jedinjenja.....	160
4.13.2.	Novosintetisani HDAC/ROCK <i>multitarget</i> inhibitori dovode do promjena u ćelijskom ciklusu TNBC ćelijskih linija	161
4.13.3.	Novosintetisani HDAC/ROCK inhibitori indukuju apoptozu TNBC ćelijskih linija...	162
4.14.	2D-QSAR modeli zasnovani na mašinskom učenju – efikasna platforma za budući razvoj <i>multitarget</i> inhibitora.....	166
4.14.1.	2D-QSAR (ROCK2) model – parametri interne i eksterne validacije i domen primjenljivosti.....	166
4.14.2.	2D-QSAR (HDAC6) model – parametri interne i eksterne validacije i domen primjenljivosti.....	168
4.14.3.	Eksterna slijepa validacija 2D-QSAR modela	169
4.14.4.	Dizajn novih HDAC/ROCK multitarget inhibitora baziran na formiranim ML-QSAR modelima	171

5. ZAKLJUČAK.....	181
6. Literatura.....	187
7. Prilozi.....	213
P1. 3D-QSAR studija i molekulska doking studija ROCK1 i ROCK2 inhibitora	214
P2. Studije molekuskog dokinga i slobodne energije vezivanja izračunate MM-GBSA metodom	219
Table P2.1. Strukture, doking vrijednosti, <i>glide</i> vrijednosti, vrijednosti <i>glide</i> energije i <i>glide</i> efikasnosti liganda novodizajniranih HDAC/ROCK <i>multitarget</i> inhibitora.....	219
P3. 2D-QSAR studije zasnovane na algoritmima mašinskog učenja.....	222
P4. ¹H i ¹³C spektri potencijalnih ROCK inhibitora	229
P3. ¹H, ¹³C i maseni spektri najaktivnijih <i>multitarget</i> HDAC/ROCK inhibitora u ćelijskim ispitivanjima.....	231

1. UVOD

1.1. Tumor – (NE)pobjediv zdravstveni izazov savremenog društva

Tumor predstavlja bolest koju karakteriše nekontrolisana proliferacija određenih ćelija organizma, uz mogućnost njihovog širenja u druge djelove tijela. Ova definicija, prema posljednjem ažuriranju Nacionalnog instituta za karcinom (*National Cancer Institute*, NCI) odražava savremena saznanja o etiopatogenezi malignih oboljenja [1].

Definicija tumora se mijenjala kroz istoriju u skladu sa razvojem medicinskih nauka i boljim razumijevanjem bioloških mehanizama tumorogeneze. Još 1828. godine, tumor je opisan kao „okruglast, tvrd, neravan, scirozni tumor žlijezda koji često ulceriše, izuzetno je bolan i uglavnom smrtonosan” [2]. Do 1898. godine, akumulacija novih saznanja je omogućila precizniju definiciju tumora kao „novonastalog tkiva koje se spontano razvija, ima atipičnu građu, ne obavlja nikakvu fiziološku funkciju u organizmu i raste neograničeno, bez definisanog završetka“ [3]. Dalje proširenje razumijevanja malignih oboljenja je rezultiralo definicijom iz 1919. godine, objavljenom u Oksfordskom rečniku, prema kojoj je maligni tumor opisan kao „neoplazma koja razara tkivo u kojem nastaje, širi se neograničeno i ima tendenciju recidiva nakon uklanjanja“. S obzirom na kompleksnost ove bolesti i kontinuirani napredak u njenom proučavanju, univerzalna i sveobuhvatna definicija karcinoma ne postoji. Međutim, savremene medicinske i onkološke zajednice u najvećoj mjeri prihvataju definiciju Nacionalnog instituta za karcinom kao najrelevantniju u kontekstu trenutnih naučnih saznanja.

Tumor je jedan od vodećih uzročnika smrtnosti na globalnom nivou i zauzima drugo mjesto, odmah nakon kardiovaskularnih bolesti [4–6]. Epidemiološki podaci ukazuju na alarmantne trendove – procjenjuje se da će tokom života polovina žena i približno trećina muškaraca u Americi razviti neki oblik tumora, što ovu bolest čini jednim od najozbiljnijih zdravstvenih izazova savremenog društva [4]. Uprkos ovim zastrašujućim statistikama, poslednjih decenija je postignut značajan napredak u borbi protiv raka. Stope preživljavanja oboljelih su značajno poboljšane, prvenstveno zahvaljujući razvoju metoda rane dijagnostike nekih tumora i primjeni pravovremenih i ciljanih terapijskih pristupa [6,7]. Međutim, i dalje se nameće ključno pitanje: **Zašto, više od jednog vijeka nakon početka intenzivnih istraživanja različitih modaliteta liječenja tumora, još uvijek govorimo o "potencijalnom izliječenju", umjesto o definitivnom terapijskom rješenju?** Koji naučni i klinički izazovi i dalje ograničavaju mogućnost postizanja univerzalnog terapijskog uspjeha? Koji patogenetski mehanizmi stoje u osnovi tumorske heterogenosti i doprinose njenoj biološkoj kompleksnosti?

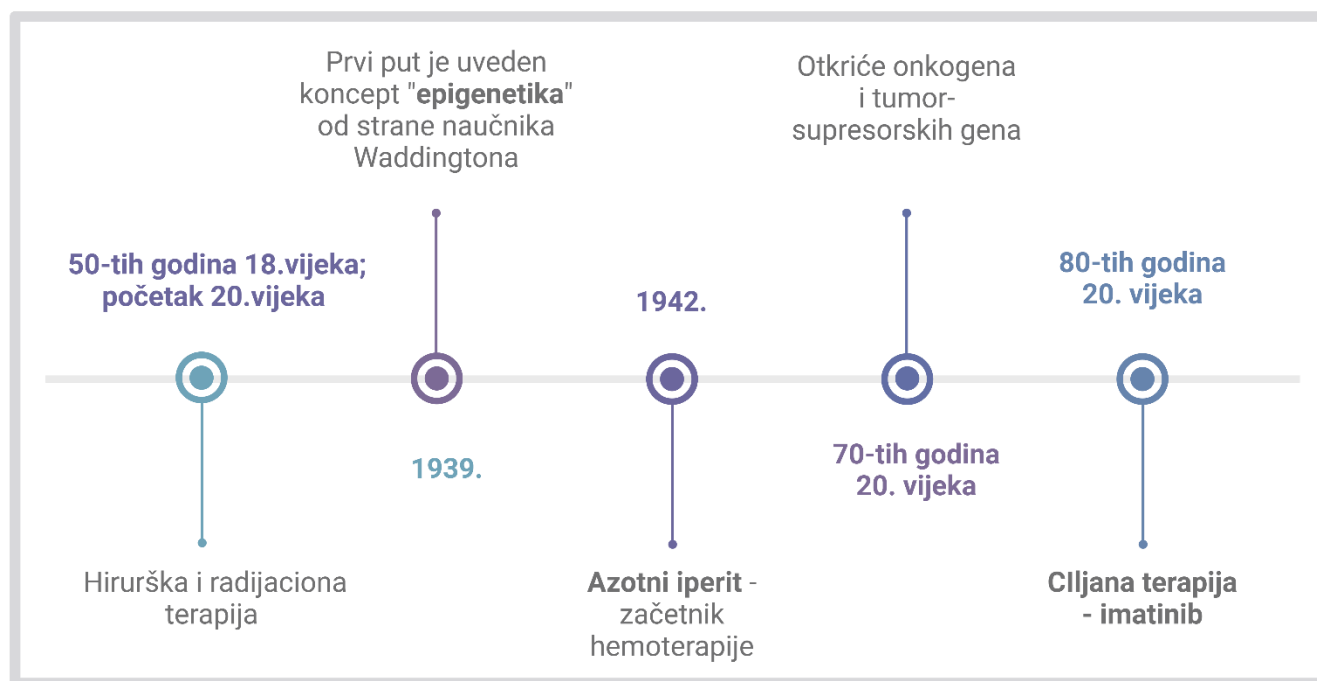
1.1.1. Kratak istorijski osvrt na različite teorije objašnjavanja tumorogeneze

Nakon što su Watson i Crick 1962. godine dobili Nobelovu nagradu za otkriće sekundarne strukture molekula DNK, uslijedila su značajna naučna dostignuća u oblasti onkologije koja su dovela do otkrića onkogenih i tumor-supresorskih gena i njihove povezanosti sa tumorogenezom (**Slika 1**). Prije ovog fundamentalnog otkrića, tumori su se objašnjavali kroz niz različitih teorija, uključujući humoralnu teoriju dominantnu u srednjem vijeku, limfnu teoriju i teoriju parazita, sve do uvida u genetičke osnove i ulogu različitih karcinogenih u tumorogenezi kao što su virusi, hemijske supstance, reaktivni oblici kiseonika, stres, itd [4]. Međutim, postavlja se bitno pitanje: **Da li su isključivo promjene na nivou DNK dovoljne za objašnjenje tumorogeneze?**

Da bismo odgovorili na ovo pitanje, neophodno je spomenuti jedno od najvažnijih otkrića u razumijevanju patogeneze tumora, kao i drugih kompleksnih bolesti - uvođenje koncepta „epigenetika“ od strane *C. H. Waddingtona* 1939. godine (**Slika 1**) [8]. Tradicionalni genetički modeli tumorogeneze,

koji nastanak tumora objašnjavaju isključivo kao posljedicu disbalansa između aktivacije onkogeni i utišavanja tumor-supresorskih gena, su predstavljali ključni naučni iskorak u svoje vrijeme. Iako je ovaj pristup djelimično zastario, on nije u potpunosti netačan, već je danas dopunjen savremenim razumijevanjem epigenetičkih mehanizama u regulaciji tumorskog razvoja [9].

Epigenetika, kako ju je prvobitno definisao *Waddington*, opisuje „uzročno-posljedične interakcije između gena i njihovih proizvoda, koje omogućavaju nastanak fenotipa“ (“*the causal interaction between genes and their products, which bring the phenotype into being*“). Epigenetika obuhvata različite molekulske mehanizme putem kojih se genotip funkcionalno izražava u odgovarajući fenotip. Na primjer, iako su sve ćelije unutar jednog organizma genetički identične, one se fenotipski diferenciraju u specifične tipove ćelija sa različitim funkcijama. Ova diferencijacija omogućava koordinisano i pravilno funkcionisanje organizma, uprkos genetičkoj uniformnosti svih ćelija [8–10]. Danas, pojmom epigenetika se opisuju nasljedne promjene u ekspresiji gena koje nisu uzrokovane promjenama u primarnoj DNK sekvenci, već su rezultat različitih mehanizama poput **metilacije DNK, modifikacije histona i regulacije gena putem malih nekodirajućih RNK molekula** [9]. Jedna od ključnih karakteristika epigenetičkih promjena je njihova reverzibilnost, što ih čini izuzetno atraktivnim targetom u terapiji tumora [11]. Sva ova saznanja ne samo da doprinose dubljem razumijevanju osnovnih bioloških procesa, već i pružaju značajan uvid u složene mehanizme tumorogeneze. Epigenetička perspektiva tumora otvara vrata razvoju inovativnih terapijskih strategija koje nisu ograničene samo na ireverzibilne genetičke promjene, već su usmjerene i ka manipulaciji reverzibilnih epigenetičkih modifikacija, čime se povećava potencijal za efikasniju terapiju malignih bolesti [11].



Slika 1. Vremenska linija ključnih otkrića u vezi sa patogeneom i terapijom tumora. *Created in <https://BioRender.com>.*

1.1.2. Savremeni izazovi i napredak u terapiji tumora: od osnovnih pristupa do inovativnih strategija sa višestrukim ciljnim mjestom dejstva

Terapija tumora je tokom proteklih decenija prošla kroz dinamičan razvoj evoluirajući od osnovnih hirurških metoda do kompleksnih multimodalnih pristupa koji danas predstavljaju zlatni standard u onkologiji. U svojim počecima liječenje maligniteta se zasnivalo gotovo isključivo na hirurškom odstranjivanju tumorskog tkiva (**Slika 1**). Ovaj pristup je dominirao sve do sredine 20. vijeka, kada su tehnološki napredak i bolje razumijevanje biologije tumora omogućili uvođenje novih terapijskih metoda. Od 60-ih godina 20. vijeka, primjena radijacione terapije je značajno unaprijedila liječenje maligniteta. Ova metoda, bazirana na primjeni jonizujućeg zračenja, je omogućila efikasniju kontrolu tumorskih ćelija, posebno kod lokalno uznapredovalih stadijuma bolesti. Kombinacija hirurgije i radijacione terapije je brzo postala standardni pristup u onkološkim protokolima, doprinoseći povećanju stope preživljavanja pacijenata i poboljšanju kvaliteta njihovog života [4,12].

Istorijski, početak primjene hemioterapije u onkologiji je bio obilježen događajima iz Drugog svjetskog rata. Razvitak hemioterapije je uslijedio kao neočekivana lekcija iz totalno nepredviđenih okolnosti. Uslijed eksplozije broda sa 100 tona iperita otkriveni su toksični efekti ove supstance na brzodijeleće ćelije, što je rezultiralo leukopenijom kod preživjelih muškaraca. Ova zapažanja su podstakla istraživanja koja su 1942. godine dovela do razvoja azotnog iperita, prvog citotoksičnog agensa koji je uspješno primijenjen u tretmanu leukemije (**Slika 1**) [13].

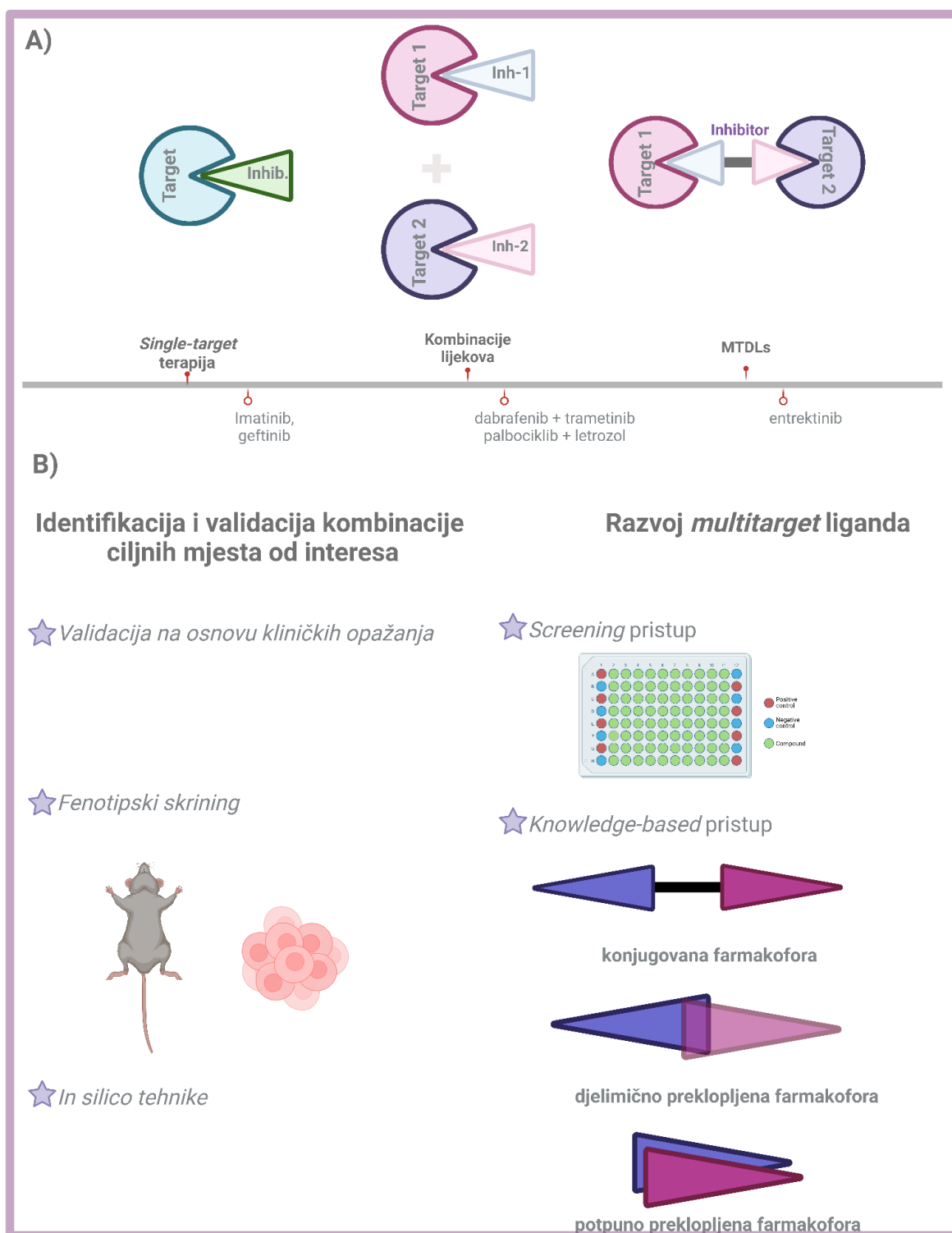
Otkriće azotnog iperita je otvorilo vrata intenzivnim istraživanjima koja su rezultirala identifikacijom i razvojem velikog broja citostatika sa različitim mehanizmima djelovanja, kao što su:

- **Alkilujućci agensi:** djeluju oštećujući DNK tumorskih ćelija dovodeći do unakrsnog povezivanja nukleotidnih lanaca, čime spriječavaju njihovu replikaciju.
- **Antimetaboliti:** Imitiranjem prirodnih metabolita, antimetaboliti inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina, što zaustavlja rast i podjelu tumorskih ćelija.
- **Mitotički agensi:** djeluju na mikrotubule, ključne komponente ćelijskog skeleta, sprečavajući mitotičku deobu ćelija.
- **Hormonska terapija:** koristi se kod hormon-zavisnih tumora, kao što su tumori dojke i prostate, a efekat se zasniva na modulaciji hormonskog okruženja tumora [5,6].

Uprkos značajnoj ulozi u terapiji tumora, osnovni nedostatak tradicionalnih antineoplastika jeste nedostatak selektivnosti prema tumorskim ćelijama. Citotoksični efekti ovih lijekova pogađaju i normalne ćelije, naročito one koje se brzo dijele, što dovodi do neželjenih efekata poput mijelosupresije, alopecije i gastrointestinalnih poremećaja. Ove nuspojave ograničavaju terapijsku primjenu i zahtjevaju pažljivo balansiranje između efikasnosti i toksičnosti [5,14].

Neadekvatan bezbjednosni profil konvencionalnih terapija zajedno sa identifikacijom brojnih signalnih puteva povezanih sa razvojem tumora je doveo do otkrića **ciljane terapije** tokom 70-ih i 80-ih godina dvadesetog vijeka (**Slika 2-A**) [15–17]. Začetnici ciljane terapije su imatinib (ispoljava dejstvo na tirozin kinaze) i gefitinib (inhibitor receptora za epidermalni faktor rasta - *epidermal growth factor receptor*; EGFR) koji su odobreni za terapiju hronične mijeloidne leukemije i nemikrocelularnog karcinoma pluća [18]. Ovaj terapijski pristup se temelji na modulaciji aktivnosti specifičnih ciljnih molekula koji imaju ključnu ulogu u rastu i progresiji tumora. Idealna terapijska ciljna molekula bi trebala da bude specifična i neophodna za ćelije karcinoma, uz njegov minimalan uticaj na razvoj i funkcionisanje normalnih tkiva. Međutim, takav ciljni molekul još uvijek nije identifikovan [17–19]. Savremena istraživanja su fokusirana na detaljno mapiranje signalnih puteva uključenih u tumorogenezu i progresiju malignih

bolesti u cilju identifikacije molekula koji će po svojim osobinama biti što je moguće približniji idealnom ciljnom mjestu dejstva [19–22].



Slika 2. A. Šematski prikaz ciljanih inhibitora, kombinacije lijekova i inhibitora sa višestrukim ciljnim mjestom dejstva; **B.** Šematski prikaz faza u otkriću inhibitora sa višestrukim ciljnim mjestom dejstva – identifikacija i validacija ciljnog molekula od interesa i razvoj inhibitora sa višestrukim ciljnim mjestom dejstva. *Created in* <https://BioRender.com>.

Obzirom da je tumor kompleksna multifaktorska bolest u čijoj osnovi leže različiti patogenetski mehanizmi, dejstvo na samo jedan ciljni molekul (uzimajući u obzir da do sada otkriveni ciljni molekuli nisu u potpunosti esencijalni za tumorske ćelije) često nije dovoljno za postizanje zadovoljavajućih terapijskih rezultata [23,24]. Iako ciljana terapija nudi značajne prednosti u poređenju sa konvencionalnom hemioterapijom, u slučajevima uznapredovale bolesti često dolazi do razvoja rezistencije na terapiju usmjerenu prema samo jednom cilju (tzv. *single-target therapy*). Dodatno, ciljana terapija je efikasna samo kod određenog broja pacijenata – npr. manje od 20 % pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća je osjetljivo na gefitinib [25]. Stoga, sljedeći značajan iskorak u terapiji tumora je uključivao uvođenje **kombinovanih režima ciljane terapije (Slika 2-A)**. Primjena kombinovanih terapija obuhvata dvije glavne prednosti u odnosu na monoterapiju:

1. **Prevenција i odlaganje razvoja rezistencije:** Kada se istovremeno djeluje na više signalnih puteva smanjuje se vjerovatnoća da će ćelije razviti mutacije ili adaptacije koje bi im omogućile preživljavanje u prisustvu terapije [24,26].
2. **Aditivni i sinergistički efekti:** Lijekovi koji djeluju na različita ciljna mjesta mogu imati komplementarne učinke čime se povećava ukupna efikasnost terapije. Sinergistički efekti ne samo da povećavaju citotoksičnost prema tumoru, već i omogućavaju upotrebu nižih doza lijekova čime se smanjuje rizik od neželjenih efekata na zdravo tkivo. Na primjer, kombinacija dabrafeniba (inhibitor B-Raf serin-treonin kinaze (BRAF)) sa trametinibom (inhibitor mitogenom aktivirane kinaze regulisane ekstracelularnim signalom (MEK)) je pokazala značajnu efikasnost i doprinijela povećanju stope preživljavanja pacijenata sa metastatskim melanomom sa BRAF mutacijama dok se kombinacija palbocikliba (inhibitor ciklin-zavisnih kinaza 4 i 6, CDK4 i CDK6) sa letrozolom (inhibitor aromataze) pokazala efikasnom u liječenju uznapredovalog karcinoma dojke [24,27].

Izazovi u implementaciji kombinovane terapije uključuju identifikaciju optimalnih kombinacija lijekova, određivanje doza koje će postići maksimalnu efikasnost uz minimalnu toksičnost, kao i razumijevanje kompleksnih farmakodinamskih i farmakokinetičkih profila lijekova korišćenih u kombinaciji [19].

Ovi izazovi su usmjerili dalja naučna istraživanja ka razvoju savremenog pristupa baziranog na primjeni **liganada sa višestrukim ciljnim mjestima dejstva** (*Multi-Target-Directed Ligands*, MTDL) (Slika 2-A). MTDLs predstavljaju jedinjenja sposobna da simultano djeluju na dva ili više različitih molekulskih ciljeva [28]. Ovakav pristup nudi značajne prednosti u poređenju sa tradicionalnim kombinacijama lijekova uključujući smanjenu vjerovatnoću interakcija između lijekova, poboljšanu adherencu pacijenata i jednostavniji farmakokinetički i farmakodinamski profil [26,27]. Jedan od ključnih primjera uspjeha ove strategije je odobrenje MTDL inhibitora, **entrektiniba** (inhibitor širokog spektra koji djeluje na tropomiozinske receptorske kinaze (*TRK*), anaplastičnu limfomsku kinazu (*ALK*) i receptorske tirozin kinaze (*ROS1*)) od strane Američke agencije za hranu i lijekove (*U.S. Food and Drug Administration*, FDA) za terapiju maligniteta [29].

1.1.3. pristupi u razvoju MTDLs

Razvoj novih liganada sa višestrukim ciljnim mjestima dejstva podrazumijeva dva ključna koraka:

1. **Identifikaciju i validaciju kombinacije ciljnih molekula od interesa (Slika 2-B)**
2. **Razvoj i dizajn liganada sa višestrukim ciljnim mjestima dejstva (Slika 2-B).**

Više pristupa se koristi u cilju **identifikacije i validacije kombinacija ciljnih mjesta dejstva** u razvoju MTDLs. Ove strategije igraju ključnu ulogu u osiguravanju da odabrani ciljni molekuli budu relevantni za mehanizam bolesti i da njihova simultana modulacija rezultira željenim terapijskim ishodom. Najčešće korišćeni pristupi uključuju **validaciju na osnovu kliničkih opažanja, fenotipski skrining i *in silico* metode (Slika 2).**

1. **Validacija na osnovu kliničkih opažanja:** Klinički podaci predstavljaju neprocjenjiv resurs za identifikaciju potencijalnih kombinacija ciljnih mjesta dejstva. Na primjer, epidemiološke studije i klinička ispitivanja često otkrivaju obrasce u progresiji bolesti ili odgovoru na terapiju koji ukazuju na uključenost više ciljnih mjesta dejstva. Analiza populacija pacijenata koji pokazuju različite odgovore na terapije usmjerene ka jednom cilju može otkriti dodatne puteve koji doprinose patologiji bolesti. Na primjer, istovremeno ciljanje vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i PD-1/PD-L1 puteva (protein programirane smrti 1, *programmed cell death protein 1*/ligand programirane smrti 1, *programmed death-ligand 1*) u onkologiji je proizašlo iz kliničkih opažanja koja ukazuju na međuzavisne procese angiogeneze tumora i imunske evazije tokom progresije tumora [27,30].
2. **Fenotipski skrining:** Uključuje testiranje lijekova u biološkim sistemima kao što su ćelijske kulture ili životinjski modeli, kako bi se identifikovale one kombinacije koje proizvode željeni efekat. Ovaj pristup zahtjeva korišćenje velikih količina bioloških materijala/biohemijjskih testova i životinjskih modela što ga čini ekonomski i etički najmanje prihvatljivim modelom za validaciju kombinacija ciljnih mjesta dejstva [31].
3. ***In silico* metode:** Ove metode koriste bioinformatičke alate, simulacije molekuskog dokinga i pristupe sistemske biologije za modelovanje interakcija između potencijalnih liganada i njihovih ciljnih mjesta dejstva. Dodatno, algoritmi mašinskog učenja mogu analizirati velike skupove podataka predviđajući sinergističke, aditivne ili antagonističke efekte ciljanja više signalnih puteva [27,32]. *In silico* validacija ne samo da ubrzava proces otkrivanja lijekova, već i smanjuje troškove povezane sa eksperimentalnom validacijom. Na primjer, kombinacija ciljnih molekula receptora insulinu sličnog faktora rasta 1 (IGF1R) i CDK4 je identifikovana putem naprednih tehnika računarskog modelovanja i eksperimentalno potvrđena kao sinergistička kombinacija ciljnih mjesta djelovanja. Ona se pokazala efikasnom u modulaciji ključnih signalnih puteva u ćelijama dediferenciranog liposarkoma (DDL), što potvrđuje njen potencijal za razvoj inovativnih pristupa u liječenju ovog maligniteta [33].

U razvoju i dizajnu liganada sa višestrukim ciljnim mjestom dejstva se koriste dva osnovna pristupa:

1. **Skrining kao pristup otkrivanja MTDLs (*screening approach*):** U slučaju MTDLs najčešće se primjenjuje fokusirani skrining u okviru koga se ligand, za koga je već poznato da ima aktivnost na jednom ciljnom molekulu, testira na drugom ciljnom molekulu od značaja. Na ovaj način se ubrzava proces otkrića MTDL i smanjuju troškovi. S druge strane, visokoprotlačni skrining

podrazumijeva testiranje velikog broja potencijalnih molekula na različita biološka ciljna mjesta dejstva koristeći biohemijske ili ćelijske testove. U slučaju MTDL, skrining mora biti dizajniran tako da obuhvati potencijalne interakcije molekula sa više ciljnih mjesta dejstva, što povećava kompleksnost i troškove istraživanja [27,34].

2. **Pristup zasnovan na znanju (*knowledge-based approach*):** Temelji se na integraciji farmakofora, osnovnih strukturnih elemenata odgovornih za biološku aktivnost lijekova, iz različitih farmaceutskih agenasa u jedinstvenu molekulsku strukturu. Ovaj pristup omogućava stvaranje **nove farmakofore** koja simultano interaguje sa aktivnim mjestima dva ili više ciljnih molekula (**Slika 2**) [27,34,35]. U zavisnosti od načina međusobnog povezivanja pojedinačnih farmakofora, nastala farmakofora se može klasifikovati u tri osnovna tipa:
 - a) **Konjugovana farmakofora (*conjugated pharmacophore*):** Ovaj tip nastaje povezivanjem dvije ili više farmakofora putem linkera – strukturnog segmenta koji nije prisutan u originalnim farmakoforama (**Slika 2-B**). Linker omogućava fleksibilnost i optimalno pozicioniranje farmakofore u interakciji sa njenim ciljnim biomolekulima [35].
 - b) **Djelimično preklopljena farmakofora (*fused pharmacophore*):** Kod ovog tipa, farmakofore su djelimično preklopljene dijeleći zajedničke strukturne elemente, ali zadržavajući većinu svojih individualnih karakteristika (**Slika 2-B**). Ovakve farmakofore često imaju optimizovanu farmakodinamičku i farmakokinetičku aktivnost, jer se smanjuje kompleksnost strukture, dok se zadržava sposobnost interakcije sa različitim ciljnim biomolekulima [35].
 - c) **Potpuno preklopljena farmakofora (*merged pharmacophore*):** U ovom slučaju su farmakofore maksimalno integrisane stvarajući novu strukturnu cjelinu koja kombinuje funkcionalne karakteristike originalnih farmakofora (**Slika 2-B**). Ovaj tip se često koristi kada ciljna mjesta dijele slične strukturne karakteristike aktivnih mjesta. Potpuno preklopljena farmakofora omogućava poboljšanu biološku raspoloživost i doprinosi pojednostavljivanju sintetskih postupaka [35].

Savremeni terapijski pristupi liječenja tumora se sve više oslanjaju na prethodno objašnjene strategije sa višestrukim ciljnim mjestima dejstva. Istovremeno najnovija istraživanja ističu epigenetičke promjene kao ključne faktore u regulaciji transkripcije gena i progresiji tumora. U ovom kontekstu ova dva koncepta predstavljaju pravac koji može rezultirati razvojem novih terapijskih strategija za tretman tumora sa potencijalom za značajna otkrića u oblasti onkologije.

1.2. Acetilacija histona: Centralna uloga u posttranslacionim histonskim modifikacijama

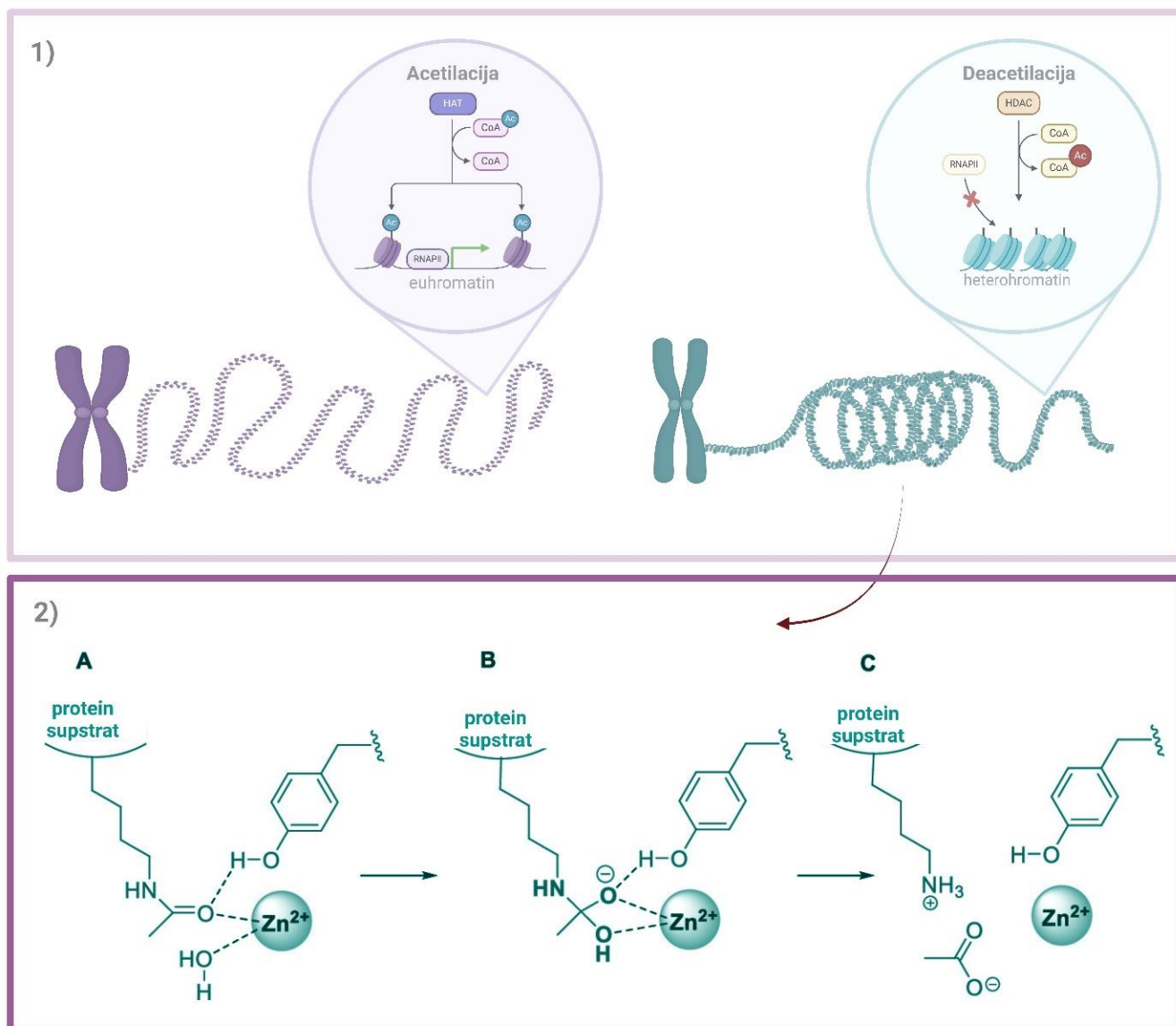
Jedan od najvažnijih epigenetičkih mehanizama jesu posttranslacione histonske modifikacije koje zajedno sa metilacijom DNK imaju ključnu ulogu u regulaciji genske ekspresije. **Međutim, da bismo objasnili posttranslacione histonske modifikacije kao jedan od bitnih segmenata epigenetičke mašinerije vrat ćemo se unazad i odgovoriti na pitanje – šta su to histoni i koja je njihova veza sa DNK?**

DNK molekuli unutar jedra ćelije su organizovani u strukture poznate kao nukleozomi, osnovne jedinice hromatina. Nukleozomi se sastoje od DNK lanca obmotanog oko histonskog oktamera koji se formira od po dva molekula histonskih proteina H2A, H2B, H3 i H4. Više nukleozoma je međusobno povezano proteinom histona H1 koji ima ulogu stabilizacije strukture i formiranja tzv. "linker DNK" segmenata između nukleozoma. Ovakav način strukturne kompozicije dovodi do stvaranja hromatinskog vlakna koje se dalje može organizovati u više nivoa strukturalne kompleksnosti omogućavajući regulaciju ekspresije gena i drugih ključnih bioloških procesa [36].

N- i C-terminalni krajevi histonskih proteina, koji čine osnovu hromatina, su podložni različitim posttranslacionim modifikacijama uključujući metilaciju lizina i arginina, acetilaciju lizina, fosforilaciju serina, ubikvitinaciju i sukcinilaciju lizina [37,38]. Među ovim modifikacijama **acetilacija lizinskih ostataka histona** ima posebno značajnu ulogu. Iako opisana prvi put prije više od 60 godina (1964. godine), acetilacija lizinskih ostataka histona je i dalje predmet velikog broja istraživanja, posebno u oblastima onkologije i neurodegenerativnih bolesti.

1.3. Histon deacetilaze – regulatori epigenetske mašinerije

Proces acetilacije histona katalizuju enzimi poznati kao **histon acetil-transferaze** (*histone acetyltransferases*, HATs) vršeći prenošenje acetil grupe sa acetil-CoA na ϵ -amino grupu lizina, dok histon deacetilaze (*histone deacetylases*, **HDACs**) katalizuju reverznu reakciju – deacetilaciju (**Slika 3**) [39,40]. Acetilacijom lizinskih ostataka histonskih proteina dolazi do smanjenja pozitivnog naelektrisanja histona što slabi elektrostatičke interakcije između histona i DNK, koja je negativno naelektrisana. Kao rezultat, hromatin prelazi u euhromatinsku konformaciju u okviru koje je DNK u takozvanom "otpakovanom" stanju, čime postaje dostupna transkripcionim faktorima što rezultira povećanom ekspresijom gena (**Slika 3-1**). Nasuprot tome, deacetilacija lizinskih ostataka pojačava elektrostatičke interakcije između histonskih proteina i DNK čime se formira kompaktan hromatin – tzv. heterohromatin (**Slika 3**). Ovakvo stanje smanjuje dostupnost DNK za transkripciju, što dovodi do supresije gena [41]. Održavanje dinamičke ravnoteže između aktivnosti HATs i HDACs je od suštinske važnosti za normalnu funkciju ćelija i njihovu homeostazu. Neravnoteža u ovom procesu je često povezana sa patološkim stanjima uključujući različite vrste tumora, čime se dodatno naglašava značaj ovih enzima kao potencijalnih terapijskih ciljnih mjesta u onkologiji.



Slika 3. 1) Šematski prikaz acetilacije i deacetilacije histonskih proteina koje vode ka nastajanju euhromatinske ili heterohromatinske konformacije; 2) Detaljan šematski prikaz faza u deacetilovanju lizinskih ostataka u prisustvu histon deacetilaza (prilagođeno prema referenci [42]). *Created in <https://BioRender.com>*

HDAC su dobile nazive prema redoslijedu njihovog otkrića, a istraživanja o njihovoj važnosti su započeta 1996. godine, kada je identifikovan prvi član ove enzimske porodice – HDAC1 [43]. Do danas je otkriveno 18 humanih izoformi histon deacetilaza koje se tradicionalno klasifikuju u četiri osnovne klase na osnovu njihove sličnosti sa gljivičnim analogima [36]. Klasi I pripadaju HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC8. Klasa IIa obuhvata HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9, dok klasa IIb uključuje HDAC6 i HDAC10. Klasi IV pripada jedini predstavnik, HDAC11. Tri prethodno navedene klase (I, II i IV) uključuju **cink-zavisne metaloenzime**, dok treća klasa obuhvata **NAD⁺-zavisne metaloenzime**, poznate pod nazivom sirtuini [44].

1.3.1. Supstrati i funkcije histon deacetilaza u biološkim procesima

U čemu se ogleda značaj HDAC i koja je uloga svake od 18 izoformi?

Iako su inicijalno nazvani histon deacetilazama, ovi enzimi igraju ključnu ulogu ne samo u održavanju balansa acetilacije histonskih, već i nehistonskih proteina što dodatno doprinosi njihovoj ulozi u brojnim biološkim procesima i patogenezi kompleksnih bolesti poput malignih oboljenja.

HDAC1, HDAC2 i HDAC3 (klasa I) su lokalizovane u jedru i dominantno su regulatori acetilacije histonskih proteina. HDAC1 i HDAC2 dijele visoku sekvencijsku sličnost od 80% i uglavnom su dio različitih homo- i heterodimernih represorskih kompleksa kao što su *nucleosome remodeling and deacetylase* (NuRD), *switch independent 3* (SIN3), *mitotic deacetylase* (MiDAC) i *corepressor of REST* (CoREST) [42,43,45]. Nasuprot tome HDAC3, iako dominantno nuklearno lokalizovana i pripada klasi I, dijeli 50% sekvencijske sličnosti sa HDAC1 i HDAC2 i primarno je dio *nuclear receptor corepressor* (SMRT/NCoR) kompleksa. Osim što regulišu histonske proteine, HDAC1 i HDAC2 imaju ulogu u održavanju balansa acetilacije nehistonskih nuklearnih proteina uključujući p53, E2F, ATM kinazu i CAF1 koji su značajni za regulaciju transkripcije. S druge strane, HDAC3 utiče na aktivnost nehistonskih proteina kao što su STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) i FOXP3, čime doprinosi različitim signalnim putevima i procesima u ćeliji.

HDAC8, iako svrstana u prvu klasu histon deacetilaza, pokazuje fundamentalne razlike u odnosu na ostale članove ove grupe. Za razliku od HDAC1, HDAC2 i HDAC3 koje funkcionišu kao dio multiproteinskih represorskih kompleksa, HDAC8 djeluje samostalno. Jedno od ključnih otkrića vezanih za HDAC8 je njena sposobnost katalize hidrolize dugačkih lanaca acil-lizina što je u značajnoj mjeri promijenilo percepciju o njenoj funkciji. Ovo otkriće implicira da bi primarna uloga HDAC8 mogla biti deacilacija, a ne deacetilacija, što bi moglo objasniti zašto nije identifikovan veći broj njenih supstrata u ranijim istraživanjima [42,46].

Sve veći broj naučnih istraživanja ukazuje na to da enzimi klase IIa histon deacetilaza (**HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9**) ne posjeduju intrinzičnu, katalitički nezavisnu deacetilaznu aktivnost. Umjesto toga, njihova sposobnost deacetilacije je uslovljena formiranjem kompleksa sa HDAC3 koja djeluje kao funkcionalni katalitički partner. Međutim, neki naučnici smatraju da su dalja i dodatna istraživanja neophodna kako bi se precizno definisali supstrati ove podklase i mehanizmi djelovanja, što bi moglo imati značajne implikacije u razvoju novih terapijskih strategija usmjerenih ka HDAC klasi IIa [42,43].

HDAC6 (klasa IIb) predstavlja strukturno i funkcionalno jedinstvenu izoformu histon deacetilaza koja se ističe svojom dominantno citoplazmatskom lokalizacijom. Za razliku od drugih HDAC izoformi koje pretežno djeluju na histonske proteine, HDAC6 primarno reguliše balans acetilacije citoplazmatskih nehistonskih proteina uključujući α -tubulin, kortaktin, HSP90 (*heat shock protein 90*), Ku-70 i survivin [47–52]. Zahvaljujući tome, HDAC6 ima ključnu ulogu u brojnim fiziološkim i patofiziološkim procesima. Jedan od glavnih doprinosa HDAC6 je regulacija funkcije citoskeleta putem deacetilacije α -tubulina i kortaktina čime utiče na ćelijsku pokretljivost, migraciju i invaziju. Takođe, HDAC6 je ključna za proces degradacije proteina u agregomima. HDAC6 učestvuje u regulaciji apoptoze kroz interakcije sa Ku-70 i survivinom. Dodatno je bitna uloga HDAC6 u formiranju novih krvnih sudova (angiogenezi) [42]. **Utičući na prethodno navedene procese, poremećaji u ekspresiji HDAC6 mogu značajno doprinijeti nastanku i progresiji tumora, što će detaljnije biti objašnjeno u narednim poglavljima.**

HDAC10, kao član klase IIb, ima specifične uloge u procesima autofagije, reparacije DNK i modulacije imunskog odgovora. Jedan od ključnih aspekata različitosti HDAC10 izoforme jeste njena sposobnost

katalize hidrolize acetil-poliamina, što je osobina koja je tek nedavno otkrivena i intenzivno istražena. Ovaj mehanizam ukazuje na to da funkcionalni efekti HDAC10 ne zavise primarno od deacetilacije lizinskih ostataka, već od njenog učešća u metabolizmu poliamina [53,54].

HDAC11, slično kao HDAC8, pokazuje nizak afinitet prema hidrolizi acetil-lizinskih supstrata i dominantno učestvuje u hidrolizi acil-lizinskih jedinjenja [55]. Njena ključna funkcija se ogleda u modulaciji imunskog odgovora gdje djeluje kao transkripcioni regulator. HDAC11 utiče na ekspresiju gena značajnih za imunske procese, uključujući regulaciju inflamatornih citokina i signalnih puteva neophodnih za aktivaciju i diferencijaciju imunskih ćelija što implicira značaj ove izoforme u različitim stanjima praćenim prekomjernim imunskim odgovorom [56].

1.3.2. Histon deacetilaze: Ključni saveznici ili sporedni igrači u borbi protiv tumora?

Prvi dokazi o povezanosti ekspresije HDAC sa razvojem i progresijom tumora su proizašli iz studije *Manel Estellera* i saradnika, koja je pokazala da u ćelijama karcinoma dolazi do smanjenja acetilacije lizina 16 histona H4 [57]. Takođe, identifikovana je i smanjena acetilacija lizina 18 histona H3 kao negativan prognostički faktor preživljavanja kod pacijenata sa karcinomima pankreasa, dojke, prostate i pluća [58].

Prekomjerna HDAC ekspresija i njihova uloga u patogenezi različitih tipova tumora je potvrđena brojnim genetičkim *knockdown* studijama. Tačni mehanizmi kojima HDAC doprinose tumorogenezi i progresiji tumora variraju od tipa tumora. Generalno, HDAC iz klase I regulišući acetilaciju histonskih proteina modulišu ekspresiju ključnih onkogenih i/ili tumor-supresorskih gena favorizujući tumorogenezu. Na primjer, dokazano je da povećana ekspresija HDAC1 i HDAC2 smanjuje aktivaciju tumor-supresorskog gena *CDKN1A* koji kodira sintezu inhibitora ciklin-zavisnih kinaza p21^{waf1/cip1} utičući tako na regulaciju ćelijske proliferacije [59]. Slično, smanjena ekspresija gena ključnih za reparaciju DNK, kao što su *BRCA1* (*breast cancer 1, early onset*) i *ATR* (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*), je povezana sa povećanom HDAC aktivnošću [60].

Pored histonskih proteina, HDAC utiču i na regulaciju aktivnosti nehistonskih proteina, uključujući transkripcione faktore. Na primjer, direktna deacetilacija tumor-supresorskog proteina p53 dovodi do smanjenja njegove aktivnosti, što uzrokuje smanjenu ekspresiju tumor-supresorskih gena [61]. Nasuprot tome, povećana deacetilacija transkripcionih faktora poput SP1 i C/EBP α rezultira njihovom aktivacijom i povećanom ekspresijom onkogenih, kao što je BCL-2 [62]. Dodatno, prekomjerna acetilacija citoplazmatskih nehistonskih proteina, poput α -tubulina i kortaktina, može značajno povećati motilitet tumorskih ćelija što finalno favorizuje progresiju tumora i metastaziranje [48].

Nasuprot brojnim dokazima koji ukazuju na povezanost prekomjerne HDAC ekspresije i tumorogeneze, interesantno je napomenuti da određene studije sugerišu kako genetska inaktivacija HDAC može doprinijeti nastanku i progresiji određenih tipova tumora. Na primjer, somatske mutacije gena za HDAC1 su detektovane u približno 8% slučajeva dediferenciranog liposarkoma. Slično tome, delecija gena za HDAC4 je primjećena kod 4% pacijenata sa melanomom, kao i kod nekih pacijenata sa gastrointestinalnim karcinomima. Dodatno, mutacije gena za HDAC2 su identifikovane u određenim oblicima humanih epitelnih karcinoma [58,60].

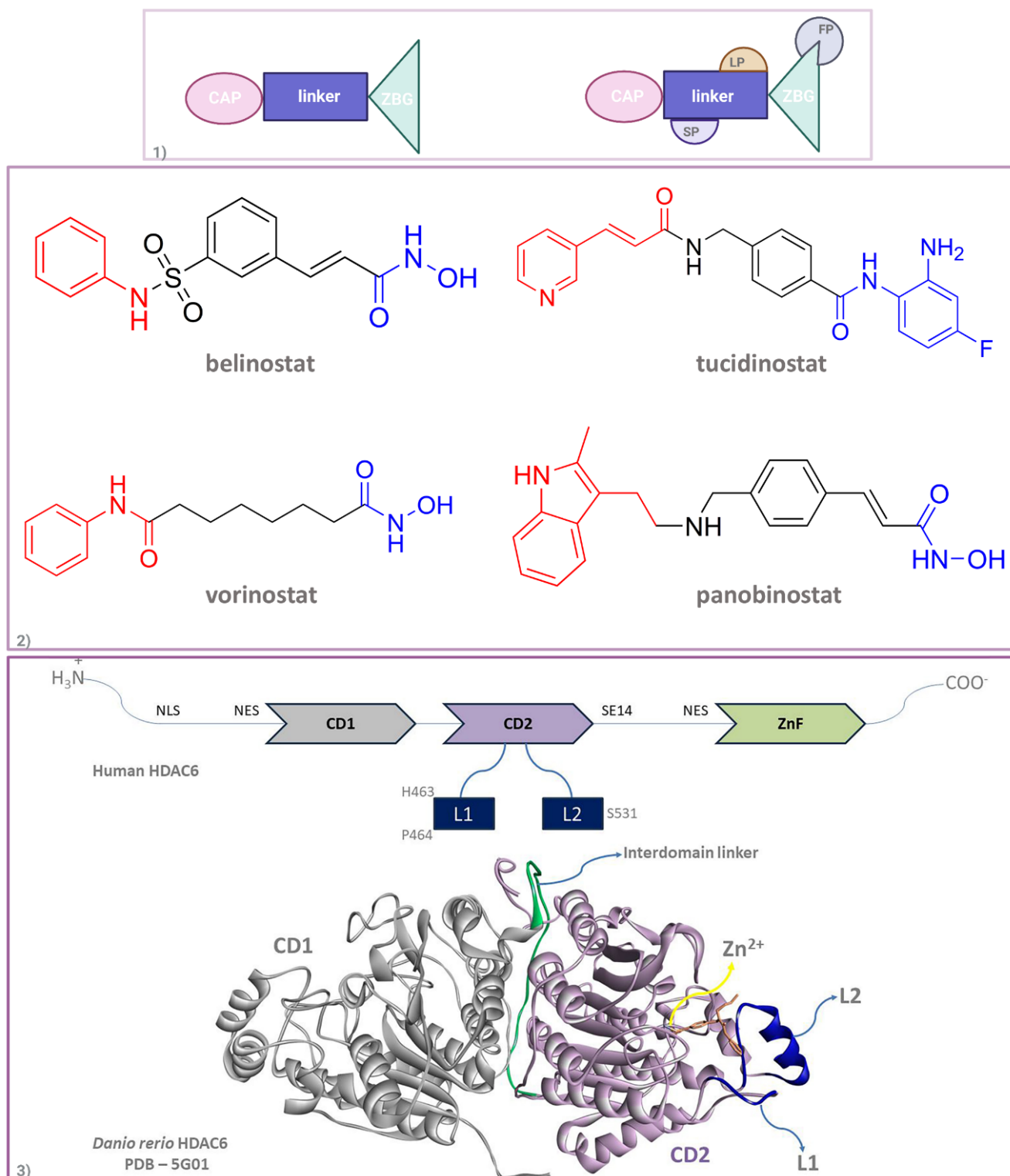
Sve prethodno navedene kompleksne regulatorne mreže naglašavaju ključnu ulogu HDAC u brojnim procesima koji doprinose tumorogenezi i progresiji tumora kao što su regulacija ćelijskog ciklusa, apoptoza, reparacija DNK, motilitet tumorskih ćelija, angiogeneza i autofagija. Ovakvi uvidi pružaju

snažan naučni osnov za razvoj terapijskih strategija zasnovanih na inhibiciji HDAC sa ciljem modulacije ovih kritičnih procesa u tretmanu različitih malignih oboljenja.

1.3.3. HDAC Inhibitori: dizajn farmakofore i pregled registrovanih lijekova

Koje strukturne karakteristike HDAC inhibitor mora posjedovati kako bi omogućio efikasnu inhibiciju histon-deacetilaza?

Farmakofora inhibitora histon deacetilaza (HDACi) se zasniva na prisustvu tri ključna elementa prema klasičnom farmakofornom modelu: **grupe za vezivanje cinka** (*Zinc-Binding Group*, ZBG), **CAP grupe** i **linkera** (**Slika 4-1A**) [44]. ZBG predstavlja kritičnu komponentu farmakofore. Ulogu ZBG mogu obavljati različite hemijske grupe poput hidroksamskih kiselina, 2-aminobenzamida, tiola i karboksilnih kiselina. ZBG omogućava koordinaciju jona cinka u katalitičkom domenu većine enzima. Ovaj korak je kritičan i ključan za inhibiciju HDAC enzimske aktivnosti. CAP grupa, s druge strane, ostvaruje interakciju sa površinom enzima ili aminokiselinskim ostacima u blizini spoljnog domena aktivnog mjesta, čime doprinosi afinitetu i selektivnosti inhibitora. Strukturne modifikacije CAP grupe dokazano povećavaju selektivnost HDAC inhibitora prema ciljanim izoformama [47]. Linker povezuje ZBG i CAP grupu omogućavajući njihovu optimalnu orijentaciju u aktivnom mjestu enzima.



Slika 4. 1) Šematski prikaz tradicionalnog (lijevo) i proširenog farmakofornog modela (desno) HDAC inhibitora; 2) Prikaz struktura registrovanih HDAC inhibitora; 3) Šematski prikaz strukture HDAC6 sa obilježenim specifičnostima u odnosu na ostale HDAC izoforme.

Iako je klasični farmakoforni model uspješno opisao strukturu većine HDAC inhibitora, otkriveni su novi inhibitori čije strukture ovaj model ne može adekvatno objasniti. Kako bi se obuhvatile složenije interakcije, *Melesina J.* i saradnici su predložili prošireni farmakoforni model koji uključuje dodatne komponente za precizniju karakterizaciju HDAC inhibitora (**Slika 4-1B**) [63]. Prošireni farmakoforni model uključuje tri dodatne grupe, pored prethodno opisanih segmenata tradicionalnog modela, koje ostvaruju interakcije sa specifičnim podstrukturama unutar enzima:

1. **SP grupa** (*the side-pocket-targeting group*, grupa za interakciju sa bočnim džepom)
2. **LP grupa** (*the lower-pocket-targeting group*, grupa za interakciju sa donjim džepom)
3. **FP grupa** (*the foot-pocket-targeting group*, grupa za interakciju sa džepom stopala) (**Slika 4-1**) [63].

Do danas je pet *pan*-HDAC inhibitora odobreno za primjenu u terapiji hematoloških maligniteta: vorinostat (poznat i kao SAHA), belinostat, panobinostat, tucidinostat i romidepsin (**Slika 4-2**) [64–68]. Vorinostat je odobren za tretman kožnog T-ćelijskog limfoma (CTCL), belinostat i tucidinostat za periferni T-ćelijski limfom (PTCL), panobinostat za multipli mijelom, dok je romidepsin odobren za liječenje oba tipa limfoma, CTCL i PTCL. U kontekstu solidnih tumora, *pan*-HDAC inhibitori su pokazali ograničenu efikasnost u kliničkim ispitivanjima kada su primjenjeni kao monoterapija, dok je kombinovana terapija ispoljila bolju efikasnost [69]. Dodatno, toksičnost i nuspojave povezane sa upotrebom neselektivnih HDAC inhibitora su značajno ograničile njihovu širu kliničku primjenu. Kako bi se poboljšala efikasnost i unaprijedio bezbjednosni profil, današnja istraživanja su se fokusirala na razvoj strategija koje povezuju više molekulskih puteva (*multitarget pristup*), kao i na otkriće HDAC inhibitora selektivnih za jednu HDAC izoformu [70–72].

1.4. HDAC6: Perspektivan target za razvoj selektivnih HDAC inhibitora

HDAC6 se ističe kao potencijalni target u dizajnu i sintezi selektivnih HDAC inhibitora zahvaljujući svojoj jedinstvenoj strukturi, biološkoj ulozi, specifičnoj lokalizaciji i ulogama u tumorogenezi i progresiji tumora. Dodatno, *in vivo* studije sprovedene na miševima su pokazale da HDAC6-deficijentni miševi (dobijeni primjenom *knock-out* pristupa) preživljavaju bez uočenih negativnih posljedica, što snažno ukazuje na to da HDAC6 nije neophodna za normalan razvoj [73–75]. Ovi rezultati sugerišu da inhibicija HDAC6 u zdravim tkivima ne bi trebalo značajno da ugrozi bezbjednosni profil terapije čime se dodatno podvlači potencijal HDAC6 u razvoju antitumorskih strategija.

1.4.1. Jedinstvena strukturna specifičnost HDAC6 izoforme

HDAC6 se izdvaja među ostalim HDAC izoformama prvenstveno svojom jedinstvenom strukturom koja predstavlja značajan potencijal za razvoj selektivnih HDAC6 inhibitora (**Slika 4-3**). Za razliku od drugih HDAC izoformi, HDAC6 sadrži dva katalitička domena (CD1 i CD2), a njena struktura uključuje i domen cinkovog prsta homologan proteazama specifičnim za ubikvitin, što omogućava vezivanje slobodnog ubikvitina (ubikvitin-vezujući domen) (**Slika 4-3**) [76,77]. Katalitički domeni HDAC6 imaju različite specifičnosti prema supstratima. Dok CD1 pokazuje visoku specifičnost prema supstratima sa C-terminalnim acetil-lizinskim ostacima (egzogeni acetil-lizinski peptidni supstrati), CD2 posjeduje širu

specifičnost, uključujući egzogene i endogene acetil-lizinske peptidne supstrate [77]. Istraživanje koje su sprovedi *Hai Y.* i *Christianson D.* je pokazalo da mutacija u CD2, ali ne i u CD1 domenu, smanjuje katalitičku aktivnost HDAC6 za više od 400 puta, što ukazuje na ključnu ulogu CD2 u ukupnoj katalitičkoj aktivnosti HDAC6 [77]. Zahvaljujući rezultatima ove studije može se zaključiti da bi strategije razvoja novih selektivnih HDAC6 inhibitora trebalo da se fokusiraju na interakcije i modalitete vezivanja za CD2.

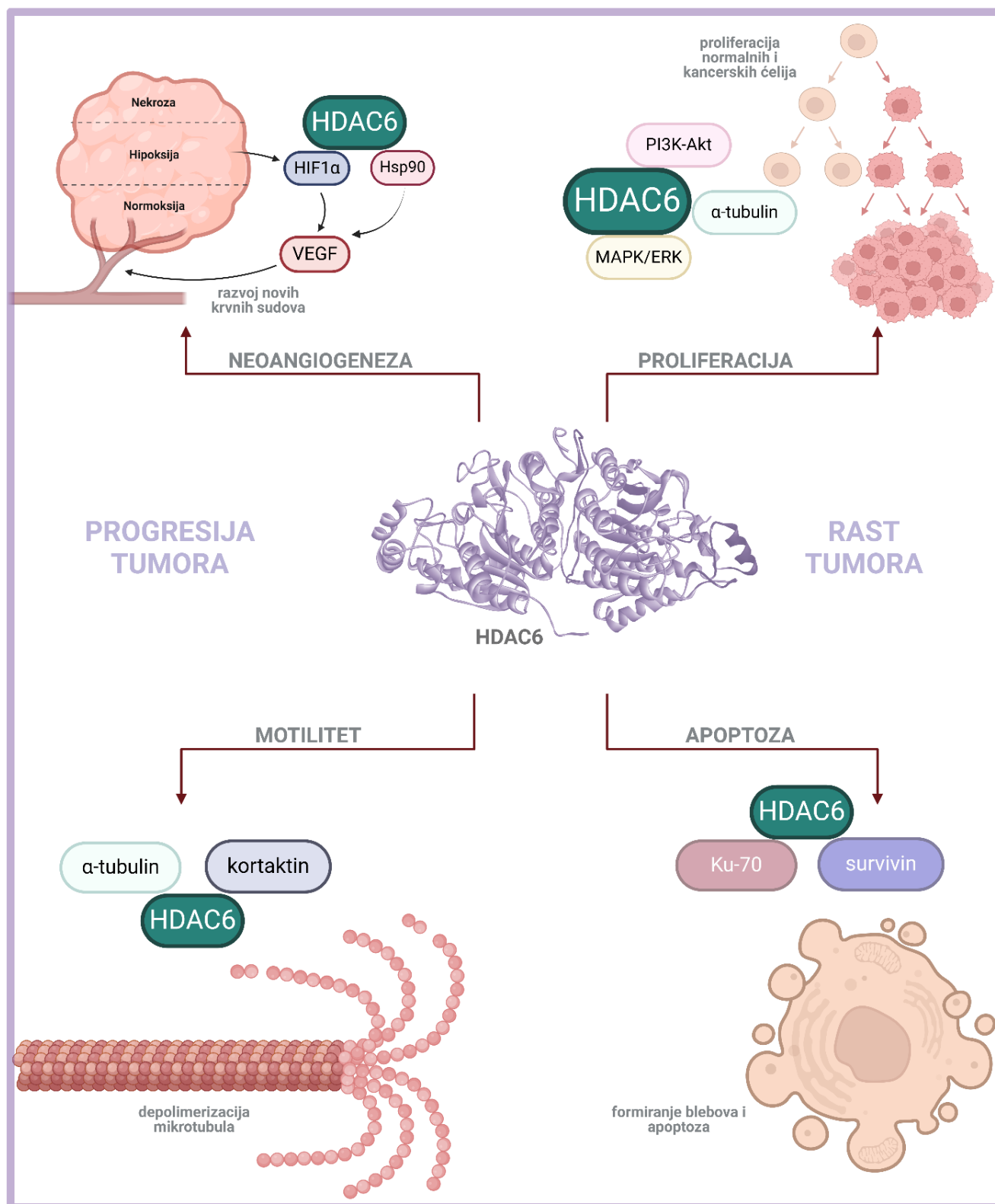
U kontekstu selektivnosti inhibitora ka HDAC6 u odnosu na ostale HDAC izoforme, prethodne studije su pokazale da interakcije između CAP grupe neselektivnih HDAC inhibitora i aminokiselinskih ostataka H463 i P464 u L1 petlji imaju veću važnost za vezivanje jedinjenja za HDAC1, HDAC2 i HDAC3 nego za HDAC6. Pored toga, identifikovan je ostatak S531, koji je dio L2 petlje, kao ključna aminokiselina za prepoznavanje α -tubulina (**Slika 4-3**) [76]. Ove razlike u vezivanju ukazuju na specifične strukturne elemente HDAC6 koje bi trebalo razmotriti pri razvoju novih selektivnih inhibitora ove izoforme [77].

1.4.2. Biološka specifičnost HDAC6 i njena povezanost sa tumorom

1.4.2.1. Uloga HDAC6 u motilitetu tumorskih ćelija

Jedna od prvih istraženih uloga HDAC6 je bila njen uticaj na motilitet tumorskih ćelija, koji proizilazi iz ključne funkcije ovog enzima u regulaciji acetilacije nehistonskih proteina, uključujući **α -tubulin** i **kortaktin** preko kojih HDAC6 posreduje u tubulin- i aktin- zavisnom motilitetu (**Slika 5**).

- 1) **α -tubulin i tubulin-zavisni motilitet:** α -tubulin je prvi identifikovani fiziološki supstrat HDAC6. On čini osnovni dio mikrotubula koje igraju dominantnu ulogu u regulaciji pokretljivosti ćelija, uključujući i tumorske ćelije [48]. Stabilnost mikrotubula zavisi od ravnoteže u acetilovanju α -tubulina, koju koordiniraju α -tubulin-acetil-transferaza i deacetilaze HDAC6 i SIRT2. Prekomjerna ekspresija HDAC6 dovodi do povećanog deacetilovanja α -tubulina što uzrokuje depolimerizaciju i nestabilnost mikrotubula i pogoduje pokretljivosti tumorskih ćelija (**Slika 5**) [74].
- 2) **Kortaktin i aktin-zavisni motilitet:** Osim mikrotubula, HDAC6 utiče i na aktinski citoskelet, takođe značajan za motilitet tumorskih ćelija. HDAC6 u saradnji s acetil-transferaznim faktorom p300/CBP (PCAF) reguliše acetilaciju kortaktina, proteina uključenog u polimerizaciju aktina (**Slika 5**). Prekomjerna ekspresija HDAC6 vodi ka deacetilaciji kortaktina, čime se povećava njegov afinitet vezivanja F-aktina, što rezultira ubrzanom polimerizacijom aktinskih filamenata i povećanom pokretljivošću ćelija [78]. Pored direktnog uticaja na tumorske ćelije HDAC6, putem kortaktina, reguliše motilitet i endotelne ćelije promovšući proces angiogeneze [79].



Slika 5. Šematski prikaz povezanosti HDAC6 i bioloških procesa koji doprinose rastu i progresiji tumora: angiogeneza, proliferacija, motilitet i apoptoza. *Created in <https://BioRender.com>*

1.4.2.2. Uloga HDAC6 u apoptozi tumorskih ćelija

HDAC6 ima bitnu ulogu u regulaciji programirane ćelijske smrti (apoptoze) putem modulacije acetilacije nehistonskih proteina kao što su **Ku-70** i **survivin** (Slika 5).

- 1) **Ku-70**: DNK-reparativni protein koji u deacetilovanom stanju inhibira apoptozu vezivanjem proapoptotskog Bax-proteina, čime sprečava njegovu ulogu u poremećaju mitohondrijske membrane i oslobađanju proapoptotskih faktora. Acetilacija Ku-70, katalizovana acetil-transferazama poput CREB-vezujućeg proteina (CBP), inhibira njegovo vezivanje za Bax, omogućavajući Bax-u da pokrene apoptozu kroz oslobađanje citohroma C i aktivacijom efektorskih kaspaza. Povećana ekspresija HDAC6 dovodi do deacetilacije Ku-70, povećavajući njegovu sposobnost vezivanja Bax-proteina što rezultira izostankom apoptoze [51]. Pored toga, deacetilovani Ku-70 se vezuje za FLIP (FLICE-inhibitorni protein), stabilizujući ga i sprečavajući njegovu degradaciju. Građenjem Ku70-FLIP kompleksa se sprečava aktivacija ključnih efektorskih kaspaza, poput kaspaze 8, čime se dodatno obezbeđuje preživljavanje tumorskih ćelija [80].
- 2) **Survivin**: Član porodice inhibitora apoptoze (IAP), ključan za stabilizaciju mikrotubula i sprečavanje aktivacije kaspaza. HDAC6 ulazi u jedro zahvaljujući histon acetil-transferaznom proteinu - CBP gdje deacetilovanjem survivina stimuliše njegovu translokaciju iz jedra u citoplazmu. Survivin na nivou citoplazme inhibira kaspaze i otežava indukciju apoptoze [81]. Dodatno, survivin ima ulogu i u ćelijskom ciklusu tumorskih ćelija i angiogenezi.

1.4.2.3. Uloga HDAC6 u proliferaciji i rastu tumorskih ćelija

HDAC6 doprinosi proliferaciji ćelija i rastu tumora putem više mehanizama regulišući funkcije brojnih supstrata (Slika 5). Njena uloga u signalnim putevima ključnim za kontrolu ćelijskog ciklusa i preživljavanje tumorskih ćelija može se sumirati kroz sljedeće mehanizme:

1) **PI3K-Akt signalni put:**

- **Djelovanje pomoću HSP90**: HDAC6 posreduje deacetilaciji HSP90 čime se olakšava interakcija između HSP90 i Akt proteina. Ova interakcija stabilizuje Akt i omogućava njegovu dalju fosforilaciju i aktivaciju PI3K-Akt signalnog puta što promoviše ćelijsku proliferaciju i preživljavanje [82].
- **Djelovanje kroz HDAC6-PP1 kompleks**: Aktivacija Akt-a se može inhibirati primjenom HDAC6 inhibitora koji sprečava formiranje kompleksa između HDAC6 i protein-fosfataze 1 (PP1). U odsustvu ovog kompleksa, PP1 ostaje slobodna da interaguje sa Akt vršeći njegovu defosforilaciju, čime se Akt inaktivira, a proliferacija tumorskih ćelija smanjuje [83].

- 2) **MAPK** (mitogenom aktivirana protein kinasa, *mitogen activated protein kinases*)/**ERK signalni put**: Prekomjerna ekspresija HDAC6 je povezana sa aktivacijom MAPK/ERK puta u određenim vrstama tumora. Aktivacija ovog puta dovodi do povećane transkripcije gena uključenih u proliferaciju i ćelijsku diferencijaciju čime se promoviše nekontrolisana proliferacija tumorskih ćelija [84].

- 3) **Regulacija putem α -tubulina:** HDAC6 deacetilacijom α -tubulina se omogućava formiranje kompleksa između CYLD (ubikvitin-specifične proteaze) i Bcl3 proteina [85,86]. Na taj način se Bcl3 translocira u jedro gdje doprinosi aktivaciji transkripcionog nuklearnog faktora NF- κ B. Aktivirani NF- κ B stimulira transkripciju gena za ciklin D1 koji je jedan od bitnih regulatora prelaska ćelija iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa, čime se dodatno promovira proliferacija tumorskih ćelija [86].

1.4.2.4. Uloga HDAC6 u angiogenezi

Angiogeneza je dinamičan proces koji zavisi od balansa proangiogenih i antiangiogenih faktora. Proangiogeni faktori poput VEGF, interleukina-8 (IL-8) i faktora rasta fibroblasta (FGF), imaju ključnu ulogu u inicijaciji i progresiji angiogeneze. Stromalne ćelije tumorskog mikrokruženja, uključujući makrofage i fibroblaste, dodatno pojačavaju angiogene signale sekrecijom citokina i faktora rasta sinergistički djelujući sa proangiogenim signalima tumorskih ćelija.

HDAC6 ima ulogu u stimulaciji procesa angiogeneze, što je jedan od kritičnih koraka u rastu i progresiji tumora. Njeno djelovanje se ostvaruje prvenstveno preko dva ključna supstrata: **hipoksijom inducibilnog faktora 1 α (HIF-1 α)** i **HSP90 proteina (Slika 5)**.

1. **HIF-1 α :** HDAC6 se vezuje za HIF-1 α utičući na njegovu stabilnost i transkripcionu aktivnost. U hipoksičnim uslovima, koji često dominiraju u tumorskom mikrokruženju, HIF-1 α aktivira ekspresiju gena odgovornih za adaptaciju ćelija na smanjenu koncentraciju kiseonika. Jedan od ključnih targeta HIF-1 α je vaskularni endotelni faktor rasta A (VEGF-A) koji promovira formiranje novih krvnih sudova potrebnih za snabdijevanje tumorskih ćelija hranljivim materijama i kiseonikom. Pored indirektnog djelovanja na VEGF-A preko HIF-1 α , HDAC6 direktno podstiče sintezu VEGF-A intenzivirajući angiogenezu [87].
2. **HSP90 i aktivacija VEGF-A receptora:** Deacetilacija HSP90 katalizovana HDAC6 omogućava efikasnije vezivanje ovog proteina za VEGF-A, čime se stabilizuje interakcija VEGF-A sa njegovim receptorima VEGFR-1 ili VEGFR-2 na površini endotelnih ćelija [88]. Aktivacija ovih receptora pokreće niz signalnih puteva, uključujući PI3K/Akt i MAPK/ERK puteve, koji podstiču proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija, kao i stvaranje novih krvnih sudova [84,89].

Pored direktnog djelovanja na HIF-1 α i HSP90, HDAC6 takođe može indirektno doprinijeti angiogenezi modulacijom citoskeletnih elemenata i pokretljivosti ćelija što olakšava stvaranje vaskularnih struktura. Aktivnost HDAC6 koja doprinosi angiogenezi, ne samo da podstiče rast tumora, već igra i ključnu ulogu u razvoju rezistencije na terapiju, jer novostvoreni krvni sudovi omogućavaju evakuaciju toksičnih supstanci i efikasniju ishranu tumorskih ćelija.

1.4.2.5. Uloga HDAC6 u tumorskom imunitetu

Prethodna istraživanja su pokazala da HDAC inhibicija dovodi do povećane ekspresije PD-L1 u ćelijama trostruko negativnog karcinoma dojke (*triple-negative breast cancer*, TNBC) dok takav efekat nije zabilježen u tumorskim ćelijama koje eksprimiraju estrogenske i/ili progesteronske receptore [90]. Ovo ukazuje na specifičan epigenetski odgovor TNBC podtipa na HDAC inhibiciju. PD-L1, kada se veže za svoj receptor PD-1 na aktiviranim T-limfocitima, dovodi do inhibicije proliferacije, preživljavanja i

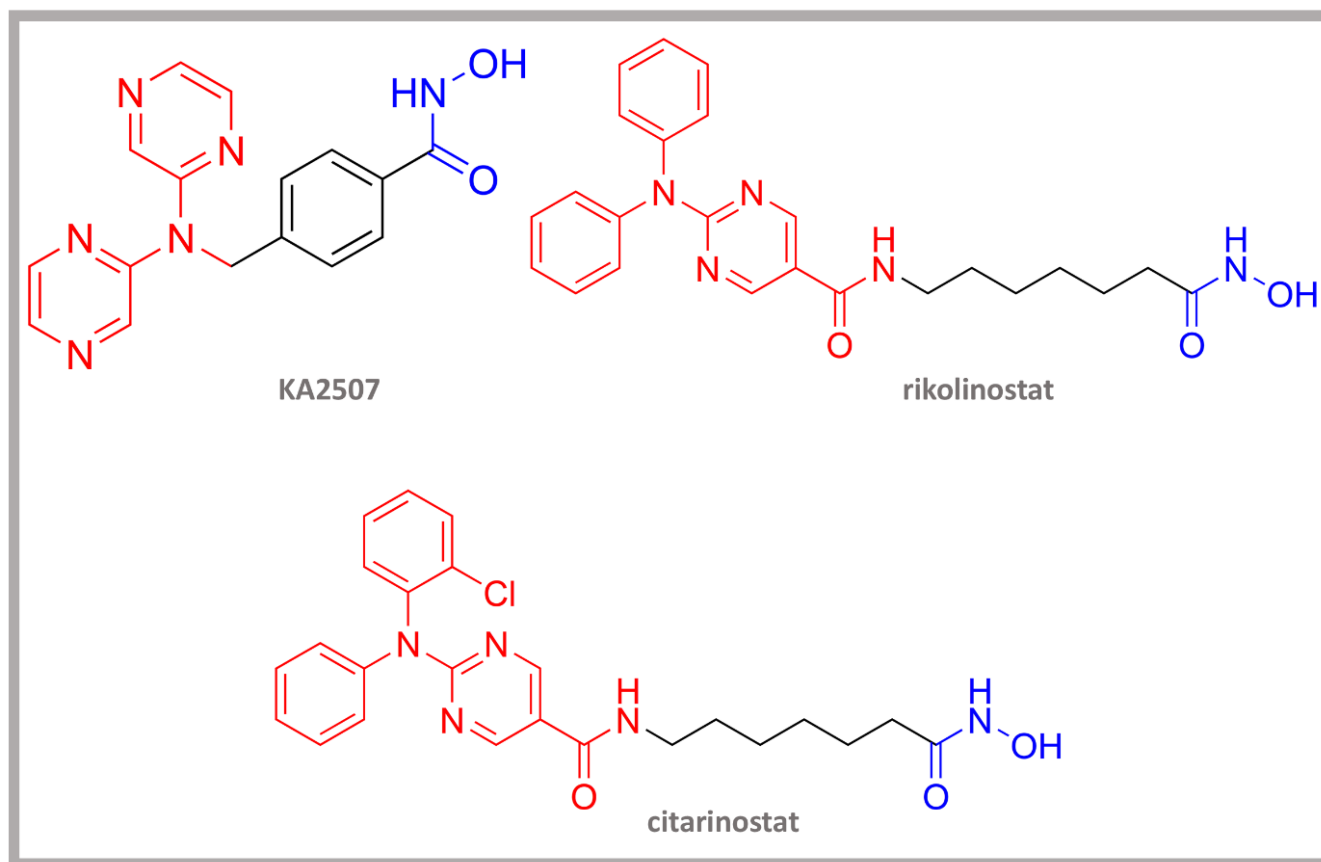
efektorskih funkcija ovih ćelija, uključujući smanjenu sekreciju proinflammatoryh citokina i citotoksičnost [91]. Ova imunoinhibitorna signalizacija predstavlja ključni mehanizam kojim tumorske ćelije izbjegavaju imunske eliminacije, čime se omogućava njihov dalji rast i progresija. Osim toga, aktivacija PD-1/PD-L1 puta doprinosi povećanoj rezistenciji tumora na djelovanje citotoksičnih T-limfocita (CTL), posebno u mikrookruženju tumora koje je već imunološki kompromitovano [92].

Uzimajući u obzir ove rezultate, terapijska blokada PD-1/PD-L1 interakcije predstavlja obećavajući pristup za reaktivaciju antitumorskog imunskog odgovora. Imunoterapija temeljena na inhibitorima imunoloških kontrolnih tačaka (*immune checkpoint blockers*, ICBs), posebno PD-1/PD-L1 blokatorima, već je pokazala kliničku efikasnost u brojnim malignitetima, uključujući i podgrupu pacijenata sa TNBC [93]. Međutim, odgovori su često ograničeni, a rezistencija na terapiju predstavlja značajan izazov. Kombinovane terapije, poput kombinacije HDAC inhibitora sa PD-1/PD-L1 blokatorima, se sve više istražuju kao strategija za pojačavanje imunoterapijskog odgovora i efikasnosti PD-1/PD-L1 blokatora [90]. Neka istraživanja su pokazala da HDAC6 inhibitori ne samo da utiču na ekspresiju PD-L1, već i povećavaju infiltraciju efektorskih T-ćelija [94]. Dodatno, određene studije su pokazale da pretretman sa selektivnim HDAC6 inhibitorima može poboljšati efikasnost i prevenirati rezistenciju na ICB zahvaljujući neposrednom uticaju koji HDAC6 inhibitori ostvaruju po tumorsko mikrookruženje uključujući povećane ekspresije nekih adhezionih molekula poput E-kadherina (*E-cadherin*) i smanjenu infiltraciju imunosupresivnih ćelija [95]. Sinergija između HDAC6 inhibitora i PD-1/PD-L1 blokatora može rezultirati povećanjem efikasnosti imunoterapije što otvara nove mogućnosti za personalizovani terapijski pristup pacijentima sa TNBC, koji trenutno imaju ograničen broj ciljanih terapijskih opcija.

Zaključno, ukoliko se tumorske ćelije i ćelije tumorskog mikrookruženja posmatraju kao orkestar, HDAC6 predstavlja dirigenta koji precizno upravlja njihovim pokretima, proliferacijom, rastom i preživljavanjem. Kao jedan od bitnih regulatora malignog ponašanja tumorskih ćelija, HDAC6 je prepoznata kao obećavajući terapijski ciljni molekul. Njena inhibicija nosi značajan potencijal u smanjenju proliferacije, migracije, invazije i metastaziranja tumorskih ćelija, kao i neoangiogeneze i rasta tumora.

1.4.3. Selektivni HDAC6 inhibitori: farmakofora, predstavnici i izazovi koji su podstakli inovativna rješenja

Strukture selektivnih HDAC6 inhibitora se mogu predstaviti pomoću tradicionalnog i proširenog farmakofornog modela koji su prethodno opisani u **Poglavlju 1.3.3**. Do danas, nijedan selektivni HDAC6 inhibitor nije odobren za rutinsku kliničku primjenu, ali su neki od njih u fazi kliničkih ispitivanja, uključujući rikolinostat (ACY-1215), citarinstat (ACY-241) i KA2507 (**Slika 6**) [96–99]. Ovi inhibitori se istražuju kao potencijalna terapija za širok spektar malignih oboljenja poput relapsirajućih ili refraktornih limfoidnih maligniteta, metastatskog karcinoma dojke, melanoma i nemikrocelularnog karcinoma pluća.



Slika 6. Pregled struktura selektivnih HDAC6 inhibitora koji su u kliničkim ispitivanjima.

Iako su selektivni HDAC6 inhibitori razvijeni i predstavljaju obećavajući pristup u terapiji tumora, njihova primjena u kliničkim ispitivanjima je pokazala ograničen uspjeh kada se koriste kao monoterapija. Glavni izazov u njihovoj primjeni je potreba za visokim koncentracijama lijeka kako bi se postigla zadovoljavajuća antitumorska aktivnost [100]. Nažalost, visoke koncentracije često narušavaju selektivnost prema HDAC6 što povećava rizik od vezivanja HDAC6i (inhibitora histon deacetilaze 6) za druge HDAC izoforme i neželjene efekte.

Suočeni sa ovim izazovima, savremeni pravci istraživanja su fokusirani na unapređenje efikasnosti selektivnih HDAC6 inhibitora uz istovremeno smanjenje rizika od toksičnosti. Jedna od ključnih strategija se zasniva na identifikaciji ciljnih mjesta čija simultana inhibicija sa HDAC6 dovodi do aditivnih ili sinergističkih efekata što otvara put razvoju liganada sa višestrukim dejstvom [101]. Ovi inovativni molekuli, omogućavaju istovremenu inhibiciju HDAC6 i drugih ciljnih mjesta, pa tako mogu doprinijeti značajnom poboljšanju terapijskog učinka. Primjena liganada sa višestrukim dejstvom ne samo da omogućava bolju efikasnost pri nižim dozama lijeka, već i smanjuje rizik od neželjenih efekata povećavajući ukupnu podnošljivost terapije kod pacijenata. Ovakav pristup predstavlja značajan korak naprijed u optimizaciji terapijskih strategija i upotrebi HDAC6 inhibitora u terapiji tumora.

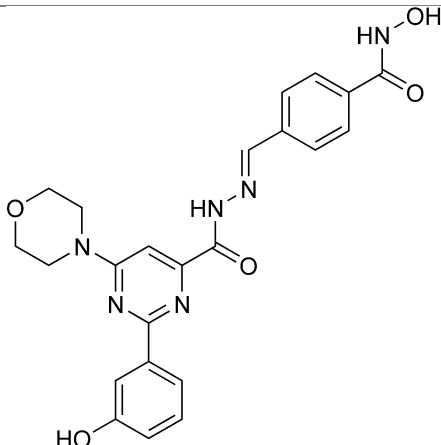
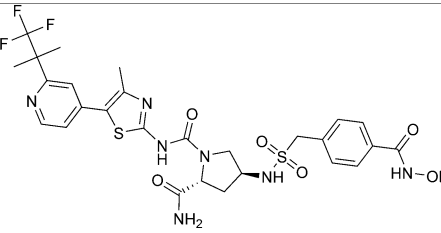
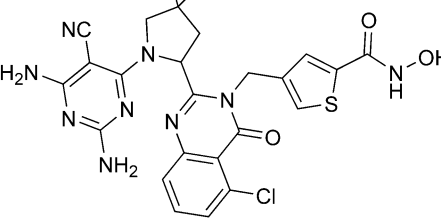
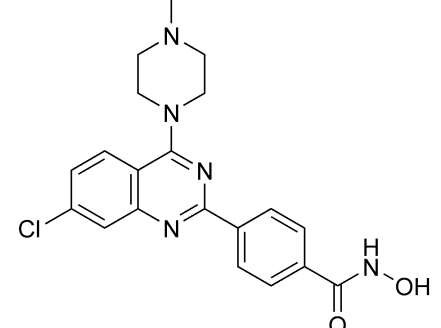
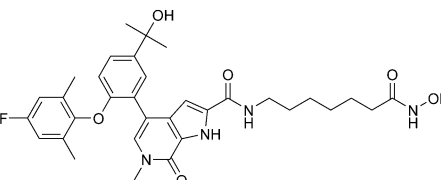
1.4.4. Dualni HDAC6 inhibitori: strukturna raznolikost i terapijski potencijal

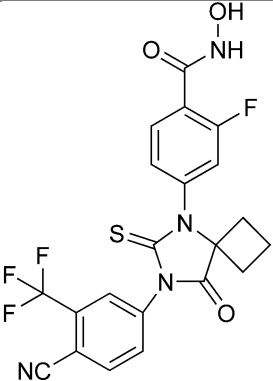
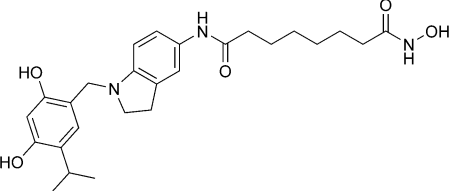
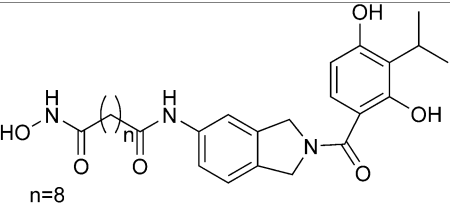
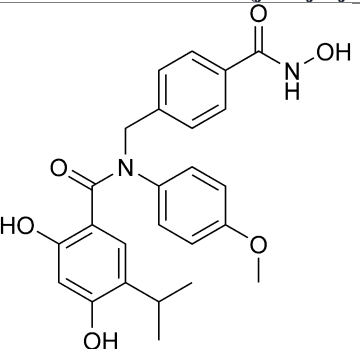
U sljedećoj tabeli (**Tabela 1**) se nalazi prikaz do sada otkrivenih HDAC6 inhibitora sa višestrukim ciljnim mjestom dejstva. Prvenstveno su prikazani dualni HDAC6 inhibitori koji simultano inhibiraju HDAC6 i jedan od sljedećih proteina: fosfatidilinozitol-3'-kinaze (*phosphoinositide 3-kinases*, PI3K), mTOR (*mammalian target of rapamycin*) kinaze, proteine koji sadrže bromo-domen 4 (*bromodomain-containing 4*, BRD4), androgene receptore (AR), HSP90, α -tubulin, lizin-specifičnu demetilazu 1 (*lysine-specific demethylase 1*, LSD1), p21 aktivirane kinaze (*p-21 activated kinase*, PAK1), fokalnu adhezionu kinazu (*focal adhesion kinase*, FAK), kao i histon deacetilaze 1 (HDAC1), 3 (HDAC3) i 8 (HDAC8). Glavni razlozi za racionalni dizajn liganada sa višestrukim dejstvom koji pored aktivnosti na HDAC6 moduliraju i jedan od prethodno navedenih ciljnih mjesta su:

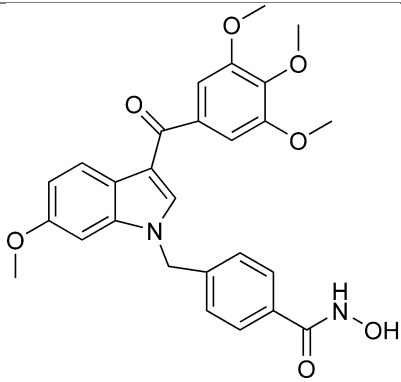
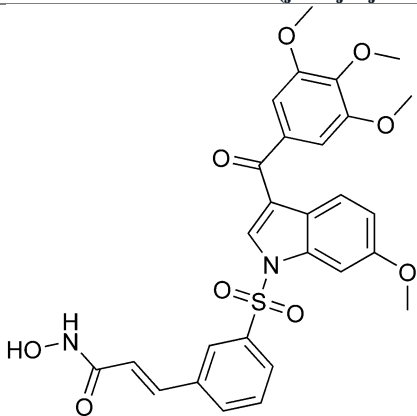
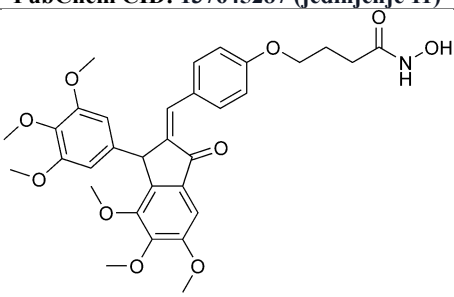
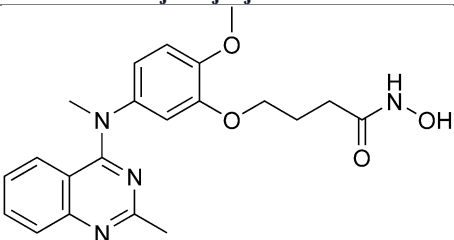
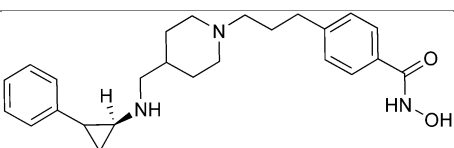
1. Sinergistički efekti HDAC6 inhibitora u kombinaciji sa PI3K, FAK inhibitorima, kao i stabilizatorima mikrotubula koji su dokazani u *in vitro* i/ili *in vivo* studijama [102–104].
2. Smanjenje efikasnosti mTOR inhibitora i BRD4 inhibitora kada se koriste kao monoterapija, uslijed povećane HDAC aktivnosti [105,106].
3. Povećanje aktivnosti AR i HSP90 uslijed prekomjerne ekspresije HDAC6 [107,108].
4. Istovremeno dejstvo na nehistske proteine koje se postiže inhibicijom HDAC1, HDAC3, HDAC8, LSD1 i HDAC6 može rezultirati sinergističkim efektima na različitim tumorskim ćelijskim linijama [61,109–113].

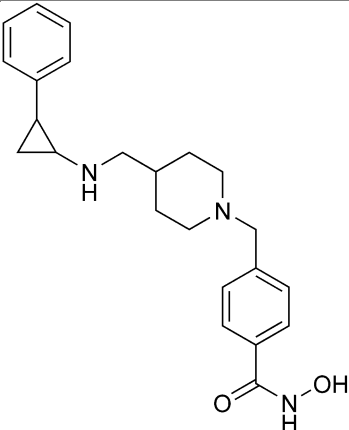
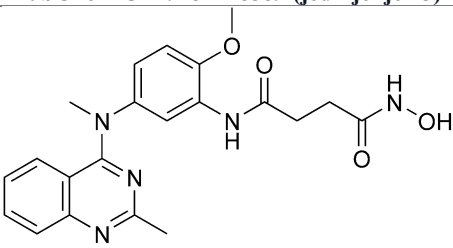
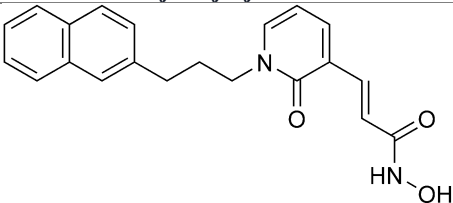
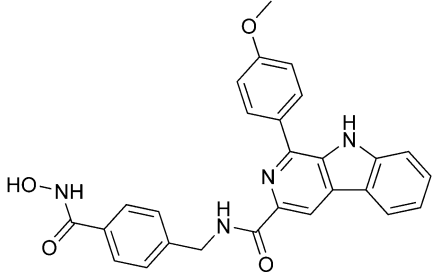
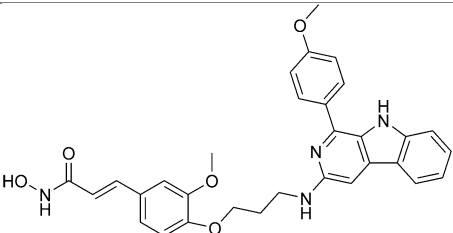
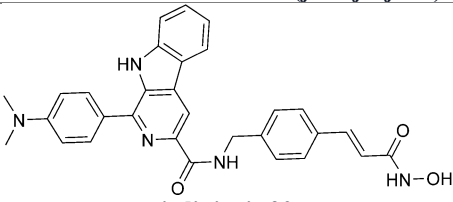
Svi inhibitori predstavljeni u **Tabeli 1** su selektivni za HDAC6 izoformu u poređenju sa ostalim histon deacetilazama. Dizajn i ključne interakcije svakog od predstavljenih dualnih HDAC6 inhibitora su detaljno objašnjene u okviru revijskog rada *Targeting Histone Deacetylase 6 in Dual-Target Therapy of Cancer* [101].

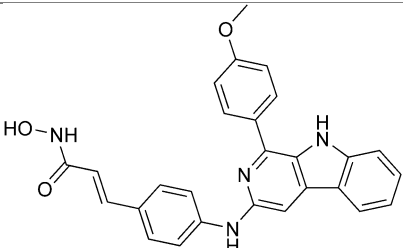
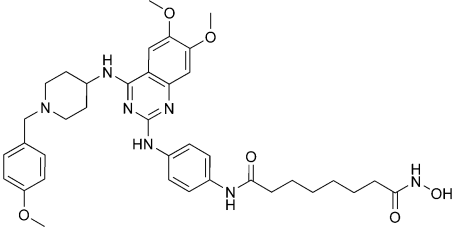
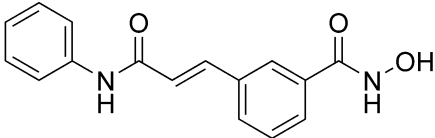
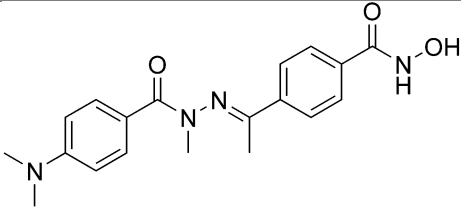
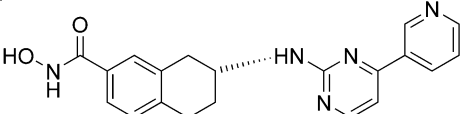
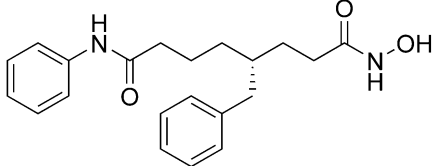
Tabela 1. Prikaz struktura, aktivnosti i razloga za racionalni dizajn dualnih HDAC6 inhibitora

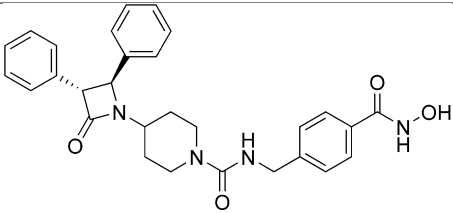
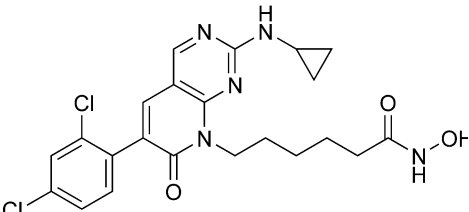
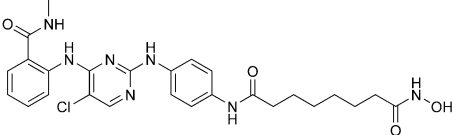
Struktura/PubChem ID:	Ciljna mjesto	Opravdanost za dizajn dualnih inhibitora	Dizajn farmakofore	IC ₅₀ values	Ref.
 PubChem CID: 168289467 (jedinjenje 1)	HDAC6/ PI3K α	Sinergizam između HDAC i PI3K inhibitora, pokazan u prethodnim <i>in vitro</i> studijama, je doveo do ideje za <i>multi-target</i> pristupom	<i>Djelimično spojena farmakofora</i>	15,3 nM (HDAC6) 46,3 nM (PI3K α)	[114]
 jedinjenje 2	HDAC6/ PI3K α		<i>Djelimično spojena farmakofora</i>	26 nM (HDAC6) 2,9 nM (PI3K α)	[115]
 PubChem CID: 168298545 (jedinjenje 3)	HDAC6/ PI3K δ		<i>Djelimično spojena farmakofora</i>	2,3 nM (PI3K δ) 13 nM (HDAC6)	[116]
 PubChem CID: 163322242 (jedinjenje 4)	HDAC6/ mTOR	Inhibicija mTOR dovodi do deacetilovanja histonskih proteina H3 i H4, što može rezultirati negativnim efektima selektivnih mTOR inhibitora [105]	<i>Potpuno preklopljena farmakofora</i>	56 nM (HDAC6) 133,7 nM (mTOR)	[117]
	HDAC6/ BRD4	Inhibicija BRD4 dovodi do povećane HDAC6 ekspresije što može smanjiti	<i>Djelimično spojena farmakofora</i>	17,2 nM (HDAC6) 1,2 μ M (BRD4)	[118]

PubChem CID: 155431228 (jedinjenje 5)	efikasnost BRD4 inhibitora [106]				
	HDAC6/ AR	HSP90 igra bitnu ulogu u aktivaciji androgenih receptora, HDAC6 utiče na aktivnost HSP90, i tako indirektno i na aktivnost AR [107,119]	Potpuno preklapljena farmakofora	0,98 μM HDAC6 0,63 μM AR	[120]
PubChem CID: 146434737 (jedinjenje 6)	HDAC6/ HSP90	HDAC6 regulišući nivo deacetilovanja HSP90 utiče na njegovu aktivnost, stabilnost, kao i na vezivanje za efektorske molekule [108]	Djelimično spojena farmakofora	1,15 nM (HDAC6) 46,3 nM (HSP90)	[121]
	HDAC6/ HSP90	HDAC6 regulišući nivo deacetilovanja HSP90 utiče na njegovu aktivnost, stabilnost, kao i na vezivanje za efektorske molekule [108]	Djelimično spojena farmakofora	4,32 nM (HDAC6) 46,8 nM (HSP90)	[122]
PubChem CID: 145985243 (jedinjenje 7)	HDAC6/ HSP90	HDAC6 regulišući nivo deacetilovanja HSP90 utiče na njegovu aktivnost, stabilnost, kao i na vezivanje za efektorske molekule [108]	Djelimično spojena farmakofora	4,56 nM (HDAC6) 52 nM (HSP90)	[123]
	HDAC6/ HSP90	HDAC6 regulišući nivo deacetilovanja HSP90 utiče na njegovu aktivnost, stabilnost, kao i na vezivanje za efektorske molekule [108]	Djelimično spojena farmakofora	4,56 nM (HDAC6) 52 nM (HSP90)	[123]
PubChem CID: 145984665 (jedinjenje 8)	HDAC6/ HSP90	HDAC6 regulišući nivo deacetilovanja HSP90 utiče na njegovu aktivnost, stabilnost, kao i na vezivanje za efektorske molekule [108]	Djelimično spojena farmakofora	4,56 nM (HDAC6) 52 nM (HSP90)	[123]
	HDAC6/ HSP90	HDAC6 regulišući nivo deacetilovanja HSP90 utiče na njegovu aktivnost, stabilnost, kao i na vezivanje za efektorske molekule [108]	Djelimično spojena farmakofora	4,56 nM (HDAC6) 52 nM (HSP90)	[123]
PubChem CID: 167505967 (jedinjenje 9)	HDAC6/ HSP90	HDAC6 regulišući nivo deacetilovanja HSP90 utiče na njegovu aktivnost, stabilnost, kao i na vezivanje za efektorske molekule [108]	Djelimično spojena farmakofora	4,56 nM (HDAC6) 52 nM (HSP90)	[123]

 PubChem CID: 137654946 (jedinjenje 10)	HDAC6/ tubulin	HDAC6 kontrolise dinamiku mikrotubula deacetilacijom α -tubulina (HDAC6i + inhibitori tubulina ispoljavaju sinergistčki efekat)	<i>Djelimično spojena farmakofora</i>	64,5 nM (HDAC6)	[124]
 PubChem CID: 137645287 (jedinjenje 11)	HDAC6/ tubulin		<i>Djelimično spojena farmakofora</i>	275,35 nM (HDAC6)	[125]
 jedinjenje 12	HDAC6/ tubulin		<i>Djelimično spojena farmakofora</i>	preostala HDAC6 aktivnosti pri koncentracij i 20 μ M je iznosila 3%	[126]
 PubChem CID: 122550211 (jedinjenje 13)	HDAC6/ tubulin		<i>Djelimično spojena farmakofora</i>	17 nM (HDAC6)	[127]
 PubChem CID: 132138171 (jedinjenje 14)	HDAC6/ LSD1	LSD1 i HDAC su dio CoREST kompleksa, koji je povezan sa preživljavanje m i proliferacijom ćelija tumora	<i>Potpuno preklopljena farmakofora</i>	48 nM (HDAC6) 6 nM (LSD1)	[128]

 PubChem CID: 132118589 (jedinjenje 15)	HDAC6/ LSD1		Potpuno preklopljena farmakofora	0,11 μ M (HDAC6) 0,54 μ M (LSD1)	[129]
 jedinjenje 16	HDAC6/ HDAC1	Zajednički supstrati HDAC1 i HDAC6 (nehistonski proteini) poput tumor supresorskog proteina p53	Potpuno preklopljena farmakofora	16,15 nM (HDAC6) 31,1 nM (HDAC1)	[130]
 PubChem CID: 49847150 (jedinjenje 17)	HDAC6/ HDAC1	HDAC1 i HDAC6 ulaze u sastav CoREST kompleksa	Potpuno preklopljena farmakofora	2,46 nM (HDAC6) 19,4 nM (HDAC1)	[131]
 jedinjenje 18	HDAC6/ HDAC1	Utišavanje HDAC1 i HDAC6 pojačava apoptozu ćelija akutne mijeloidne leukemije (AML) indukovanu citarabinom	Potpuno preklopljena farmakofora	2,6 nM (HDAC6) 4,1 nM (HDAC1)	[132]
 PubChem CID: 155515836 (jedinjenje 19)	HDAC6/ HDAC1		Potpuno preklopljena farmakofora	13 nM (HDAC6) 27 nM (HDAC1)	[133]
 jedinjenje 20	HDAC6/ HDAC1		Potpuno preklopljena farmakofora	7,6 nM (HDAC6) 29 nM (HDAC1)	[134]

 jedinjenje 21	HDAC6/ HDAC1		<i>Potpuno preklopljena farmakofora</i>	3,1 nM (HDAC6) 1,3 nM (HDAC1)	[135]
 PubChem CID: 155556138 (jedinjenje 22)	HDAC6/ HDAC3	HDAC3 djeluje na supstrate nehistonskog tipa kao što su NF-kB protein, RelA, p53, survivin – sinergistički efekti sa HDAC6i	<i>Djelimično spojena farmakofora</i>	34 nM (HDAC6) 2,6 nM (HDAC3)	[136]
 PubChem CID: 71681069 (jedinjenje 23)	HDAC6/ HDAC8		<i>Potpuno preklopljena farmakofora</i>	21 nM (HDAC6) 37 nM (HDAC8)	[137]
 PubChem CID: 154487896 (jedinjenje 24)	HDAC6/ HDAC8	HDAC8 djeluje na supstrate nehistonskog tipa poput: kortaktin, α- tubulin, p53, ERRα- sinergistički efekti, sa HDAC6i	<i>Potpuno preklopljena farmakofora</i>	97 nM (HDAC6) 54 nM (HDAC8)	[138]
 PubChem CID: 92045024 (jedinjenje 25)	HDAC6/ HDAC8		<i>Potpuno preklopljena farmakofora</i>	50 nM (HDAC6) 80 nM (HDAC8)	[139]
 PubChem CID: 134283800 (jedinjenje 26)	HDAC6/ HDAC8		<i>Potpuno preklopljena farmakofora</i>	48 nM (HDAC6) 27 nM (HDAC8)	[140]

 PubChem CID: 168282542 (jedinjenje 27)	HDAC6/ HDAC8		Potpuno preklopljena farmakofora	21 nM (HDAC6) 42 nM (HDAC8)	[141]
 PubChem CID: 168510343 (jedinjenje 28)	HDAC6/ PAK1	Inhibicija HDAC6 i PAK1 može imati snažne implikacije za liječenje tumora istovremenim djelovanjem na onkogene metaboličke puteve i epigenetske modifikacije	Djelimično spojena farmakofora	38,23 nM (HDAC6) 13,62 nM (PAK1)	[142]
 jedinjenje 29	HDAC /FAK	Sinergizam između HDAC i FAK inhibitora je dokazan u in vitro i in vivo studijama	Djelimično spojena farmakofora	16 nM (HDAC6) 132 nM (FAK)	[143]

1.5. Validacija nove *multi-target* HDAC strategije

Na osnovu rezultata *in vitro* i *in silico* studije sprovedene od strane Djokovic N. i saradnika, postavljeni su temelji za razvoj inovativne strategije dizajna liganada sa višestrukim dejstvom sposobnih za istovremenu inhibiciju HDAC i Rho-vezane kinaze (*rho-associated coiled-coil kinases*, *ROCK*) enzima [72]. HDAC/ROCK dualni inhibitori do danas nisu opisani u literaturi.

Cilj studije Djokovic N. i saradnika je bio identifikacija novih terapijskih ciljnih mjesta, čija bi istovremena inhibicija sa histon deacetilazama mogla dovesti do sinergističkih efekata u antitumorskoj terapiji duktalnog adenokarcinoma pankreasa (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) [72]. Prethodna istraživanja su pokazala da epigenetički terapeutici, uključujući HDAC inhibitore, ostvaruju klinički značajne benefite u PDAC, ali isključivo u okviru kombinovane terapije [144].

In silico studija je bila zasnovana na uspostavljanju farmako-transkriptomičke korelacije između bazalne ekspresije gena i osjetljivosti različitih tumorskih ćelijskih linija pankreasnog porijekla na odabranu grupu hemioterapeutika. Korišćenjem definisanog protokola su formirani transkriptomski otisci osjetljivosti ili rezistencije za svako bioaktivno jedinjenje, na osnovu kojih su identifikovane potencijalne sinergističke kombinacije hemioterapeutika. Validnost ovog pristupa je dodatno potvrđena identifikacijom već poznatih kombinacija sa HDAC inhibitorima čiji je sinergizam eksperimentalno dokazan u prethodnim *in vitro* studijama (postoje već podaci u literaturi). Ovim pristupom su identifikovane ROCK kinaze kao ključni terapijski targeti, čija istovremena inhibicija sa HDAC pokazuje značajan sinergistički efekat i antitumorski potencijal. Pored toga, sprovedena je analiza obogaćenja (*enrichment analysis*) kako bi se identifikovali signalni putevi čija bi istovremena modulacija sa HDAC mogla rezultirati sinergističkim efektima. Sfingolipidni signalni put je izdvojen kao relevantan za

ostvarivanje sinergističkih efekata sa HDAC inhibitorima, pri čemu su efektorski molekuli ovog puta upravo ROCK kinaze, što dodatno potvrđuje njihovu ulogu u potencijalno efikasnijem tretmanu PDAC-a u kombinaciji sa modulacijom aktivnosti histon-deacetilaza [72].

Finalno, sinergistički efekti između pan-HDAC inhibitora i ROCK inhibitora su eksperimentalno potvrđeni u istoj studiji korišćenjem **Chou-Talalay modela** na MiaPaCa-2 tumorskoj ćelijskoj liniji, čime su ovi *in silico* rezultati dodatno verifikovani i pružena je osnova za dalji razvoj ove strategije u cilju unapređenja terapijskih pristupa u liječenju PDAC-a [72].

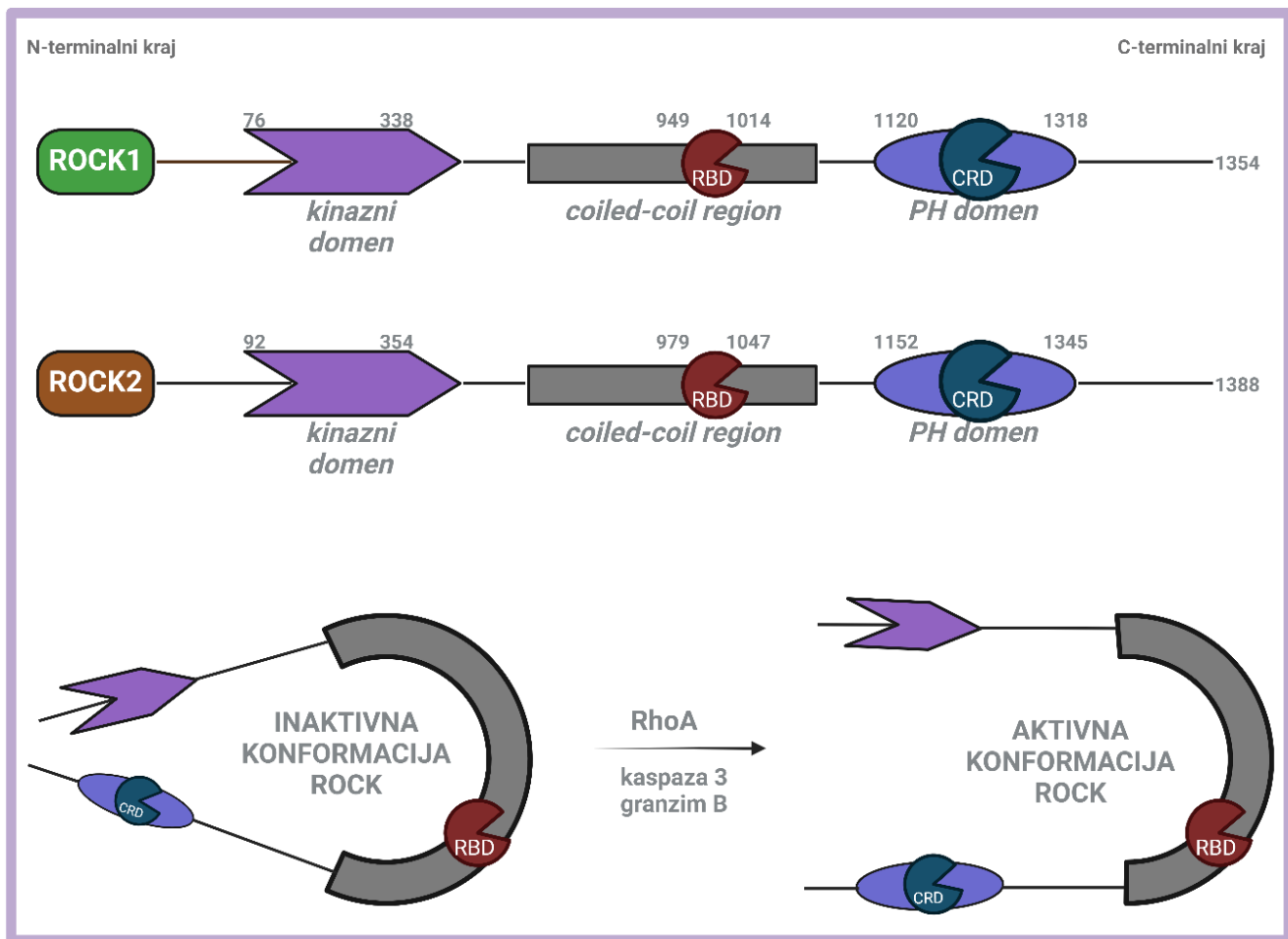
U međuvremenu je i studija, publikovana godinu dana kasnije, koju su sprovedi *Mao* i saradnici, pružila dokaze o snažnom sinergizmu između HDAC i ROCK inhibitora na TNBC ćelijskim linijama [145]. Ovi rezultati dodatno podržavaju koncept razvoja dualnih HDAC/ROCK inhibitora kao potencijalno efikasnih antineoplastičnih agenasa sa mogućnošću da unaprijede terapijske ishode kod pacijenata sa agresivnim malignim oboljenjima poput PDAC i TNBC.

1.6. ROCK kinaze

1.6.1. Struktura, regulacija aktivnosti i biološka funkcija ROCK kinaza

Rho-vezane kinaze (*Rho-associated coiled-coil containing kinases*, ROCKs) predstavljaju ključne efekte Rho GTPaza sa centralnom ulogom u regulaciji aktinskog citoskeleta i povezanim ćelijskim procesima uključujući kontrakciju, migraciju, adheziju i proliferaciju ćelija [146–149]. Ova porodica serin/treonin kinaza obuhvata dvije izoforme enzima – ROCK1 i ROCK2 – koje dijele visok stepen sekvencijske i strukturne sličnosti: 92% identičnosti u kinaznom domenu i 65% u cjelokupnoj strukturi [148].

Struktura ROCK kinaza je prikazana šematski na **Slici 7**. radi boljeg razumijevanja njihovih ključnih domena i funkcionalnih karakteristika. ROCK kinaze se sastoje od nekoliko strukturnih domena koji određuju njihovu aktivnost i specifičnost prema ciljnim molekulima. Na N-terminalnom kraju se nalazi **kinazni domen** odgovoran za katalitičku aktivnost enzima koji je visoko konzervisan između ROCK1 i ROCK2 (**Slika 7**). Centralni dio proteina čini **coiled-coil domen**, koji predstavlja najvarijabilniji segment između ove dvije izoforme, sa samo 55% sekvencijske sličnosti. U okviru *coiled-coil* domena smješten je **Rho-vezujući domen** (*rho-binding domain*, RBD – **Slika 7**), ključan za regulaciju aktivnosti ROCK enzima posredstvom interakcije sa aktiviranim Rho-GTPazama. Na C-terminalnom kraju se nalazi **plekstrinski homologni domen** (*pleckstrin homology domain*, PH), koji je podijeljen na dva segmenta **cistein-bogatim regionom** (*cysteine-rich zinc finger-like motif domain*, CRD) (**Slika 7**) [150].

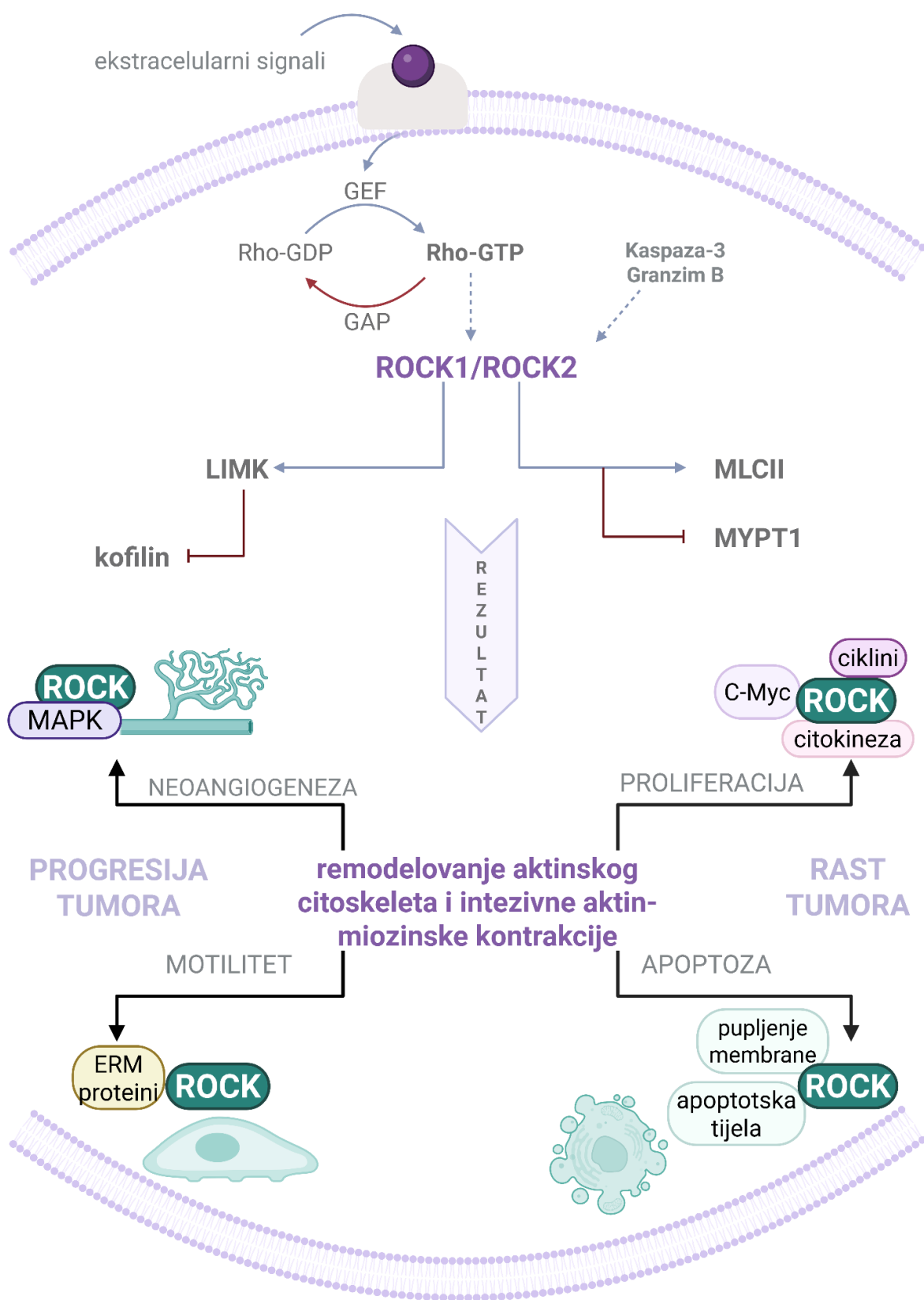


Slika 7. Šematski prikaz struktura ROCK1 i ROCK2 izoforme; Šematski prikaz Rho-A zavisne i Rho-A-nezavisne aktivacije ROCK kinaza posredstvom kaspaze 3 i granzima B. Slika je prilagođena prema referenci [150]. *Created in <https://BioRender.com>*

Uprkos značajnim strukturnim sličnostima, ROCK1 i ROCK2 pokazuju tkivno-specifičnu ekspresiju i funkcionalnu diferencijaciju. ROCK1 je prvenstveno zastupljen u nemišićnim tkivima, dok je ROCK2 prisutan u većoj mjeri u mozgu, srcu i skeletnim mišićima. Ova diferencirana ekspresija ukazuje na specifične uloge ROCK izoformi u fiziološkim i patološkim procesima. Međutim, potpuna razjašnjenost njihovih pojedinačnih funkcija i dalje predstavlja izazov u istraživanjima [150].

U prirodnim uslovima, ROCK kinaze se nalaze u inaktivnom stanju zahvaljujući autoinhibitorom mehanizmu u kojem ključnu ulogu ima C-terminalni region. Ovaj region ostvaruje intramolekulske interakcije sa kinaznim domenom, stabilizujući inaktivnu konformaciju proteina i sprečavajući njegovu katalitičku aktivnost (**Slika 7**) [150]. Ključna uloga C-terminalnog regiona u autoinhibiciji je potvrđena eksperimentalnim studijama koje su pokazale da delecija ovog segmenta rezultira konstitutivnom aktivacijom ROCK kinaza, nezavisno od interakcije sa regulatornim molekulima poput Rho-GTPaza [151]. Ovi rezultati ukazuju na to da C-terminalni region osigurava preciznu kontrolu aktivnosti ROCK kinaza u ćelijskim signalnim putevima i sprječava prekomjernu ROCK aktivaciju koja bi mogla dovesti do patoloških stanja.

Aktivacija ROCK kinaza se uglavnom odvija posredstvom **Rho-GTPaza** (RhoA i RhoB) koje funkcionišu kao molekularni prekidači prelazeći između inaktivnog, GDP-vezanog, i aktivnog, GTP-vezanog stanja (**Slika 8**) [152]. Ovaj proces je pod kontrolom faktora za razmjenu gvanidinskih nukleotida (GEFs) koji katalizuju zamjenu GDP-a za GTP omogućavajući aktivaciju Rho-GTPaza. Suprotno tome, proteini koji aktiviraju GTPazu (GAPs) stimulišu hidrolizu GTP-a u GDP, čime inhibiraju aktivnost Rho-GTPaza i posredno regulišu funkciju ROCK kinaza [150,153]. Nakon aktivacije, Rho-GTPaze interaguju sa Rho-vezujućim domenom ROCK kinaza, izazivajući konformacijsku promjenu koja prekida autoinhibitorne interakcije između C-terminalnog regiona i kinaznog domena, tako dovodeći do aktivacije ROCK enzima (**Slika 7**) Pored klasične **Rho-zavisne aktivacije**, ROCK kinaze mogu biti aktivirane i nezavisno od Rho-GTPaza. Ovaj alternativni mehanizam uključuje proteolitičko cijepanje autoinhibitorne C-terminalne regije zahvaljujući proteazama, poput kaspaze 3 (koja aktivira ROCK1) i granzima B (koji aktivira ROCK2) (**Slike 7,8**) [150,153]. Ovaj oblik aktivacije je posebno značajan tokom apoptoze gdje dolazi do ključnih promjena u ćelijskoj arhitekturi [154].



Slika 8. Šematski prikaz aktivacije ROCK kinaza i njihovo djelovanje na ključne supstrate (LIMK, MYPT1, MLC II); Šematski prikaz uticaja ROCK kinaza na procese koji doprinose rastu i progresiji tumora: neoangiogeneza, proliferacija, apoptoza, motilitet ćelija. *Created in* <https://BioRender.com>

ROCK enzimi imaju ključnu ulogu u regulaciji i stabilizaciji aktinskih filamenata i kontraktilnosti aktin-miozinskog sistema putem modulacije različitih ciljanih proteina uključujući laki lanac miozina II (*myosin light chain II*, MLC II), subjedinicu miozin fosfataze 1 (*Myosin Phosphatase Target Subunit 1*, MYPT1) i LIM kinaze (*Lin-11*, *Isl-1* i *Mec-3 kinases*) (**Slika 8**). Jedan od osnovnih mehanizama djelovanja ROCK kinaza je inhibicija aktivnosti miozin fosfataze fosforilacijom subjedinice miozin fosfataze 1 (MYPT1), što dalje sprječava defosforilaciju miozina i omogućava produženu kontraktilnost. Istovremeno, ROCK kinaze direktno fosforilišu laki lanac miozina II što dodatno doprinosi njegovoj aktivaciji. Kombinacija ovih procesa rezultira pojačanim formiranjem aktin-miozinskih filamenata i povećanjem kontraktilnosti posredovane miozinom [155]. Osim uticaja na miozin, ROCK kinaze fosforilišu i aktiviraju LIM kinaze koje su ključne za regulaciju dinamike aktinskog citoskeleta. Aktivirane LIM kinaze fosforilišu kofilin, protein odgovoran za depolimerizaciju aktinskih filamenata, prevodeći ga u neaktivno stanje. Kao rezultat, depolimerizacija aktinskih filamenata je značajno smanjena što doprinosi stabilizaciji aktinske mreže (**Slika 8**) [156].

Sveukupno, ove promjene indukovane aktivnošću ROCK kinaza uključujući fosforilaciju MLC II, inhibiciju MYPT1 i aktivaciju LIM kinaza dovode do reorganizacije aktinskog citoskeleta, pojačane kontraktilnosti posredovane miozinom i povećane mehaničke sile unutar ćelije (**Slika 8**). Ovi procesi imaju duboke posljedice u fiziološkim i patološkim stanjima. U kontekstu tumorske biologije, povećana aktivnost ROCK kinaza doprinosi migraciji ćelija, invaziji i metastazama, a može igrati ulogu i u promociji tumorskog rasta i proliferaciji tumorskih ćelija [111]. Zahvaljujući svojoj multifunkcionalnosti, ROCK kinaze su atraktivna ciljna mjesta u istraživanju terapija maligniteta i drugih poremećaja povezanih sa citoskeletom.

1.6.2. Uloga ROCK u patogenezi i progresiji tumora

1.6.2.1. ROCK kinaze i tumorogeneza – doprinos proliferaciji i rastu tumora

Brojne studije su potvrdile pozitivnu korelaciju između povećane ekspresije ROCK kinaza i rasta tumora, prvenstveno zahvaljujući njihovoj ulozi u proliferaciji tumorskih ćelija i indukciji angiogeneze. ROCK kinaze regulišu ćelijsku proliferaciju putem različitih mehanizama (**Slika 8**), uključujući:

1. **Regulaciju ekspresije proteina ćelijskog ciklusa:** ROCK kinaze pospješuju ekspresiju ključnih regulatora ćelijskog ciklusa poput ciklina D3 (CCND3), ciklin-zavisne kinaze 6 (CDK6) i ciklina D1 (CCND1). Ovi proteini stimulišu prelazak ćelija iz G1 u S fazu, što rezultira intenzivnijom ćelijskom proliferacijom u slučajevima prekomjerne ROCK aktivnosti [158].
2. **Regulaciju citokineze:** ROCK kinaze regulišu citokinezu u centrozomima putem fosforilacije proteina uključenih u formiranje i kontrakciju aktinskog prstena, kao i reorganizacijom aktinskog citoskeleta. Budući da su centrozomi strukture od značaja za pravilnu segregaciju hromozoma tokom ćelijske deobe, njihova disfunkcija može izazvati poremećaje segregacije hromozoma što dovodi do genomske nestabilnosti povezanih sa tumorogenezom. Povezanost ROCK signalnog puta i abnormalnosti centrozoma je dokumentovana u slučajevima atipične hronične mijeloidne leukemije i karcinoma dojke, gdje mutacije gena za morgana/CHP1 protein i BRCA2 gena rezultiraju disregulacijom ROCK2 aktivnosti koja dovodi do genomske abnormalnosti i progresije tumorskih procesa [148,159,160].

3. **Kontrolu aktivnosti onkogeni:** ROCK kinaze posreduju u fosforilaciji i aktivaciji određenih onkogeni, poput c-Myc što dodatno doprinosi proliferaciji tumorskih ćelija. Prekomjerna ekspresija c-Myc je povezana sa ubrzanim ćelijskim ciklusom, smanjenom kontrolom apoptoze i transformacijom normalnih ćelija u maligni fenotip što je naročito izraženo kod tumora dojke i prostate [161,162].

1.6.2.2. *RhoA-ROCK signalni put i regulacija angiogeneze*

ROCK signalni put značajno doprinosi rastu tumora regulacijom angiogeneze. Poremećaj regulacije angiogeneze, često povezan sa prekomjernom aktivacijom RhoA-ROCK signalnog puta, doprinosi povećanoj vaskularnoj propustljivosti, nestabilnosti krvnih sudova i ispoljavanju metastatskog potencijala tumorskih ćelija [163,164]. Mehanizmi kojima RhoA-ROCK signalni put doprinosi angiogenezi uključuju (**Slika 8**):

1. **Fosforilaciju MYPT-1:** Aktivacija ROCK kinaza dovodi do fosforilacije MYPT-1 čime se povećava kontraktilnost endotelne ćelije. Ovo rezultira povećanjem propustljivosti vaskularnog endotela, omogućavajući migraciju ćelija i prolazak molekula kroz vaskularnu barijeru.
2. **Aktivaciju LIM kinaza i inaktivaciju kofilina:** LIM kinaze, aktivirane ROCK signalnim putem, fosforilišu i inaktiviraju kofilin, ključni regulator remodelovanja aktinskog citoskeleta. Ovaj proces omogućava povećanu migraciju endotelne ćelije prema ekstracelularnom matriksu (ECM), što je ključno za formiranje novih krvnih sudova.
3. **Fosforilaciju i aktivaciju MAPK:** ROCK kinaze aktiviraju MAPK koje stimulišu proliferaciju endotelne ćelije omogućavajući rast kapilara i vaskularizaciju tumora.

RhoA-ROCK signalni put takođe stabilizuje novonastale krvne sudove i reguliše interakcije između endotelne ćelije i pericita, čime omogućava funkcionalnu zrelost vaskularne mreže. Razumijevanje ovih mehanizama pruža osnovu za razvoj novih terapijskih strategija, uključujući inhibitore ROCK kinaza, usmjerenih ka smanjenju tumorske vaskularizacije i ograničenju progresije malignih oboljenja.

1.6.2.3. *ROCK kinaze i progresija tumora – uticaj na migraciju i invaziju tumorskih ćelija*

ROCK kinaze imaju centralnu ulogu u procesima migracije i invazije tumorskih ćelija, koji vode ka formiranju metastaza, djelujući kroz niz mehanizama (**Slika 8**), kao što su:

1. **Formiranje stresnih vlakana i fokalnih adhezija:** Stresna vlakna predstavljaju snopove aktinskih filamenata povezanih sa miozinom koji generišu kontraktilnu silu neophodnu za kretanje tumorskih ćelija. Fokalne adhezije, kao tačke kontakta između ćelije i ekstracelularnog matriksa (ECM), omogućavaju prenos ovih sila na ECM, čime se ćelijama omogućava migracija i invazija u okolna tkiva. ROCK kinaze su ključni regulatori formiranja i kontraktilnosti stresnih vlakana i fokalnih adhezija dominantno putem fosforilacije lakih lanaca miozina II (MLC II) i inhibicije miozin-fosfataze (MYPT1), čime se povećava i održava kontraktilna aktivnost [165–167]. Pored toga, ROCK kinaze aktiviraju *ezrin/radixin/moesin* (ERM) proteine omogućavajući njihovo vezivanje za stresna vlakna i uzročno-posledično povezivanje stresnih vlakana i ćelijske membrane čime se dodatno olakšava ćelijska migracija.

2. **Polarizacija ćelija i ameboidni tip kretanja:** Tumorske ćelije koriste dva osnovna tipa kretanja:
- **Mezenhimalni tip migracije:** okarakterisan formiranjem filopodija i lamelopodija te izduženom morfologijom ćelija. Ovaj tip migracije je zavisian od proteolize ECM posredovane matriksnim metaloproteinazama (*matrix metalloproteinases*, MMP).
 - **Ameboidni tip migracije:** nezavisan je od razgradnje ECM, karakteriše ga okrugla morfologija ćelija, formiranje membranskih aktinskih blebova i dominantno oslanjanje na visoku kontraktilnost ćelija posredovanu ROCK signalnim putem. Ameboidni tip kretanja, često viđen kod visoko invazivnih tumora, omogućava ćelijama brzo i efikasno kretanje kroz tkiva, povećavajući njihovu sposobnost širenja i metastaziranja [168,169].

Uloga ROCK signalnog puta u progresiji tumora je dokazana u brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama zahvaljujući farmakološkoj inhibiciji ROCK signalizacije [170,171]. Primjenom ROCK inhibitora, poput Y-27632 i Fasudila, smanjena je kontraktilnost ćelija, što dalje dovodi do inhibicije formiranja stresnih vlakana i fokalnih adhezija. Ovi inhibitori tako sprečavaju migraciju i invaziju tumorskih ćelija potvrđujući ključnu ulogu ROCK kinaza u ovim procesima. Uzimajući u obzir rezultate ovih studija inhibitori ROCK signalnog puta se smatraju perspektivnim kandidatima za razvoj terapija usmjerenih ka metastatskim karcinomima.

1.6.2.4. ROCK kinaze i apoptoza

Tokom apoptoze, aktivacija ROCK kinaza dovodi do nekontrolisanih **aktin-miozinskih kontrakcija** koje rezultiraju pupljenjem membrane, formiranjem apoptotskih tijela i pakovanjem nuklearnog materijala u apoptotska tijela (**Slika 8**). Ovi procesi omogućavaju efikasno uklanjanje ćelijskih ostataka tokom apoptoze čime se održava homeostaza okolnog tkiva. Aktivnost ROCK kinaza u ovom kontekstu dodatno ukazuje na njihovu centralnu ulogu u regulaciji ćelijske smrti.

1.6.2.5. ROCK kinaze i antitumorski imunski odgovor

Određene eksperimentalne studije su pokazale da povećana ROCK ekspresija može doprineti stabilizaciji PD-L1. Naime, ROCK aktivacija rezultira fosforilacijom moezin proteina koji posreduje vezivanje za citoplazmatski rep PD-L1 molekula, čime se stabilizuje njegova ekspresija na površini tumorske ćelije. Ovaj mehanizam doprinosi imunosupresivnom fenotipu tumora, omogućavajući izbjegavanje imunološke eliminacije od strane efektorskih T-limfocita. Posledično, farmakološka inhibicija ROCK kinaza, naročito uz primjenu selektivnog inhibitora Y-27632, je pokazala potencijal u smanjenju ekspresije PD-L1 u tumorskim ćelijama. Time se uklanja imunosupresivna barijera i omogućava aktivacija T-ćelijskog odgovora, što se manifestuje povećanom proliferacijom i funkcionalnom aktivnošću T-limfocita kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Preklinički modeli karcinoma dojke su dodatno pokazali da ROCK inhibicija rezultira pojačanom infiltracijom CD4+ pomoćničkih i CD8+ citotoksičnih T-ćelija u tumorsko mikrookruženje, što doprinosi jačanju antitumorskog imunskog odgovora [172].

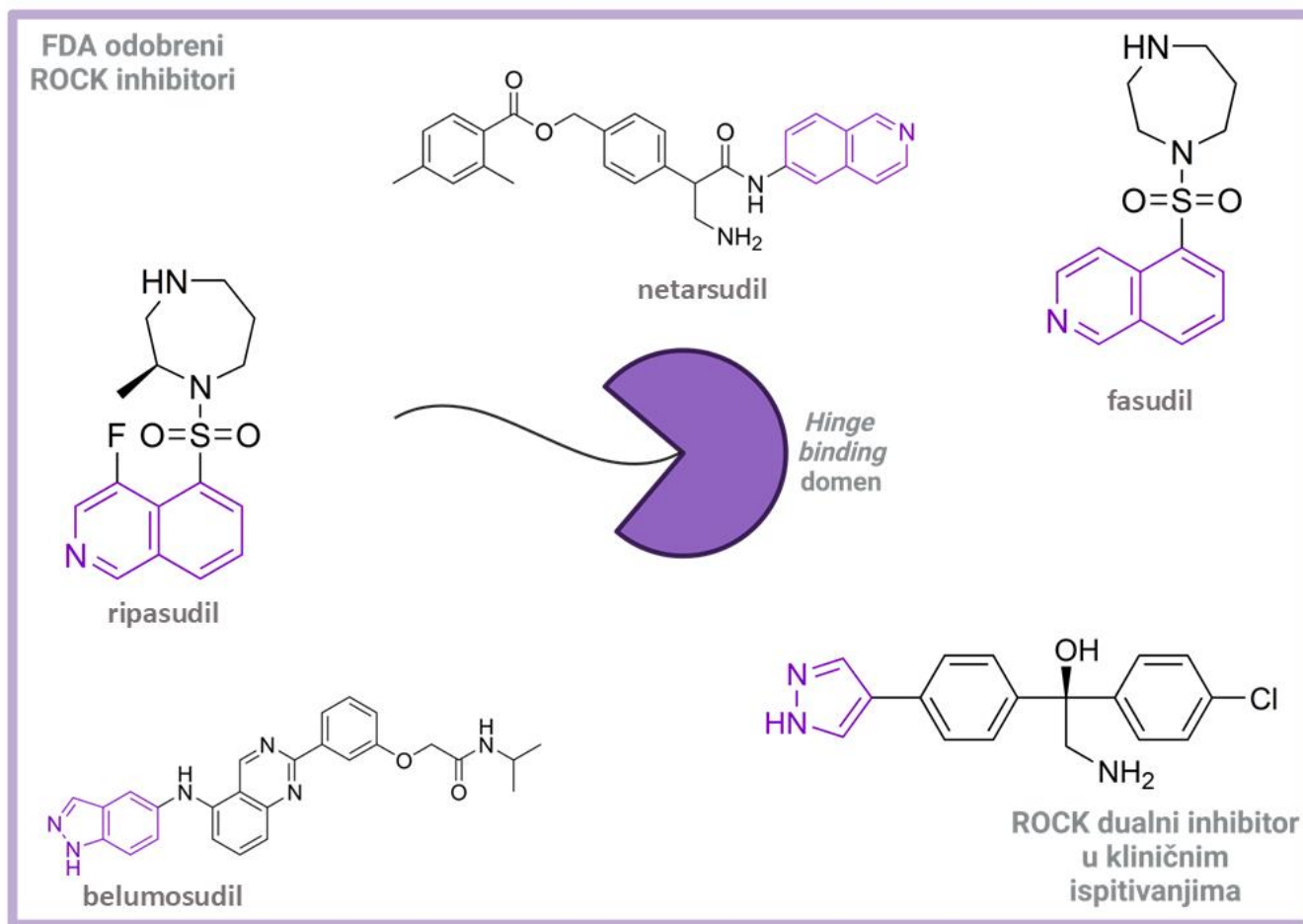
Ovi rezultati ukazuju da ROCK inhibitori ne djeluju samo kao supresori tumorske invazije i metastaziranja, već i kao potencijalni imunomodulatori koji mogu poboljšati efikasnost imunoterapijskih pristupa. Shodno tome, njihova primjena u kombinaciji sa blokatorima imunoloških kontrolnih tačaka, poput PD-1/PD-L1 inhibitora, mogla bi imati sinergističke ili aditivne efekte. Takva kombinovana

terapija bi potencijalno mogla prevazići mehanizme rezistencije na imunoterapiju i obezbijediti efikasniji klinički odgovor, posebno u tumorskim podtipovima sa izraženim imunosupresivnim karakteristikama.

1.6.3. ROCK inhibitori – okosnica za terapiju tumora

Svi prethodno navedeni rezultati upućuju na potencijalnu primjenu ROCK inhibitora u tumorskoj terapiji. Šta je do sada postignuto u ovom istraživačkom pravcu i postoji li neki od ROCK inhibitora koji je registrovan za onkološke indikacije?

ROCK kinaze su prekomjerno aktivirane ili eksprimirane u različitim malignitetima uključujući akutnu mijeloidnu leukemiju, karcinom jednjaka, karcinom bubrežnih ćelija (*clear cell renal carcinoma*), adenokarcinom želuca, karcinom dojke i pankreasa [157]. Uprkos kliničkom odobrenju četiri inhibitora ROCK kinaza, fasudila, ripasudila, netarsudila i belumosudila (**Slika 9**), nijedan od ovih lijekova nije registrovan za onkološku primjenu.



Slika 9. Prikaz struktura FDA-odobrenih ROCK inhibitora i ROCK/Akt dualnog inhibitora koji se nalazi u kliničkim ispitivanjima; ljubičasto je obilježen *hinge binding moiety* u okviru svakog molekula.

Većina dosadašnjih ROCK inhibitora pripada tipu 1 ATP-kompetitivnih inhibitora kinaza. Efikasna ROCK inhibicija je uslovljena prisustvom *hinge*-vezujućeg domena (**Slika 9**), ključnog strukturnog

elementa. U okviru ovog domena, istraženi su različiti strukturni segmenti poput izohinolina, piridina, indazola, pirimidina, pirolpiridina, pirazola, benzamida, aminofurazana i benzoksaborola [147].

Uzimajući u obzir visok stepen sličnosti u kinaznom domenu (92%), razvoj selektivnih inhibitora za ROCK1 ili ROCK2 predstavlja istraživački izazov. Trenutno dostupni farmakološki inhibitori uglavnom djeluju na obje izoforme što ograničava istraživanje specifičnih uloga pojedinačnih izoformi. Iako su postignuti pomaci u razvoju selektivnih inhibitora, potpuno selektivan ROCK1 ili ROCK2 inhibitor do danas nije otkriven što naglašava potrebu za boljim razumijevanjem strukturnih i funkcionalnih razlika. Razlikovanje funkcija ROCK1 i ROCK2 je ključno za razumijevanje njihovog doprinosa malignim procesima. *Shi* i saradnici su pokazali da ROCK1 destabilizuje aktinski citoskelet dominantno putem regulacije fosforilacije MLC II, dok ROCK2 utiče na aktinski citoskelet prvenstveno posredstvom fosforilacije kofilina [173]. *Newell-Litwa* i saradnici su otkrili da ROCK1 doprinosi formiranju stabilnih aktomiozinskih snopova ključnih za polaritet ćelija, dok ROCK2 reguliše kontraktilne sile na prednjem dijelu migrirajućih ćelija [174]. Ovi rezultati podvlače ulogu obje izoforme u ćelijskoj migraciji i njihov uticaj na metastatski potencijal tumora, iako se značaj ovih kinaza može razlikovati između različitih tipova maligniteta.

Prekliničke studije su dosledno pokazale antitumorske efekte inhibitora ROCK kinaza, ali njihova klinička primjena ostaje ograničena [175,176]. Istraživanja sugerišu da bi ovi inhibitori mogli biti efikasniji u kombinaciji sa drugim terapijama u poređenju sa monoterapijskim režimom. Na primjer, kod genetički modifikovanog mišjeg modela adenokarcinoma pankreasa, dodavanje ROCK inhibitora gemcitabinskoj terapiji je značajno produžilo preživljavanje u poređenju sa samim gemcitabinom [177]. Osim toga, rano davanje ROCK inhibitora ćelijama tumora pankreasa je inhibiralo invaziju i migraciju ćelija, smanjujući metastatski potencijal i povećavajući efikasnost hemioterapije [178,179]. U modelima tumora dojke, ROCK inhibitori su pokazali sposobnost smanjenja ekspresije PD-L1 što je rezultiralo povećanom aktivacijom T-ćelija *in vitro* i *in vivo*. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost kombinovanja ROCK inhibitora sa blokatorima PD-1/PD-L1 kontrolnih tačaka kako bi se poboljšao imunski odgovor kod tumora dojke [180]. Sinergistički efekti su takođe zabeleženi u *in silico* i *in vitro* modelima adenokarcinoma pankreasnih kanala prilikom kombinacije ROCK inhibitora sa HDAC inhibitorima [72]. Konačno, istovremena EGFR i ROCK inhibicija se pokazala kao obećavajuća strategija u terapiji trostruko negativnog raka dojke [181].

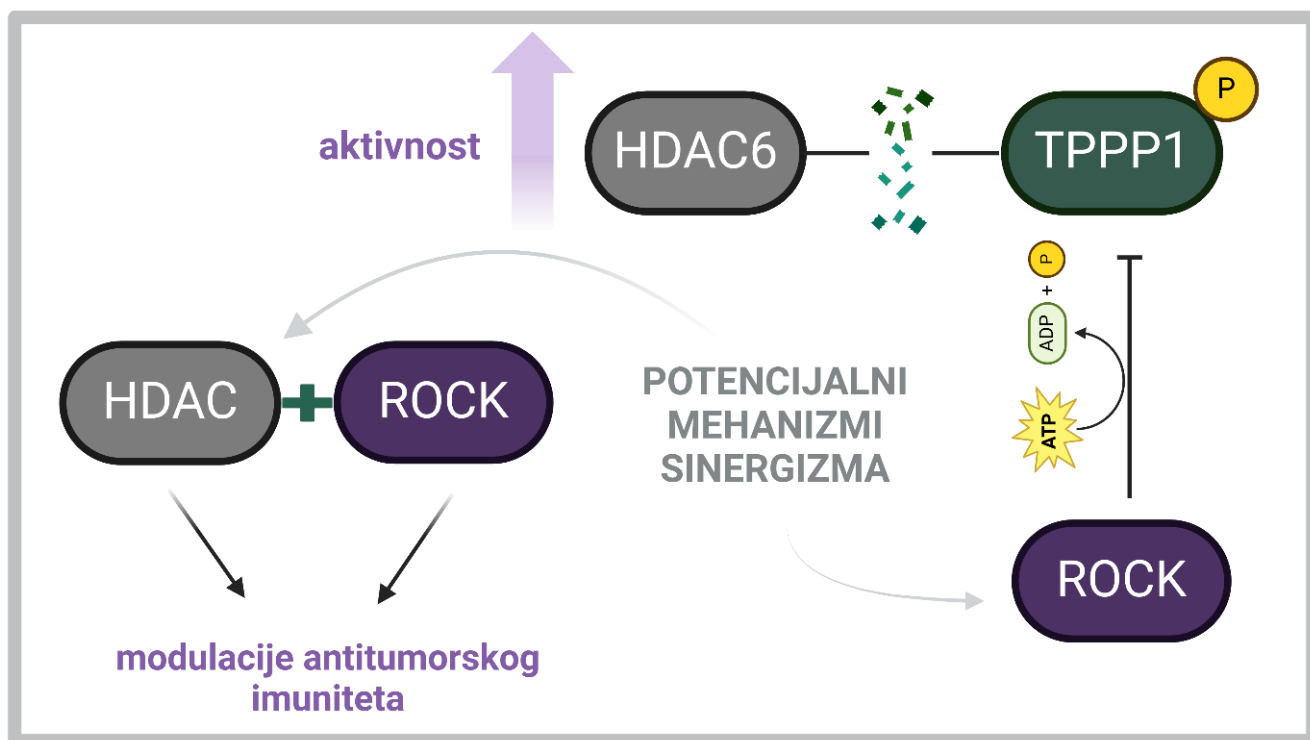
U svijetlu MTDL terapijskih strategija, sve više istraživanja je usmjereno ka otkrivanju ROCK inhibitora sa višestrukim dejstvom. Do sada je identifikovan samo jedan dualni ROCK/Akt inhibitor u kliničkim studijama (**Slika 9**), ali je njegov klinički potencijal bio ograničen zbog nepovoljnog farmakokinetičkog profila i uskog terapijskog indeksa [182]. Ipak, na osnovu brojnih *in silico*, *in vitro* i prekliničkih studija, postoji značajan potencijal za dalji razvoj dualnih ROCK inhibitora, uključujući dualne HDAC/ROCK inhibitore koji do danas nisu poznati u naučnoj literaturi.

1.7. Potencijalni mehanizmi sinergističkih efekata kombinacije HDAC i ROCK inhibitora

Mehanizam sinergije HDAC i ROCK inhibitora još uvijek nije u potpunosti razjašnjen što ukazuje na potrebu za daljim istraživanjima. Dosadašnje studije nude uvide u moguće sinergističke mehanizme, naročito u kontekstu motiliteta ćelija raka i imunskog odgovora tumorskih ćelija.

Mertch S. i saradnici su pokazali da signalni putevi ROCK i HDAC6 imaju značajnu međusobnu povezanost u progresiji tumora, naročito u procesima koji uključuju motilitet ćelija tumora [183]. ROCK kinaze fosforilišu protein koji podstiče polimerizaciju tubulina (*tubulin polymerization promoting*

protein, TPPP1), čime se on inaktivira i prekida interakciju sa HDAC6. Prekid ove interakcije dovodi do povećane HDAC6 aktivnosti (**Slika 10**) [183]. Inhibicija ROCK kinaza rezultira inaktivacijom HDAC6 i posledičnim povećanjem acetilacije tubulina, kao i remodelovanjem aktinskog citoskeleta. Istovremena HDAC6 i ROCK inhibicija vodi ka stabilizaciji mikrotubulske mreže, uslijed povećane acetilacije tubulina, i obustavi remodelovanja aktinskog citoskeleta [183].



Slika 10. Šematski prikaz potencijalnih sinergističkih mehanizama koji stoje u osnovi kombinovane upotrebe HDAC i ROCK inhibitora. *Created in* <https://BioRender.com>

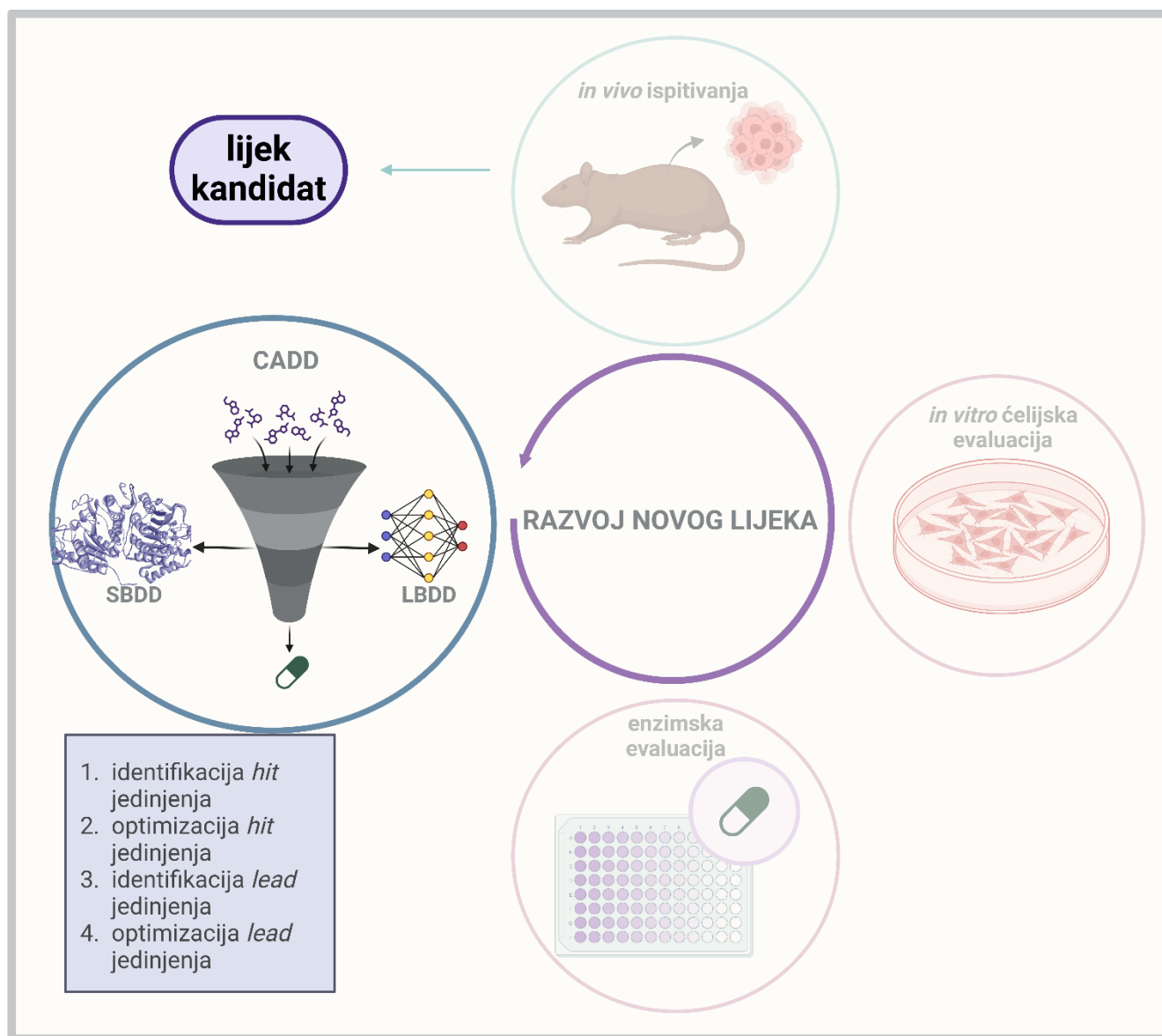
Pored efekata na motilitet ćelija, inhibicija ROCK kinaza je pokazala značajan potencijal u modulaciji antitumorskog imuniteta. Nam i saradnici su utvrdili da ROCK inhibitor, Y-27632, u kombinaciji sa doksorubicinom koji indukuje imunogenu smrt ćelija, sinergistički povećava sazrijevanje dendritskih ćelija, aktivaciju CD8⁺ T ćelija i njihovu infiltraciju u tumorsko tkivo. Ova kombinacija je u prekliničkim modelima značajno usporila rast tumora *in vivo*, što potvrđuje potencijal ove terapijske strategije [145,184]. Dodatno, HDAC inhibitori, poput vorinostata, su pokazali sposobnost indukcije imunogene smrti ćelija kod TNBC. Kombinacija ROCK i HDAC inhibitora, prema ovim saznanjima, predstavlja obećavajući pristup za sinergističko pojačanje antitumorskog imuniteta (**Slika 10**) [145,185].

Ovi, prethodno objašnjeni efekti, otvaraju vrata za dalja istraživanja kako bi se razjasnili u potpunosti molekularni mehanizmi koji stoje iza ove kombinovane strategije čime bi se dodatno podstakla njena primjena u kliničkoj onkologiji.

1.8. Tehnike racionalnog dizajna u otkriću lijekova (*Computer-Aided Drug Design, CADD*)

Tradicionalni proces otkrića novog lijeka predstavlja izuzetno zahtjevan poduhvat u pogledu vremena i ekonomskih resursa. Prosječni troškovi razvoja lijeka, od laboratorijskih istraživanja do plasmana na tržište, dostižu približno 2,87 milijardi dolara, dok ukupno trajanje ovog procesa iznosi 10-15 godina [186]. I pored intenzivnih i detaljnih istraživanja sprovedenih u prekliničkim i kliničkim fazama, svega 13% lijekova uspijeva da završi klinička ispitivanja, pri čemu je najčešći uzrok neuspjeha lijekova u kliničkim studijama neadekvatan farmakokinetički profil [187]. Uzroci povlačenja lijekova sa tržišta su najčešće neželjeni efekti lijeka, dok manji procenat odobrenih lijekova ne opravdava očekivanja u pogledu efikasnosti [188].

Racionalni dizajn lijekova predstavlja složeno istraživačko polje koje kombinuje znanja medicinske hemije i hemoinformatike u cilju otkrivanja i razvoja novih lijekova-kandidata. Kako bi se ubrzao proces otkrića novih lijekova, smanjili materijalni troškovi i minimizirao broj neuspjeha u različitim fazama razvoja, tehnike računarske hemije, poznate kao *Computer-Aided Drug Design* (CADD), su postale nezamjenjiv alat u istraživanjima farmaceutskih kompanija i akademske zajednice (**Slika 11**) [189]. Već 1981. godine naslovnica naučnog časopisa *Fortune* je donijela članak pod naslovom “*Next Industrial Revolution: Designing Drugs by Computer at Merck*” koji je simbolično označio početak ere široke primjene CADD tehnologija u farmaceutskim istraživanjima [190].



Slika 11. Šematski prikaz razvoja novog lijeka i uloge CADD alata u datom procesu. *Created in <https://BioRender.com>*

CADD tehnologije se mogu svrstati u dvije glavne kategorije, u zavisnosti od dostupnosti informacija o strukturi ciljnog mjesta djelovanja lijeka [191]. U skladu sa tim razlikuju se sljedeći pristupi:

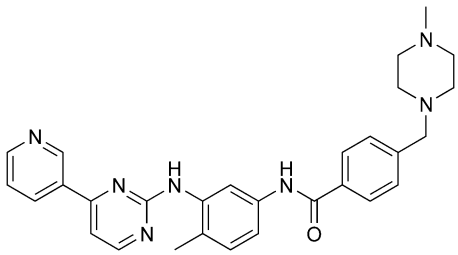
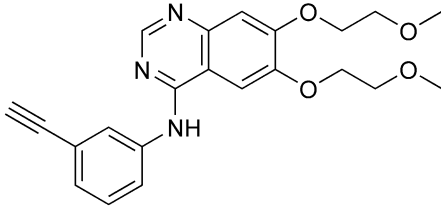
1. **Dizajn zasnovan na strukturi ciljnog mjesta djelovanja** (*Structure-Based Drug Design*, SBDD): Ove metode koriste trodimenzionalnu strukturu ciljnog mjesta djelovanja (receptori, enzimi ili proteini) kako bi identifikovale i optimizovale ključne interakcije između potencijalnog lijeka i ciljnog biomolekula [190].
2. **Dizajn zasnovan na strukturi liganda** (*Ligand-Based Drug Design*, LBDD): Ove metode koriste strukture poznatih liganada i njihove aktivnosti, predviđajući aktivnosti novih dizajniranih molekula sa potencijalnim terapijskim svojstvima [190].

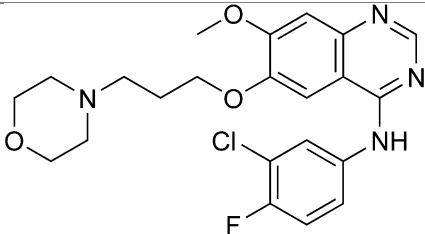
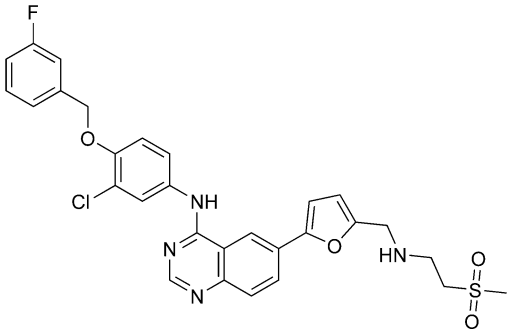
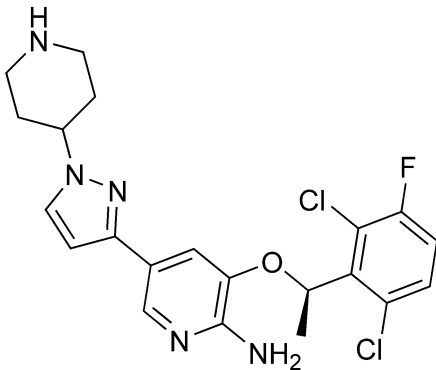
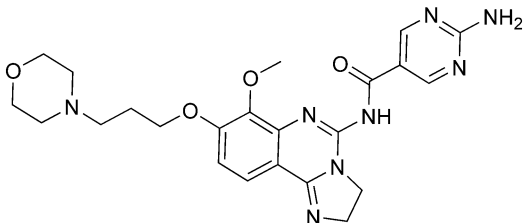
Obje grupe CADD metode igraju bitnu ulogu u savremenom procesu razvoja lijekova omogućavajući efikasniji, racionalniji i ciljani pristup dizajnu novih terapeutika. Ključne faze u procesu razvoja novih lijekova u okviru koji se CADD metode primjenjuju uključuju:

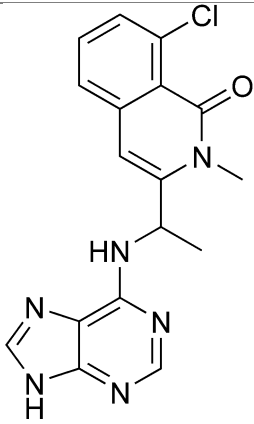
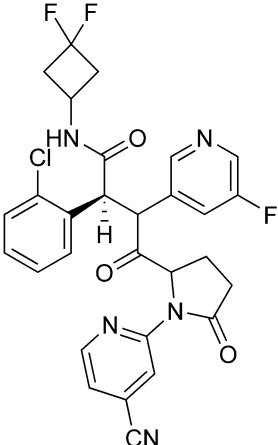
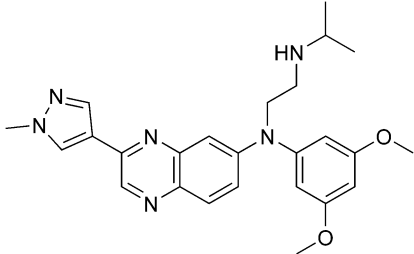
- 1) Identifikaciju i validaciju targeta;
- 2) **Skrining i optimizaciju *hit* i *lead* molekula (Slika 11);**
- 3) Prekliničku evaluaciju

Rezultati dosadašnjih studija potvrđuju značaj CADD metoda u razvoju lijekova. U prethodnih 40 godina je zahvaljujući njihovoj upotrebi otkriveno više od 70 lijekova trenutno dostupnih na tržištu [191,192]. Ne treba zanemariti i činjenicu da su CADD metode doprinijele otkriću velikog broja vodećih molekula (*lead* jedinjenja), koji su nas kasnije doveli do otkrića finalnih komercijalnih lijekova. Između ostalih, CADD tehnologije su imale značajnu ulogu u otkriću antineoplastika što ukazuje na potencijal njihovog korišćenja u ovoj oblasti [190,192]. Neki od antineoplastika u čijem su otkriću posredovali CADD alati su navedeni u okviru **Tabele 2**.

Tabela 2. Prikaz struktura registrovanih lijekova u terapiji različitih vrsta tumora u čijem su otkriću značajan doprinos dale CADD metode

Lijek/struktura	Ciljno mjesto	Uloga CADD u razvoju lijeka	Indikacija	Ref
Imatinib 	tirozin kinaza	Virtuelni skrining zasnovan na strukturi ciljnog mjesta (<i>Structure-based virtual screening</i> , SBVS, skrining na Bcr-Abl tirozin kinazu)	Hronična mijeloidna leukemija	[193]
Erlotinib 	EGFR kinaza	SBVS	Karcinom pankreasa i Nemikrocelularni karcinom pluća (NSCLC)	[194]
Gefitinib	Tirozin kinaza	SBVS	Nemikrocelularni karcinom pluća (NSCLC)	[194]

			
Lapatinib	HER2/EGFR	SBDD	Tumor dojke [195]
			
Crizotinib	HGFR, ALK i ROS1	SBDD i SAR	NSCLC [196]
			
Copanlisib	Fosfatidilinozitol-3-kinaza (PI3K)	SBDD (X-ray kristalografija, doking) i LBDD (bazirane na strukturi vodečeg molekula)	Relapsni folikularni limfom [197]
			
Duvelisib	PI3K	SBDD (molekulski doking i virtualni skrining) i LBDD (optimizacija vodečeg	Relapsna ili refraktorna hronična limfocitna leukemija [198]

	molekula i SAR)			
Ivosidenib	Izocitrat- dehidrogenaza-1 (IDH1)	LBDD i SAR	Akutna mijeloidna leukemija	[199]
	Poli (ADP-riboza) polimeraza-PARP	SBDD, SAR i optimizacija vodećeg molekula	HER- Tumor dojke	[200]
Talazoparib	FGFR kinaza	SBDD	Karcinom mokraćne beške	[201]
	Erdafitinib			

Kroz naredna poglavlja biće predstavljene teorijske osnove SBDD i LBDD metoda koje će se primjeniti u okviru istraživanja ove doktorske disertacije.

1.8.1. Dizajn zasnovan na strukturi ciljnog mjesta (*Structure-based Drug Design*, SBDD)

Uspješna primjena dizajna zasnovanog na strukturi ciljnog mjesta zahtjeva dostupnost trodimenzionalne (3D) strukture targeta. Stoga je prvi i ključni korak u implementaciji SBDD pristupa identifikacija biomolekula od interesa praćena prikupljanjem preciznih podataka o njegovoj strukturi.

Za određivanje 3D strukture makromolekula koriste se dvije grupe metoda:

- **Eksperimentalne metode**, koje uključuju rendgensku kristalografiju (X-ray), nuklearnu magnetnu rezonancu (NMR) i kriogenu elektronsku mikroskopiju [202];
- **Homologno modelovanje i vještačka inteligencija**: primjenjuju se u slučajevima kada eksperimentalni podaci nisu dostupni [202].

Strukturni podaci biomolekula, uključujući proteine, skladište se u standardizovanim bazama podataka poput **Proteinske banke podataka** (*protein data bank*, PDB, <https://www.rcsb.org/>) koja predstavlja značajan resurs za istraživače [203]. S povećanjem broja razriješenih 3D struktura biomolekula tokom posljednjih godina, značajno je porasla primjena SBDD metoda u racionalnom dizajnu lijekova.

Razumijevanje mehanizama putem kojih mali molekuli prepoznaju i interaguju sa makromolekulima od suštinske je važnosti za razvoj novih lijekova. U tom kontekstu, nakon određivanja 3D strukture biomolekula, presudno je precizno mapiranje **vezivnog mjesta** (*binding site*), specifične regije makromolekula odgovorne za interakciju sa ligandima [204]. Vezivno mjesto se najpreciznije identifikuje pomoću ko-kristalografskih studija koje omogućavaju formiranje kompleksa između makromolekula i liganda u kontrolisanim eksperimentalnim uslovima. Detaljna analiza strukture kompleksa makromolekul-ligand omogućava identifikaciju vezivnog mjesta praćenu karakterizacijom ključnih intermolekulskih interakcija kao što su vodonične veze, hidrofobne interakcije i π - π veze, kao i praćenje konformacionih promjena makromolekula tokom vezivanja liganda [205].

Nakon identifikacije vezivnog mjesta, sljedeće faze u okviru SBDD pristupa uključuju:

- **Pripremu banke jedinjenja**,
- **Molekulski doking**
- **Molekulsku dinamiku**
- **Računanje energije vezivanja**.

Dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za identifikaciju **hit** i **lead** jedinjenja koja se dalje optimizuju kroz sukcesivne cikluse SBDD metoda u kombinaciji sa različitim eksperimentalnim tehnikama validacije [204,206]. Uzimajući u obzir do sad raspoložive rezultate brojnih studija, najčešće korišćene metode u okviru SBDD pristupa uključuju [204]:

- **Molekulski doking**
- **Molekulsku dinamiku**, koja prati fleksibilnost i stabilnost ligand-makromolekul kompleksa u simuliranim biološkim uslovima tokom određenog vremenskog intervala na osnovu čega se vrši identifikacija onih interakcija koje imaju najveći značaj za dejstvo [207]
- **Virtuelni skrining zasnovan na strukturi ciljnog mjesta dejstva** (*Structure-based virtual screening*, SBVS)

- **De novo dizajn**, koji koristi informacije dobijene iz 3D strukture ciljnog mjesta u cilju pronalazjenja malih strukturnih segmenata koji se dobro vezuju za aktivno mjesto, nakon čega se vrši njihovo povezivanje i dizajniranje potpuno novog molekula sa potencijalno dobrom farmakološkom aktivnošću [208].

1.8.1.1. Molekulski doking

Molekulski doking predstavlja jednu od najvažnijih i najčešće korišćenih tehnika u okviru pristupa zasnovanog na strukturi ciljnog mjesta dejstva [209]. Ova metoda omogućava predikciju usidranja liganda u aktivno mjesto ciljnog biomolekula, vizuelizaciju vezivnih položaja liganda i identifikaciju ključnih intermolekulskih interakcija koje doprinose stabilnosti kompleksa ligand-makromolekul [210]. Pored toga, algoritmi molekulskog dokinga procjenjuju energije vezivanja liganada i vrše njihovo rangiranje primjenom takozvanih **funkcija vrijednovanja** (*Scoring functions*), što služi kao dodatni parametar u evaluaciji rezultata doking studije [209,210].

Da bi studija molekulskog dokinga bila visokog kvaliteta, potrebno je sprovesti nekoliko ključnih koraka (Slika 12)[211]:

1. Priprema proteina

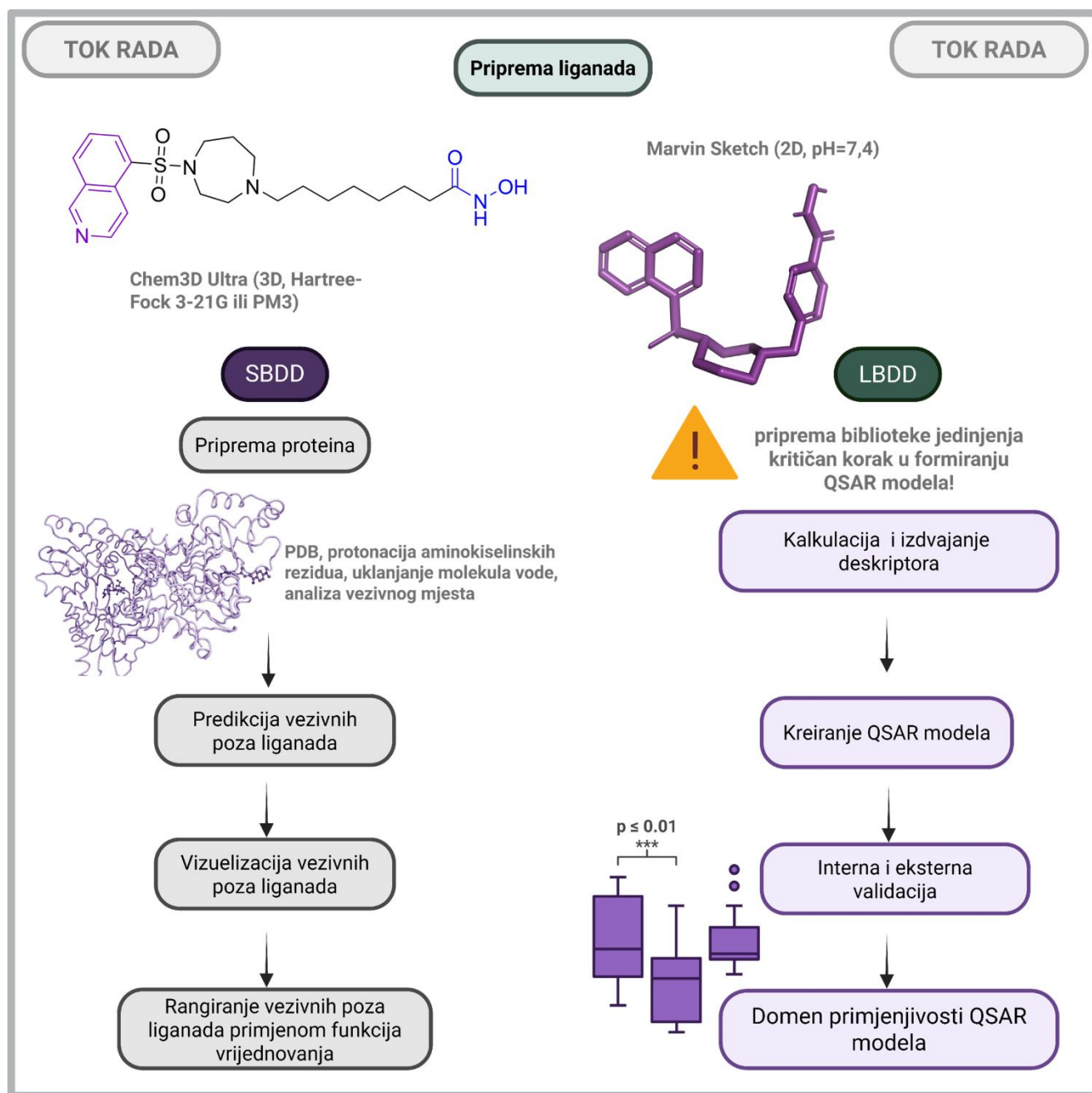
- Kompleksi proteina i liganda se preuzimaju iz odgovarajućih baza podataka, kao što je **PDB**.
- Priprema proteina uključuje detaljnu analizu strukture sa posebnim fokusom na vezivno mjesto. Ovaj korak podrazumijeva:
 - Dodavanje vodonikovih atoma
 - Uklanjanje molekula vode koji ne utiču na interakciju liganda sa proteinom.
 - Protonovanje aminokiselinskih ostataka pri fiziološkoj pH vrijednosti (**pH 7,4**).

2. Priprema liganda

- Optimizacija 3D strukture liganda se može sprovoditi primjenom različitih računarskih metoda, uključujući kvantno-mehaničke, semiempirijske i molekularno-mehaničke pristupe. Među kvantno-mehaničkim metodama, *Hartree-Fock* sa baznim skupom 3-21G omogućava aproksimaciju 3D elektronske strukture uzimajući u obzir interakcije između svih elektrona u sistemu, što ga čini računarski zahtjevnim, ali i preciznijim u odnosu na druge pristupe. Semiempirijske metode, poput PM3, predstavljaju kompromis između kvantnomehaničkih i molekularno-mehaničkih metoda, jer koriste pojednostavljene matematičke modele i empirijski određene parametre kako bi smanjile računarski trošak, uz zadržavanje zadovoljavajućeg nivoa tačnosti. Molekularno-mehaničke metode, poput OPLS4 i MMFFs, se zasnivaju na *force field* pristupu. Konformacione analize, koje spadaju u ovu grupu metoda, omogućavaju određivanje energetske najpovoljnije konformacije liganda kroz procjenu potencijalne energije različitih konformacija, pri čemu se u obzir uzimaju različiti faktori poput torzionih uglova, međuatomskih rastojanja i rotacija hemijskih veza. Stabilnije konformacije karakterišu niže vrijednosti ukupne energije. Metode poput OPLS4 su našle široku primjenu u *Schrödinger* softveru, gdje se koriste za optimizaciju geometrije liganda i proteina u kontekstu molekulskog dokinga i

dizajna lekova. U poređenju sa molekularno-mehaničkim metodama, kvantnomehanički pristupi pružaju detaljniji opis elektronske strukture i omogućavaju precizniju analizu hemijskih interakcija, ali su znatno računarski zahtevniji. Semiempirijske metode, poput PM3, predstavljaju balans između tačnosti i efikasnosti, što ih čini pogodnim za sisteme srednje veličine u kojima je potrebno uzeti u obzir elektronske efekte uz smanjenje računarskog opterećenja.

- Protonovanje liganda se vrši pri istim pH uslovima kao i za protein (fiziološki **pH 7,4**).
3. **Predikcija i vizuelizacija vezivnih poza liganda** - algoritmi molekulskog dokinga simuliraju moguće orijentacije i pozicije liganda unutar vezivnog mjesta ciljnog biomolekula.
4. **Evaluacija rezultata molekulskog dokinga**
- Analiziraju se vezivne pozicije liganda i interakcije koje stabilizuju kompleks makromolekul-ligand.
 - Funkcije vrijednovanja se koriste za kvantifikaciju energije vezivanja i rangiranje liganada na osnovu njihovog afiniteta prema ciljnom biomolekulu.



Slika 12. Šematski prikaz ključnih koraka molekuskog dokinga, kao najčešće primjenjivane metode SBDD pristupa, kao i 3D-QSAR analize, kao najčešće korišćene metode LBDD pristupa. *Created in <https://BioRender.com>*

Molekulski doking se može podijeliti na dvije osnovne vrste: **ligand-fleksibilni** i **protein-fleksibilni doking**, u zavisnosti od toga da li se tokom simulacija omogućava fleksibilnost liganda ili proteina [202].

Ključni cilj kod **ligand-fleksibilnog dokinga** je generisanje optimalne pozicije i konformacije liganda unutar vezivnog mjesta proteina. U tu svrhu se koriste tri vrste algoritama [212]:

1. Sistematični algoritmi

Ovi algoritmi se temelje na iscrpnom pretraživanju svih mogućih konformacija liganda, pri čemu se analiziraju svi stepeni slobode molekula [205]. Postoje tri glavna pristupa u okviru ove grupe algoritama:

- **Fragmentacioni pristup:** Molekul liganda se dijeli na manje fragmente, od kojih se prvi fragment pozicionira u vezivno mjesto proteina, a zatim se ostali fragmenti sukcesivno nadovezuju [213].
- **Pristup konformacionog ansambla (*database approach*):** Korišćenje prethodno generisanih konformacija liganda koje se zatim testiraju na kompatibilnost sa vezivnim mjestom proteina [214].
- **Tehnike konformacionog pretraživanja (*conformational search techniques*):** Generisanje velikog broja različitih konformacija liganda rotacijom svih mogućih rotabilnih veza.

Sistematični algoritmi se koriste u softverima kao što su **Glide**, **FRED**, **Surflex**, **FlexX**.

2. Stohastički algoritmi

Ovi algoritmi se zasnivaju na slučajnom generisanju konformacija liganda kroz nasumične promjene stepena slobode i strukture liganda [215]. Glavne metode uključuju:

- **Monte Carlo (MC)** simulacije.
- **Genetske algoritme:** Srž genetskih algoritama je inspirisana principima evolucije, uključujući prirodnu selekciju, ukrštanje i mutaciju. Genetski algoritam započinje generisanje nasumične početne populacije mogućih rješenja gdje je svako rješenje predstavljeno hromozomom – nizom podataka koji opisuju strukturu molekula. Svaki hromozom se zatim procjenjuje i hromozomi sa nižim energijama vezivanja se biraju za generisanje sledeće populacije, dok se ostali hromozomi odbacuju. Da bi se poboljšala raznolikost rješenja i spriječilo zaustavljanje u lokalnim energetske minimumima, koriste se operatori ukrštanja i mutacije – ukrštanje kombinuje djelove najboljih rješenja, dok mutacija uvodi manje slučajne promjene. Ovaj proces se ponavlja kroz više generacija, pri čemu se energetske povoljne konformacije postepeno selektuju, sve dok algoritam ne pronađe stabilnu konformaciju sa minimalnom energijom koja odgovara globalnom energetske minimumu [216].
- **Tabu metode** - koriste memoriju za izbjegavanje ponavljanja rješenja koja su prethodno odbačena na osnovu procijene kvaliteta vezivnog položaja liganda.
- **Metode optimizacije roja (*Swarm optimization*)** su inspirisane ponašanjem bioloških sistema, poput jata ptica.

Ova grupa algoritama se koristi u softverima poput **AutoDock** i **GOLD** koji su široko primjenjeni u akademskim i industrijskim istraživanjima.

3. Algoritmi zasnovani na komplementarnosti molekulskih površina

Ovi algoritmi pretpostavljaju da površine liganda i vezivnog mjesta proteina moraju biti komplementarne kako bi došlo do efikasnog vezivanja. Konformacije liganda se unaprijed

generišu i ostaju rigidne tokom procesa dokinga što smanjuje složenost simulacija. Ovi algoritmi su korisni za brze procjene, ali mogu smanjiti tačnost simulacija usled ograničene fleksibilnosti liganda [217].

Nakon predviđanja konformacije liganda unutar vezivnog mjesta proteina, procjena energije vezivanja ligand-makromolekul kompleksa se vrši primjenom funkcija vrijednovanja (*scoring functions*). Promjene energije vezivanja tokom formiranja kompleksa se analiziraju pomoću konstante vezivanja (K_d) i Gibbsove slobodne energije (ΔG) koje direktno zavise od niza faktora, uključujući međumolekulske interakcije, entropijske efekte i desolvataciju. Funkcije vrijednovanja imaju ključnu ulogu u procjeni kvaliteta vezivnih položaja liganda i predikciji afiniteta liganda ka ciljnom mjestu, a mogu se klasifikovati u pet glavnih kategorija:

1. **Funkcije vrijednovanja zasnovane na poljima sila** (*Force-field based scoring functions*): Ove funkcije uzimaju u obzir interakcije između liganda i proteina poput elektrostatičkih sila, *Van der Waalsovih* interakcija, vodoničnih veza, kao i energije istezanja, savijanja, torzionih promjena uglova veza. Osnovni nedostatak je zanemarivanje uticaja entropije i rastvarača na vezivanje [218].
2. **Empirijske funkcije vrijednovanja**: Bazirane su na eksperimentalnim podacima i regresionoj analizi koja uzima u obzir različite energije uključujući energiju hidrofobnih, jonskih interakcija i formiranja vodoničnih veza, promjenu entropije pri vezivanju i desolvataciju. Primjeri ovakvih funkcija su GlideScore, SCORE, ChemScore. Osnovni nedostatak je zavisnost ovih funkcija od kvaliteta ulaznih podataka [219].
3. **Funkcije vrijednovanja zasnovane na znanju**: Temelje se na statističkim analizama postojećih strukturnih podataka ligand-protein kompleksa [202]. Pretpostavka je da su učestalije interakcije između atoma i funkcionalnih grupa u kompleksima energetski povoljne što povećava vjerovatnoću njihove uloge u formiranju stabilnih veza. Primjeri ovakvih funkcija su DrugScore, PMF, GOLD/ASP.
4. **Funkcije vrijednovanja zasnovane na mašinskom učenju**: Primjenom metoda mašinskog učenja, kao što su regresione analize i klasifikacioni modeli, je omogućena predikcija vezivnog afiniteta liganda ka proteinu, kao i identifikacija liganada koji pokazuju aktivnost. Mašinsko učenje je značajno unaprijedilo tačnost predikcija integracijom velikih količina eksperimentalnih i simulacionih podataka [220].
5. **Konsenzus funkcije vrijednovanja**: Zasnivaju se na kombinovanju rezultata više funkcija vrijednovanja kako bi se minimizirala ograničenja pojedinačnih metoda i povećala pouzdanost predikcija. Primjeri ovih funkcija su: MultiScore, X-Cscore, GFScore, SCS, SeleX-CS i CONSENSUS-DOCK [221].

Validacija preciznosti doking simulacija i izabrane funkcije vrijednovanja predstavlja ključni korak u procjeni pouzdanosti rezultata. Validacija se zasniva na poređenju prostorne pozicije svakog heteroatoma ko-kristalnog liganda sa pozicijom ponovo dokovanog ko-kristalnog liganda. Ova procjena se kvantitativno izražava pomoću RMSD (Korijen srednjeg kvadratnog odstupanja atomskih pozicija, *Root Mean Square Deviation*) vrijednosti, koja predstavlja standardni parametar za procjenu odstupanja između eksperimentalno određene i simulirane vezivne poze liganda. Da bi se doking procedura smatrala validnom i metodološki prihvatljivom, RMSD vrijednost treba da bude manja od 2 Å (angstrema) [222]. Ovaj prag ukazuje na visoku preciznost simulacije i konzistentnost između predviđenih i stvarnih

strukturnih karakteristika liganda u vezivnom mjestu ciljnog proteina. Dodatno, nizak RMSD osigurava da su ključne intermolekulske interakcije pravilno rekapitulirane, čime se doprinosi pouzdanosti daljih analiza.

1.8.2. Dizajn zasnovan na strukturi liganda (*Ligand-Based Drug Design*, LBDD)

U situacijama kada 3D struktura ciljnog mjesta djelovanja nije poznata polazi se od **principa sličnosti** koji pretpostavlja da strukturno slična jedinjenja ispoljavaju sličan biološki odgovor i interakciju sa ciljnim mjestom. Ključni korak u LBDD pristupu jeste analiza serije jedinjenja sa poznatom biološkom aktivnošću, sa ciljem identifikacije strukturnih i fizičko-hemijskih karakteristika (molekulskih deskriptora) odgovornih za biološku aktivnost. Među najčešće korišćenim LBDD metodama ističu se **studije kvantitativnog odnosa između strukture i aktivnosti** (*Quantitative Structure-Activity Relationship study*, QSAR), **virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda** (*Ligand-Based Virtual Screening*, LBVS) i modelovanje farmakofore.

1.8.2.1. Studije kvantitativnog odnosa između strukture i aktivnosti (QSAR studije)

Studije kvantitativnog odnosa između strukture i aktivnosti (QSAR), u najširem smislu, se mogu opisati kao primjena različitih matematičkih i statističkih metoda s ciljem razvoja modela koji omogućavaju pouzdano predviđanje biološke aktivnosti (QSAR) ili osobine jedinjenja (*Quantitative structure-property relationship*, QSPR) na osnovu njihovih strukturnih karakteristika [223,224]. Svaki QSAR model se može matematički predstaviti sljedećom pojednostavljenom jednačinom:

$$P_i = k'(D_1, D_2, D_3, \dots, D_n) \quad (1)$$

Gdje P_i predstavlja odgovor koji se modelira (najčešće biološku aktivnost jedinjenja, osobinu jedinjenja ili toksičnost); $D_1, D_2, D_3, \dots, D_n$ su molekularni deskriptori koji kvantitativno opisuju strukturne ili fizičko-hemijske karakteristike jedinjenja, dok k' označava empirijski uspostavljenu matematičku transformaciju koja se primjenjuje na molekulske deskriptore kako bi se predvidjela biološka aktivnost jedinjenja [225].

Klasifikacija QSAR modela prema kompleksnosti podataka omogućava razlikovanje različitih pristupa zasnovanih na dimenzionalnosti podataka koji se analiziraju [226]:

- **2D-QSAR studije:** Razmatraju isključivo dvodimenzionalni oblik molekula zanemarujući konformaciju i prostorni raspored atoma.
- **3D-QSAR studije:** Uključuju konformaciju molekula i trodimenzionalni raspored atoma, što omogućava detaljniju analizu strukturnih karakteristika jedinjenja.
- **4D-QSAR studije:** Pored trodimenzionalnih karakteristika, razmatraju i konformaciju liganda nakon molekuskog dokinga dobijenu primjenom genetskih algoritama.
- **5D-QSAR studije:** Dodatno uključuju fleksibilnost proteina i uticaj solvatacionih efekata čime se povećava kompleksnost i tačnost predviđanja.
- **6D-QSAR studije:** Osim svih prethodno navedenih aspekata, u analizu integrišu i entropijske efekte, čime se postiže najviši nivo sofisticiranosti.

1.8.2.1.1. Mašinsko učenje u razvoju novih lijekova

Razvoj QSAR-a je započet primjenom linearne i višestruke linearne regresije koje predstavljaju tradicionalne metode statističke analize hemijskih podataka. Ove metode omogućavaju formiranje prediktivnih modela na osnovu strukturnih osobina molekula i njihove biološke aktivnosti [220]. Međutim, sa razvojem računarskih tehnologija i metoda mašinskog učenja, QSAR analize su postale sofisticiranije, što je dovelo do poboljšanja tačnosti i prediktivne moći QSAR modela.

Postoje brojne tehnike mašinskog učenja koje se mogu klasifikovati u četiri grupe:

- **Nadgledano mašinsko učenje** (*Supervised Learning*) predstavlja jednu od temeljnih tehnika u oblasti mašinskog učenja, pri kojoj se algoritmi obučavaju korišćenjem skupa podataka koji sadrže jasno definisane ulazno-izlazne parove. Cilj ovog pristupa jeste identifikacija i modelovanje odnosa između ulaznih varijabli i njihovih pripadajućih izlaza, čime se omogućava pouzdano predviđanje rezultata za nove, prethodno nepoznate podatke.
- **Nenadgledano mašinsko učenje** (*Unsupervised learning*) obuhvata analizu podataka bez prethodno definisanih oznaka (izlaznih varijabli), pri čemu algoritmi autonomno prepoznaju obrasce bez potrebe za ljudskom intervencijom, oslanjajući se isključivo na karakteristike samih podataka. Ovaj pristup se široko primjenjuje u identifikaciji latentnih struktura, ekstrakciji značajnih osobina, otkrivanju grupisanja u podacima, kao i u istraživačkim analizama. Ključni zadaci nenadgledanog učenja uključuju grupisanje (*clustering*), procjenu distribucije podataka, redukciju dimenzionalnosti i detekciju anomalija.
- **Polunadgledano mašinsko učenje** (*Semi-supervised learning*) predstavlja hibridni pristup koji se nalazi na spektru između nadgledanog i nenadgledanog učenja. Ova metoda kombinuje podatke sa unaprijed definisanim izlaznim vrijednostima, karakterističnim za nadgledano učenje, sa podacima bez oznaka, kao što je slučaj u nenadgledanom učenju. Cilj ovog pristupa je iskorišćavanje ograničene količine označenih podataka kako bi se poboljšala tačnost modela, pri čemu algoritam dodatno uči iz neoznačenih podataka, prepoznajući skrivene strukture i obrasce.
- **Pojačano mašinsko učenje** (*Reinforcement learning*) predstavlja pristup učenja zasnovan na interakciji inteligentnog softvera sa dinamičkim okruženjem. Softver donosi sekvencijalne odluke oslanjajući se na sistem nagrađivanja i kazne, pri čemu kroz sukcesivni proces učenja poboljšava svoje strategije na osnovu povratnih informacija iz dinamičkog okruženja. Ova metoda se široko koristi u oblastima poput autonomnih sistema, robotike, finansijskih modela i optimizacije složenih procesa, omogućavajući modelima da uče kroz iskustvo i prilagođavaju svoje akcije u realnom vremenu [228].

Mašinsko učenje ima značajnu ulogu u savremenom dizajnu lijekova, omogućavajući analizu velikih hemijskih biblioteka jedinjenja i otkrivanje kompleksnih nelinearnih odnosa između strukture i biološke aktivnosti molekula. Osnovni princip mašinskog učenja u QSAR modelovanju se zasniva se na sposobnosti računarskog sistema da napravi matematičke modele koji će kvantifikovati odnose između molekulskih deskriptora i eksperimentalno određenih aktivnosti jedinjenja korišćenjem nadgledanih tehnika mašinskog učenja (*supervised learning*), i to naprednih regresionih i klasifikacionih algoritama, koji poboljšavaju interpretaciju i predikciju rezultata. Među najznačajnijim algoritmima mašinskog učenja koji se primjenjuju u QSAR analizi izdvajaju se: **k-najbliži susedi** (*k-nearest neighbors*, k-NN), **linearna diskriminantna analiza** (*linear discriminant analysis*, LDA), **stabla odluke** (*decision trees*), **slučajne šume** (*random forest*), **vještačke neuronske mreže** (*artificial neural network*, ANN), **potporni vektorski strojevi** (*support vector machine*, SVM), **naivni Bayesovi modeli** [227,229]. Ovi algoritmi omogućavaju bolje prepoznavanje strukturnih karakteristika molekula koje utiču na njihovu biološku

aktivnost, čime značajno doprinose poboljšanju efikasnosti QSAR modelovanja u oblasti računarske hemije i dizajna lijekova.

Jedan od najčešće korišćenih algoritama mašinskog učenja je algoritam slučajnih šuma (*random forest*, RF). Ovaj algoritam pripada kategoriji ansambl metoda i temelji se na konstrukciji velikog broja stabala odlučivanja (*decision trees*), čime se poboljšava robusnost modela, smanjuje prekomjerno prilagođavanje (*overfitting*) i povećava tačnost predikcija u odnosu na modele zasnovane na pojedinačnim stablima odlučivanja [230].

RF algoritam je široko primjenjen u hemoinformatici i QSAR modelovanju zbog svojih brojnih prednosti:

- **Robusnost na prekomjerno prilagođavanje (*overfitting*).**
- **Otpornost na šum u podacima** – Pošto ne zavisi od pojedinačnih podataka, RF može efikasno raditi sa hemijskim skupovima podataka koji sadrže eksperimentalne greške ili nesigurnosti.
- **Automatska selekcija važnih varijabli** – RF pruža mogućnost rangiranja molekulskih deskriptora prema njihovom značaju u predikciji biološke aktivnosti, što olakšava interpretaciju.
- **Efikasnost u analizi nelinearnih odnosa** – Mnogi biološki procesi su nelinearni, a RF algoritam može uspješno modelovati složene interakcije između molekulskih osobina.
- **Interna validacija putem *out-of-bag* (OOB) uzoraka** – RF ne zahtjeva poseban skup podataka za validaciju, jer može koristiti podatke koji nisu uključeni u izgradnju pojedinačnih stabala za procjenu performansi modela.

1.8.2.1.2. Opšti koraci u sprovođenju QSAR studije

U okviru ove doktorske disertacije fokusiraćemo se na razvoj i analizu **2D-QSAR** i **3D-QSAR** modela. Tri ključna koraka u sprovođenju 2D i 3D-QSAR studije su (**Slika 12**):

1) Odabir podataka za QSAR analizu

Odabir i priprema podataka predstavljaju ključnu fazu u razvoju QSAR modela, jer pouzdanost, tačnost i preciznost razvijenog modela u velikoj mjeri zavise od kvaliteta ulaznih podataka [231,232]. U ovoj fazi je neophodno posvetiti posebnu pažnju sljedećim aspektima:

a) Strukture jedinjenja

- Hemijske strukture moraju biti normalizovane ili standardizovane pri čemu se na taj način optimizuju tačnost i pouzdanost molekulskih deskriptora. Strukture jedinjenja dodatno moraju biti detaljno provjerene i očišćene od svih duplikata, soli i neorganskih jedinjenja [231,232].
- Strukture treba da budu različite, ali i dovoljno slične da zadovolje osnovni princip sličnosti na kojem se temelje metode LBDD pristupa. Na ovaj način se obezbjeđuju pouzdanost modela i omogućava definisanje adekvatnog domena primjenjivosti.

- Optimalan broj podataka za kreiranje modela je ključan za postizanje upotrebljivih rezultata, pri čemu on zavisi od više različitih faktora poput upotrebljenih algoritama za kreiranje modela, broja i tipa korišćenih deskriptora, itd.

b) Biološka aktivnost

- Kritično je osigurati da su testovi korišćeni za određivanje biološke aktivnosti jedinjenja međusobno identični ili barem izvedeni u vrlo sličnim eksperimentalnim uslovima. Ovaj pristup minimizira eksperimentalnu grešku i osigurava konzistentnost podataka [233].
- Analiza biološke aktivnosti podrazumijeva analizu duplikata jedinjenja i *activity cliff* analizu.
- Razlika između dvije uzastopne vrijednosti biološke aktivnosti ne bi smjela prelaziti 0,3 logaritamske jedinice kako bi se izbjegle značajne nepravilnosti u ulaznim podacima.
- Opseg između najmanje i najveće biološke aktivnosti treba da iznosi najmanje 3 logaritamske jedinice kako bi podaci obuhvatili dovoljno širok spektar aktivnosti omogućavajući razvoj robusnog modela [224].

2) Priprema i analiza podataka za QSAR analizu

- a) **Generisanje podataka za 2D-QSAR modelovanje:** U cilju računanja 2D-deskriptora, koji se potom koriste za formiranje 2D-QSAR modela, najčešće se koriste:
- 2D-strukture jedinjenja koje se generišu u *MarvinSketch*-u, nakon čega se sačuvaju kao sdf. fajl.
 - SMILES oblici jedinjenja koji se prvobitno ekstrahuju iz baza podataka (ChEMBL, PubChem), a potom standardizuju (tzv. *Canonical smiles*).
- b) **Generisanje 3D struktura odabranog seta jedinjenja za 3D-QSAR modelovanje:** U cilju generisanja 3D konformacija jedinjenja inicijalno se skiciraju 3D strukture jedinjenja. Potom se 3D strukture dodatno geometrijski optimizuju čime se dobijaju optimalne konformacije sa minimumom energije. U cilju geometrijskih optimizacija se mogu primjeniti tri različite vrste metoda: a) **metode molekulske mehanike** čiji je osnovni nedostatak što zanemaruju kretanja elektrona, ali su brze i pogodne za velike molekule b) **metode kvantne mehanike** ili *ab initio* metode koje uzimaju u obzir i 3D raspored elektrona oko jezgra što ih čini vremenski zahtjevnim, ali daleko pouzdanijim od metoda molekulske mehanike c) **semi-empirijske metode** – predstavljaju kompromis između metoda kvantne i molekulske mehanike [224]. Generisane 3D strukture su dalje korišćene u studiji molekulskog dokinga u cilju dobijanja bioaktivnih konformacija odabranog seta jedinjenja koje su dalje korišćene za formiranje 3D-QSAR modela.
- c) **Podjela pripremljenih podataka na trening i test set:** Ova podjela se može izvršiti na različite načine zavisno od specifičnih ciljeva istraživanja i prirode podataka [234]:
- **Randomizovana raspodjela:** Podaci se nasumično dijele između trening i test seta. Ova metoda je jednostavna za implementaciju, ali može dovesti do neuravnotežene raspodjele u pogledu biološke aktivnosti ili molekulskih karakteristika.
 - **Raspodjela prema biološkoj aktivnosti:** Ova metoda osigurava da je raspodjela bioloških aktivnosti uniformna između trening i test seta. Maksimalna razlika između

dvije pojedinačne vrijednosti biološke aktivnosti unutar trening i test seta je ograničena na 0,3 logaritamske jedinice, čime se minimiziraju odstupanja koja bi mogla uticati na preciznost modela.

- **Raspodjela prema molekulskim deskriptorima:** Jedinjenja se inicijalno grupišu u klastere na osnovu strukturne sličnosti ili vrijednosti molekulskih deskriptora. Iz svakog klastera se jedinjenja proporcionalno raspodjeljuju između trening i test seta, čime se osigurava da su obje grupe reprezentativne za cijeli skup podataka.

Prilikom odabira metode podjele, neophodno je obezbijediti ravnotežu između raznolikosti i reprezentativnosti u trening i test setovima kako bi razvijeni model bio robustan.

d) Deskriptori za QSAR modelovanje

- **Računanje i izdvajanje 2D-deskriptora**

Najčešće primjenjivani 2D deskriptori u okviru QSAR modelovanja su:

- a) **Topološki deskriptori:** opisuju oblik, veličinu molekula kao i njegovu fleksibilnost, povezanost atoma u molekulu. U ovu grupu ubrajamo Kappa, Wienerov indeks, molekulski indeks konektiviteta, itd. TPSA deskriptor (*Topological polar surface area descriptor*, TPSA) je jedan od najčešće korišćenih topoloških deskriptora. TPSA omogućava kvantifikaciju polarnih interakcija značajnih za vezivanje molekula za aktivno mjesto isključivo na osnovu 2D strukture molekula [235,236].
- b) **Izračunati fizičko-hemijski deskriptori:** logP, pKa vrijednost, tačka topljenja i ključanja, molarna refraktivnost ukazuju na lificipofilnost, rastvorljivost, volumen molekula, itd [237].
- c) **Dodatni molekulski deskriptori:** deskriptori hiralnosti, autokorelacioni deskriptori i atomski ponderisani vektori omogućavaju precizniju karakterizaciju molekula uzimajući u obzir njihovu hiralnost, elektronske interakcije i strukturne specifičnosti koje nisu adekvatno opisane konvencionalnim topološkim parametrima [238–240]. Njihova primjena je manje rasprostranjena u odnosu na klasične topološke i fizičko-hemijske deskriptore, djelom zbog veće računarske zahtevnosti i kompleksnosti interpretacije u kvantitativnim modelima odnosa strukture i aktivnosti.

Različiti softveri mogu biti korišćeni u cilju računanja 2D deskriptora poput: RdKit, Dragon, PaDEL, itd [241–243].

- **Računanja i izdvajanje 3D-deskriptora**

U cilju računanja i izdvajanja 3D deskriptora koji najbolje korelišu sa biološkom aktivnošću jedinjenja moguće je primjeniti različite analize poput: Komparativne analize molekulskih polja (*Comparative Molecular Field Analysis*, CoMFA); Komparativne analize pokazatelja molekulske sličnosti (*Comparative Molecular Similarity Index Analysis*, CoMSIA), GRIND analize (*Grid-Independent Descriptors Analysis*), itd. CoMFA je najstarija i najčešće korišćena metoda za računanje **3D-deskriptora**, a njena osnovna ideja se zasniva na definisanju **molekulskih polja interakcije** (*Molecular Interaction Field*, MIF) [244]. MIF predstavljaju energetske parametre koji opisuju sterne i elektrostatičke interakcije privlačenja i odbijanja između 3D struktura jedinjenja i odgovarajućih hemijskih proba. Najčešće četiri vrste korišćenih proba su: **TIP probe** kojima se procjenjuju sterne interakcije i oblik jedinjenja; **DRY probe** kojima se opisuju hidrofobne interakcije; **O proba** (karbonilni kiseonik) i **N1 proba** (amidni azot) koje simuliraju akceptora i donora vodoničnih veza. Iako je CoMFA

široko primjenjivana, njen osnovni nedostatak leži u velikoj zavisnosti od **poravnanja jedinjenja**. Neadekvatno poravnanje može značajno uticati na validnost i prediktivnu moć QSAR modela, što predstavlja ograničenje u primjeni ove metode. Nasuprot CoMFA analizi, **GRIND (Grid-Independent Descriptors)** metodologija je nezavisna od poravnanja jedinjenja što je čini znatno pouzdanijom za razvoj QSAR modela [245]. Slično CoMFA-i, GRIND se oslanja na izračunavanje molekulskih polja interakcije, pri čemu se najznačajnija polja interakcije izdvajaju korišćenjem naprednih algoritama [245]. Potom se vrši transformacija izdvojenih MIF u deskriptore nezavisne od poravnanja primjenom različitih algoritama poput **CLACC (Consistently Large Auto and Cross Correlation)**. CLACC koristi prozor za izgladivanje kako bi generisao varijable koje precizno koreliraju sa biološkom aktivnošću jedinjenja čime se postiže robusnija analiza u odnosu na klasične metode [245].

3) Kreiranje 2D-QSAR i 3D-QSAR modela

U cilju povezivanja izračunatih nezavisnih varijabli (2D i 3D deskriptora) i zavisnih varijabli (bioloških aktivnosti) vrši se formiranje 2D i 3D-QSAR modela pomoću različitih statističkih metoda: a) **metoda najmanjih kvadata (Partial least squares, PLS)** b) **višestruka linearna regresija (Multiple linear regression, MLR)**, **analiza glavnih komponenti (Principal component analysis, PCA)** i različite tehnike mašinskog učenja kao što je npr. **analiza slučajnih šuma (Random Forest Regression, RF)** [246].

4) Interna i eksterna validacija 2D-QSAR i 3D-QSAR modela

Validacija QSAR modela predstavlja ključni korak u osiguravanju njegove pouzdanosti, prediktivnosti i primjenljivosti za predviđanje biološke aktivnosti novih, netestiranih jedinjenja. Ovaj proces omogućava procjenu kvaliteta modela na više nivoa, uključujući njegovu sposobnost da adekvatno opisuje podatke iz trening seta, precizno predviđa svojstva nepoznatih jedinjenja, kao i procjenu kvaliteta svih prethodno spomenutih koraka primjenjenih u cilju formiranja modela. Bez validacije, čak i modeli sa visokim koeficijentima determinacije mogu biti nepouzdana zbog potencijalnog prekomjernog fitovanja (*overfitting*).

Interna validacija

Interna validacija procjenjuje sposobnost QSAR modela da replicira rezultate unutar trening seta. Među najvažnijim parametrima interne validacije se nalaze koeficijent determinacije (R^2), koji mjeri kvalitet fitovanja modela odnosno koliko dobro model reprodukuje podatke, i Q^2 (prediktivni koeficijent unakrsne validacije), koji procjenjuje prediktivnu sposobnost modela [223,247].

Najčešće korišćena tehnika interne validacije je **"leave-one-out" (LOO)** unakrsna validacija. Ova metoda podrazumijeva uklanjanje jednog jedinjenja iz trening seta, formiranje modela na osnovu preostalih jedinjenja i predviđanje aktivnosti izostavljenog jedinjenja. Postupak se ponavlja za svako jedinjenje iz trening seta, čime se osigurava potpuna procjena modela. Na osnovu LOO tehnike, računa se suma kvadata predviđenih PRESS (*Predicted residual sum of squares*, PRESS), koji predstavlja sumu kvadrata razlika između eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti. Dalje, koristeći PRESS, izračunavaju se Q^2 i greška predvišanja trening seta (*Root mean square error*, RMSE), ključni indikatori prediktivnih performansi modela za trening set (**Tabela 3**) [223,225,248]. Iako je LOO tehnika široko primjenjena zbog svoje jednostavnosti, osnovni nedostak je opasnost od prekomjernog fitovanja. U cilju smanjenja ovog rizika, predložene su alternativne metode poput **"leave-many-out" (LMO)** ili **"leave-**

some-out" (LSO) validacije, gdje se istovremeno izostavlja veći broj jedinjenja iz trening seta. Ove metode omogućavaju rigorozniju procjenu modela i smanjuju rizik prekomjernog optimizovanja parametara.

U metodama mašinskog učenja, posebno kod ansambl tehnika poput **slučajnih šuma** (*Random Forest*), ključni parameter interne validacije je "out-of-bag" (OOB) greška koja se koristi kao zamjena za klasičnu unakrsnu validaciju. Ovaj parametar omogućava internu procjenu tačnosti modela bez potrebe za zasebnim skupom podataka [249].

Prilikom treniranja modela, svako stablo u nasumičnoj šumi se gradi korišćenjem *bootstrap* uzorkovanja, pri čemu se otprilike 2/3 podataka nasumično bira za treniranje, dok preostala 1/3 jedinjenja nije uključena u izgradnju stabla. Ova neiskorišćena jedinjenja predstavljaju OOB skup, koji se zatim koristi za nezavisnu procjenu performansi modela. Model predviđa aktivnost za svako jedinjenje koje nije bilo uključeno u treniranje odgovarajućih stabala, a potom se na osnovu odstupanja između predviđenih i stvarnih vrijednosti određuje OOB greška kao jedan od bitnih parametara interne validacije [249].

Eksterna validacija

Eksterna validacija, koja se često naziva "zlatnim standardom" u procjeni prediktivnih sposobnosti QSAR modela, se zasniva na testiranju modela na skupu podataka koji nije korišćen tokom njegovog razvoja (jedinjenja iz test seta). Eksterna validacija osigurava da model nije preprilagođen (*overfitted*) na trening set i da može pružiti pouzdane predikcije za nova jedinjenja [223].

Sljedeći parametri se koriste za eksternu validaciju (**Tabela 3**):

- R^2_{pred} – koeficijent determinacije za test set, koji ukazuje na sposobnost modela da predvidi aktivnosti jedinjenja koja nisu korišćena za kreiranje modela.
- **RMSEP** (*Root Mean Square Error of Prediction*) – metrički pokazatelj koji procjenjuje grešku predviđanja za jedinjenja iz test seta. Niže vrijednosti RMSEP ukazuju na bolje performanse modela.
- r^2_m – metrički pokazatelj koji integriše tačnost predikcije i robusnost modela. Vrijednosti r^2_m i r'^2_m treba da budu bliske jedna drugoj i veće od 0,5 kako bi se model smatrao pouzdanim [250].
- Δr^2_m – razlika između r^2_m i r'^2_m , treba biti manja od 0,2. Ova razlika ukazuje na konzistentnost prediktivnih performansi modela [250].

Integracija rezultata interne i eksterne validacije omogućava sveobuhvatnu procjenu kvaliteta QSAR modela, osiguravajući da razvijeni model zadovoljava visoke standarde naučne rigoroznosti i praktične primjene.

Tabela 3. Parametri za internu i eksternu validaciju QSAR modela

Parametar	Formula	Napomena	Zahtjev
Interna validacija			
Koeficijent determinacije R²	$R^2 = \frac{\sum(\hat{Y}_{\text{training}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2}{\sum(Y_{\text{training}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2}$	Y_{training} – eksperimentalne pIC ₅₀ vrijednosti; $\hat{Y}_{\text{training}}$ – predviđene pIC ₅₀ vrijednosti $\bar{Y}_{\text{training}}$ – srednja eksperimentalna pIC ₅₀ vrijednost jedinjenja iz trening seta	>0,9
Rezidualna suma kvadrata PRESS	$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2$	e – razlika između stvarnih i predviđenih vrijednosti LOO tehnikom n – broj jedinjenja u trening setu	
Unakrsno validirani koeficijent determinacije Q²_{LOO}	$Q^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{\sum(Y_{\text{training}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2}$	Y_{training} – eksperimentalne pIC ₅₀ vrijednosti; $\hat{Y}_{\text{training}}$ – srednja eksperimentalna pIC ₅₀ vrijednost jedinjenja iz trening seta	>0,5
Greška predviđanja modela (trening set) RMSEE	$\text{RMSEE} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n}}$	n – broj jedinjenja trening seta	
Eksterna validacija			
Koeficijent determinacije za test set Predikcioni R²	$R^2_{\text{pred}} = 1 - \frac{\sum(Y_{\text{test}} - \hat{Y}_{\text{test}})^2}{\sum(Y_{\text{test}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2}$	Y_{test} – eksperimentalne pIC ₅₀ vrijednosti; $\hat{Y}_{\text{test}}$ – predviđene pIC ₅₀ vrijednosti; $\bar{Y}_{\text{training}}$ – srednja eksperimentalna pIC ₅₀ vrijednost jedinjenja iz trening seta	>0,7
Greška predviđanja modela (test set) RMSEP	$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n}}$	n – broj jedinjenja test seta	
r_m² metrika	$r_m^2 = r^2(1 - \sqrt{r^2 - r_0^2})$	r² i r₀² su koeficijenti determinacije izračunati za korelaciju između eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti za test set jedinjenja.	>0,5

r_m^2 metrika	$r_m^2 = r^2(1 - \sqrt{r^2 - r_0^2})$	r_0^2 je kvadratni korelacioni koeficijent između predviđenih i eksperimentalnih vrijednosti
-----------------	---------------------------------------	--

5) Domen primjenljivosti 2D-QSAR i 3D-QSAR modela

Nakon validacije, neophodno je odrediti domen primjenljivosti (*Applicability domain*, AD) 2D i 3D-QSAR modela koji definiše fizičko-hemijski, strukturni ili biološki prostor u kojem se očekuje da predviđanja modela budu pouzdana i validna. Drugim riječima, formirani 2D i 3D-QSAR modeli nisu univerzalni i ne mogu se primjenjivati na beskonačan broj različitih hemijskih entiteta. Njihova pouzdanost je ograničena na predviđanje aktivnosti jedinjenja koja posjeduju fizičko-hemijske ili strukturne karakteristike slične jedinjenjima korišćenim za razvoj modela (trening set) [251,252].

Granice hemijskog prostora u okviru kojih model zadržava validnost su određene svojstvima jedinjenja iz trening seta. Predviđanja za jedinjenja koja izlaze van ovih granica su često nepouzdana i podložna značajnim greškama. Na primjer, krajnje pojednostavljeno objašnjenje bi bilo sljedeće: ukoliko model obuhvata jedinjenja sa malim molekulskim masama i jednostavnim funkcionalnim grupama, previđanje aktivnosti složenih molekula biće nepouzdan.

Za određivanje domena primjenljivosti QSAR modela je razvijen širok spektar metoda, uključujući [252]:

- metode zasnovane na opsegju vrijednosti (*range-based methods*),
- geometrijske metode (*geometrical-based methods*),
- metode bazirane na udaljenosti (*distance-based methods*),
- metode zasnovane na sličnosti (*similarity-based methods*),
- metode zasnovane na fragmentima (*fragment-based methods*),
- funkcije gustine vjerovatnoće (*probability-density functions*).

U okviru ove doktorske disertacije, za definisanje domena primjenljivosti je korišćena jedna od metoda baziranih na udaljenosti, poznata kao *leverage* metoda (*leverage method*). Ova metoda predstavlja jednu od najčešće korišćenih u QSAR analizi, jer kvantifikuje uticaj koji pojedinačno jedinjenje iz trening seta ima na formiranje modela. *Leverage* se računa na osnovu “udaljenosti” hemijskog jedinjenja od eksperimentalnog prostora modela, definisanog deskriptorima jedinjenja iz trening seta [251,253]. Jedinjenja sa niskim vrijednostima *leverage*-a imaju minimalan uticaj na izgradnju modela, dok jedinjenja sa visokim *leverage* vrijednostima doprinose njegovom razvoju, šireći hemijski prostor koji model može efikasno da pokrije. Na primjer, jedinjenje sa rijetkom ili jedinstvenom funkcionalnom grupom može imati visok *leverage*, jer unosi nove informacije koje nisu zastupljene kod drugih jedinjenja u trening setu [254].

Dodatno, *leverage* pristupom se procjenjuje pouzdanost predikcija formiranog modela za jedinjenja iz test seta. h^* je granična vrijednost definisana kao:

$$h^* = 3p/n$$

pri čemu je **p** broj korišćenih deskriptora modela uvećan za jedan, a **n** broj jedinjenja u trening setu. Jedinjenja iz test seta za koja važi da je $h > h^*$ se smatraju hemijski različitim od jedinjenja iz trening seta i, prema tome, van domena primjenljivosti. Na primjer, ako QSAR model uključuje deskriptore povezane sa hidrofilnošću, jedinjenje iz test seta koje pokazuje izrazito hidrofobne karakteristike može imati $h > h^*$ što ukazuje na njegovu udaljenost od trening seta i potencijalno nepouzdanu predikciju [252].

Za grafički prikaz domena primjenljivosti QSAR modela koristi se *Williamsov* grafikon. Ovaj alat pruža vizuelno jasnu identifikaciju jedinjenja koja su:

1. **Odmjetnici u odgovoru** – jedinjenja sa standardizovanim rezidualima $R > 3\sigma$, gdje je σ standardna devijacija.
2. **Strukturno različita** – jedinjenja sa $h > h^*$.

Kombinovana analiza ovih faktora omogućava preciznu identifikaciju nepouzdatih predikcija. Na primjer, *Williamsov* grafikon može ukazati na jedinjenje iz test seta koje ima visok rezidual i vrijednost $h > h^*$, što sugerise da je jedinjenje strukturno različito i prediktivno nepouzdanu [252].

6) Dostupnost QSAR modela

Prema najboljim praksama za izvještavanje o QSAR modelima, danas se modeli i pripadajući skupovi podataka najčešće pohranjuju na javno dostupnim *online* platformama poput **GitHuba** ili specijalizovanim repozitorijumima namjenjenim djeljenju naučnih podataka [255]. Jedan od najznačajnijih repozitorijuma za QSAR/QSPR modele je **QsarDB**, koji omogućava digitalnu organizaciju, arhiviranje i citiranje QSAR modela i podataka [256].

QsarDB je pametni repozitorijum koji je dizajniran sa ciljem podržavanja transparentnosti i replikabilnosti QSAR istraživanja, pružajući korisnicima mogućnost jednostavnog otkrivanja, pretrage i ponovne upotrebe modela. Ključna prednost ovog repozitorijuma jeste mogućnost dodjeljivanja identifikatora digitalnog objekta (*Digital Object Identifier*, DOI), čime se obezbjeđuje trajna dostupnost i referenciranje modela u naučnoj literaturi.

U okviru ove disertacije, razvijeni regresioni modeli *Random Forest* mašinskog učenja biće pohranjeni u QsarDB repozitorijumu, čime će biti omogućena njihova besplatna dostupnost naučnoj zajednici. Pohranjivanje modela na ovaj način omogućava *in silico* predviđanje biološke aktivnosti za nove, dizajnirane molekule, čime se doprinosi daljoj primjeni QSAR modelovanja u dizajnu lijekova. Svi podaci i modeli predstavljeni u ovoj disertaciji biće dostupni za preuzimanje i korišćenje, čime se podstiče otvorena nauka i dalji razvoj računarskih metoda u kompjuterskoj hemiji.

1.8.3. Razvoj novih lijekova: od visokopropusnog do virtuelnog skrininga

Dugi niz godina visokopropusni skrining (HTS, *High-Throughput Screening*) je predstavljao najkorišćeniju metodu za otkrivanje novih lijekova. Ova tehnika je uključivala *in vitro* testiranje velikih biblioteka hemijskih supstanci na specifičnom biološkom supstratu sa ciljem identifikacije jedinjenja koje pokazuje biološku aktivnost prema datom ciljnom mjestu, tzv. *hit* jedinjenje. Iako je HTS omogućio značajne iskorake u oblasti farmaceutskih istraživanja, njegova primjena nosi značajne izazove, prije svega u pogledu troškova i resursa. Na primjer, sprovođenje HTS-a zahtijeva sofisticiranu opremu, velike

količine reagenasa i visoko obučeno osoblje, što kumulativno rezultira visokim finansijskim i vremenskim opterećenjem [211]. Ovi izazovi postaju još izraženiji kod identifikacije *multi-target* liganada. U ovom slučaju, HTS bi podrazumijevao testiranje svake supstance iz biblioteke na više različitih ciljnih molekula, što eksponencijalno povećava vrijeme, resurse i troškove istraživanja.

Razvojem CADD tehnologija dizajna lijekova tradicionalni HTS sve češće ustupa mjesto efikasnijim i ekonomičnijim alternativama poput virtuelnog skrininga (*Virtual Screening*, VS). Prvi uspješan primjer primjene virtuelnog skrininga u otkrivanju novih lijekova je zabilježen 80-ih godina, kada je primjenom VS identifikovan novi dopamine D2-R agonista [257,258]. Ovaj događaj je označio početak revolucije i modernu eru u razvoju lijekova. S druge strane, termin virtuelni skrining jer prvi put, kao takav, spomenut 1997. godine [223]. Virtuelni skrining se zasniva na korišćenju kompjuterskih tehnika u cilju identifikacije *hit* jedinjenja. Današnji softveri omogućavaju skrining biblioteka od po nekoliko miliona jedinjenja u svega nekoliko sati što ističe osnovnu prednost VS u odnosu na HTS – ušteda vremenskih i novčanih resursa [258].

U zavisnosti od tipa dostupnih podataka, koriste se dvije osnovne tehnike VS:

- 3) **Virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda** (*Ligand-Based Virtual Screening*, LBVS)
- 4) **Virtuelni skrining zasnovan na strukturi ciljnog mjesta** (*Structure-Based Virtual Screening*, SBVS)[191]

1.8.3.1. Virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda

Ukoliko struktura ciljnog mjesta nije poznata, primjena virtuelnog skrininga zasnovanog na strukturi liganda se može ostvariti pod uslovom da je poznata struktura najmanje jednog liganda koji pokazuje aktivnost prema odgovarajućem biološkom cilju. LBVS se oslanja na pretpostavku da molekuli slične strukture često dijele slične biološke aktivnosti, što omogućava identifikaciju potencijalno aktivnih jedinjenja unutar velikih hemijskih biblioteka.

LBVS uključuje nekoliko komplementarnih pristupa:

1. **Pristup baziran na strukturi farmakofore** (*pharmacophore-based approach*):

Farmakofora se definiše kao prostorni raspored ključnih funkcionalnih grupa unutar molekula koje su odgovorne za njegovu interakciju sa ciljnim mjestom dejstva. Ovaj pristup omogućava identifikaciju potencijalno aktivnih jedinjenja na osnovu njihovih zajedničkih farmakofornih karakteristika, bez potrebe za poznavanjem trodimenzionalne strukture biološkog targeta. Za sprovođenje ovog pristupa je neophodno da bude dostupno više aktivnih molekula, jer se kombinacija njihovih zajedničkih osobina može koristiti za generisanje farmakofore koja preciznije opisuje ključne strukturne elemente odgovorne za aktivnost [260]. Dva ključna koraka u sprovođenju ovog pristupa uključuju:

- a) **Generisanje farmakofore**: Zasniva se na identifikaciji ključnih funkcionalnih grupa i njihovih prostorno-geometrijskih odnosa u aktivnim molekulima. Različiti softverski alati se koriste u ovoj fazi, uključujući:
 - **LigandScout**: Specijalizovan za vizualizaciju farmakofora iz kristalnih struktura liganda vezanih za receptor.
 - **MOE (Molecular Operating Environment)**: Omogućava modelovanje farmakofora i njihovu optimizaciju.
 - **PHASE**: Softver razvijen za farmakofornu analizu u okviru velikih hemijskih biblioteka.

- **GASP i DISCO:** Alati za usklađivanje i identifikaciju zajedničkih farmakofora.
- **HipHop i HypoGen:** pristupi generisanju farmakofora zasnovani na hipotezama i optimizaciji [258].

b) Skrining biblioteke jedinjenja prema generisanoj farmakofori: Generisana farmakofora se koristi za virtuelni skrining biblioteke jedinjenja kako bi se identifikovali molekuli koji zadovoljavaju definisane farmakoforne kriterijume. Softverski alati brzo analiziraju stotine hiljada ili čak miliona jedinjenja izdvajajući ona sa najvećim potencijalom za biološku aktivnost.

2. Pristup baziran na sličnosti (*similarity-based approach*)

Fundamentalna ideja koja stoji u osnovi pristupa baziranog na sličnosti je formulisana od strane naučnika *Johnsona* i *Maggiore* 1990. godine. Njihov koncept, poznat kao "princip sličnosti", se zasniva na pretpostavci da strukturno slična jedinjenja često dijele slične fizičko-hemijske osobine i biološke aktivnosti. Prema ovom principu, očekuje se da jedinjenja koja su strukturno slična vodećem aktivnom molekulu (poznatom i kao referentni ligand) ispoljavaju sličnu biološku aktivnost na ciljnom mjestu. Za primjenu ovog pristupa je dovoljna identifikacija jednog poznatog aktivnog molekula, koji služi kao referentni ligand, i odgovarajuće baze hemijskih jedinjenja. Pristup baziran na sličnosti omogućava virtuelni skrining velikih hemijskih biblioteka u cilju identifikacije potencijalnih analoga poznatih lijekova, što ga čini široko primjenjivim u savremenim istraživanjima lijekova. Najjednostavnija forma ovog pristupa koja se primjenjuje je **substrukturni skrining** – bazira se na sličnostima u 2D strukturi. Ključni koraci u sprovođenju pristupa baziranog na sličnosti su:

- Izbor referentnog liganda i baze jedinjenja:** Referentni ligand predstavlja polaznu tačku za analizu. Njegova struktura služi za poređenje sa jedinjenjima iz baze podataka. Baze jedinjenja može sadržati molekule iz komercijalnih hemijskih biblioteka ili prirodnih izvora.
- Definisanje molekulskih deskriptora:** Molekulski deskriptori su numeričke reprezentacije molekula koje kvantifikuju različite aspekte njihove strukture i fizičko-hemijskih svojstava. Najčešće korišćeni deskriptori u pristupu baziranom na sličnosti danas uključuju **molekulske otiske** (*fingerprints*) - binarni deskriptori koji predstavljaju prisustvo (1) ili odsustvo (0) specifičnih strukturnih karakteristika, kao što su funkcionalne grupe, prstenovi ili vezivne relacije.
- Izbor metrika sličnosti:** Koriste se za kvantifikaciju stepena strukturne sličnosti između referentnog liganda i jedinjenja iz baze. Među najčešće korišćenim metrikama je **Tanimotov indeks**, koji izražava stepen zajedničkih strukturnih elemenata u odnosu na ukupan broj karakteristika prisutnih u dva molekula. Vrijednost *Tanimoto*-vog indeksa se kreće od 0 (bez sličnosti) do 1 (potpuna sličnost). Uobičajena granična vrijednost *Tanimoto*-vog indeksa je 0,75-0,85.

3. Pristup baziran na metodama mašinskog učenja (*machine learning-based approach*):

Napredak u mašinskom učenju je omogućio integraciju ovih tehnika u LBVS. Modeli se obučavaju na osnovu dostupnih podataka o aktivnim i neaktivnim molekulima kako bi predvidjeli potencijalnu aktivnost novih jedinjenja. Algoritmi poput neuronskih mreža, potpornih vektora (*Support Vector Machines*, SVM) i dubokog učenja (*deep learning*, DL) se često koriste u ovoj oblasti.

Kombinacija ovih pristupa omogućava da se LBVS prilagodi specifičnim potrebama istraživanja, pružajući efikasne alate za pretraživanje hemijskih biblioteka i identifikaciju potencijalnih *hit* jedinjenja. Prednosti LBVS pristupa uključuju njegovu jednostavnost, relativno niske troškove i široku primjenljivost u raznim fazama istraživanja lijekova. Međutim, njegova uspješnost zavisi od kvaliteta ulaznih podataka. Potencijalno ograničenje je i mogućnost da strukturno slična jedinjenja ne dijele uvijek istu biološku aktivnost, što može dovesti do pogrešnih predikcija.

1.8.3.2. Virtuelni skrining zasnovan na strukturi ciljnog mjesta

Kada je poznata trodimenzionalna struktura ciljnog mjesta, primjenjuje se virtuelni skrining zasnovan na strukturi ciljnog mjesta (SBVS). Ovaj pristup omogućava direktno modelovanje interakcija između liganda i ciljnog mjesta, čime se identifikuju potencijalno aktivna jedinjenja.

Najčešće korišćena metoda u okviru SBVS je virtuelni skrining baziran na dokingu (*Docking-Based Virtual Screening*, DBVS). Doking simulira proces vezivanja liganda za ciljno mjesto, predviđajući optimalnu orijentaciju, poziciju i energiju vezivanja molekula.

Ključni koraci u sprovođenju DBVS su:

1. **Priprema proteina (ciljnog mjesta)**
2. **Priprema biblioteke jedinjenja**
3. **Sprovođenje doking studije**
4. **Vizuelizacija poza i izračunavanje funkcija vrijednovanja**
5. **Rangiranje jedinjenja**

Detaljna objašnjenja svakog navedenog koraka se mogu pronaći u **Poglavlju 1.9.1.1.**, gdje su opisane specifične metode i alati koji se koriste u molekulskom dokingu.

1.9. HDAC i ROCK enzimski testovi kao ključni korak u validaciji dualnih inhibitora

Sprovođenje HDAC i ROCK enzimskih testova predstavlja fundamentalan korak u istraživanju inhibitora koji djeluju na jedno ili više ciljnih mjesta. Ovi testovi omogućavaju eksperimentalnu validaciju rezultata dobijenih *in silico* studijama koje su fokusirane na dizajn jedinjenja sposobnih za simultano djelovanje na određene ciljne molekule. Primjena enzimskih testova pruža kvantitativne podatke o inhibiciji ciljnih enzima, što je ključno za procjenu efikasnosti i selektivnosti testiranih jedinjenja.

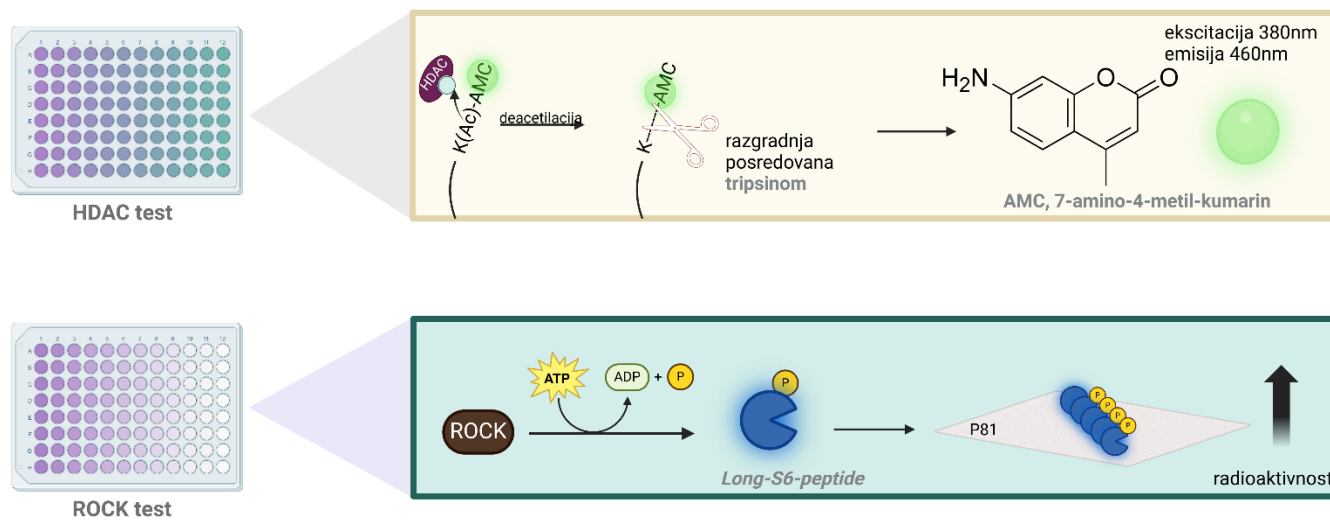
Fluorescentni test za ispitivanje HDAC aktivnosti

Za određivanje efekata na različite HDAC izoforme i nuklearne ekstrakte korišćen je fluorescentni test koji se zasniva na primjeni specifičnog peptida, **K-Ac-AMC** [261]. Ovaj peptid sadrži acetilovanu lizinsku grupu (K-Ac) povezanu sa fluoroforom AMC (7-amino-4-metilkumarin), čime omogućava detekciju aktivnosti HDAC enzima kroz sljedeće faze [262]:

1. **Deacetilacija peptida:** U prisustvu HDAC enzima, acetil grupa sa lizinskog ostatka peptida se uklanja (**Slika 13**).

2. **Razgradnja peptida:** Deacetilovani oblik peptida se razgrađuje u prisustvu tripsina, oslobađajući AMC fluoroforu (**Slika 13**).
3. **Mjerenje fluorescencije:** Oslobođena AMC fluorofora emituje fluorescenciju na talasnoj dužini od 460 nm, što omogućava kvantifikaciju HDAC aktivnosti (**Slika 13**).

U prisustvu HDAC inhibitora, K-Ac-AMC peptid ostaje acetilovan, čime se sprječava njegova deacetilacija i razgradnja od strane tripsina. Kao rezultat, oslobađanje AMC fluorofore izostaje, što dovodi do značajnog smanjenja ili potpunog gubitka fluorescentnog signala [261].



Slika 13. Šematski prikaz enzimskih testova za ispitivanje HDAC i ROCK aktivnosti. *Created in <https://BioRender.com>*

Radioaktivni test za ispitivanje ROCK aktivnosti

Radioaktivni test za ispitivanje ROCK aktivnosti je zasnovan na fosforilaciji specifičnog supstrata, **Long S6 Kinase peptida**, uz korišćenje radioaktivno obilježenog ^{33}P -ATP kao donora fosfata [263].

Protokol datog testa uključuje sljedeće ključne korake:

1. **Reakcija fosforilacije:** U odsustvu inhibitora, ROCK kinaze katalizuju prenos fosfatne grupe sa ^{33}P -ATP na *Long S6 Kinase* peptid (**Slika 13**).
2. **Detekcija fosforilacije:** Fosforilisani peptidi se vežu za P81 fosfocelulozne filtere, dok se neinkorporirani radioaktivni ATP uklanja pranjem filtera (**Slika 13**).
3. **Mjerenje radioaktivnosti:** Radioaktivnost zadržana na filterima se mjeri kao direktan pokazatelj aktivnosti ROCK kinaza.

U prisustvu inhibitora, fosforilacija peptida se smanjuje usled inaktivacije ROCK enzima, što rezultira smanjenjem ili izostankom radioaktivnosti filtera [263].

1.10. Biološki modeli za evaluaciju aktivnosti HDAC/ROCK *multitarget* inhibitora

U evaluaciji antitumorskih efekata novih jedinjenja se mogu primijeniti kako dvodimenzionalni (2D) tako i trodimenzionalni (3D) tumorski modeli. Tradicionalni 2D tumorski modeli, koji su razvijeni još krajem 19. vijeka, predstavljaju najčešće korišćene *in vitro* sisteme za ispitivanje citotoksične aktivnosti novih antitumorskih agenasa. Njihova široka primjena je zasnovana na metodološkoj jednostavnosti, visokoj reproduktivnosti i finansijskoj isplativosti. Međutim, osnovni nedostatak 2D modela se ogleda u njihovoj nemogućnosti da adekvatno oponašaju kompleksnu arhitekturu solidnih tumora, ćelijsko-matriksne interakcije, kao i ključne mehanizme rezistencije na hemioterapeutike. Posljedica ovih ograničenja jeste visok procenat lažno pozitivnih rezultata u *in vitro* studijama, što dovodi do nepotrebnih eksperimenata u *in vivo* fazi i posledično povećane upotrebe laboratorijskih životinja, kao i značajnih materijalnih i vremenskih troškova u procesu razvoja novih lijekova [264,265].

Za razliku od konvencionalnih 2D ćelijskih kultura, trodimenzionalni (3D) tumorski modeli omogućavaju formiranje kompleksne prostorne arhitekture karakteristične za solidne tumore. Ovi modeli bolje oponašaju ključne biološke procese u tumorskom mikrokruženju, uključujući hipoksiju, angiogenezu, nekrozu, ćelijsko-matriksne interakcije i ćelijsku adheziju, što ih čini relevantnijim za prekliničku evaluaciju novih antineoplastika [266]. Dodatno, 3D modeli omogućavaju precizniju rekapitulaciju ekspresionih profila gena i signalnih puteva uključenih u progresiju tumora i odgovor na terapiju, čime značajno unapređuju translacionu validnost prekliničkih istraživanja u odnosu na standardne 2D kulture [267]. Implementacija ovih modela ne samo da poboljšava prediktivnu vrijednost ispitivanja efikasnosti i toksičnosti novih antitumorskih jedinjenja, već i smanjuje stopu neuspjeha terapijskih agenasa u kasnijim fazama prekliničkih i kliničkih ispitivanja. S tim u vezi, primjena 3D modela može značajno doprinijeti smanjenju upotrebe eksperimentalnih životinja, u skladu sa savremenim etičkim principima i konceptom zamjene (*replacement*) u okviru 3R strategije (*Replacement, Reduction, Refinement*), koja teži optimizaciji prekliničkih istraživanja i minimizaciji upotrebe *in vivo* modela gdje god je to moguće [265]. U okviru ove doktorske disertacije za evaluaciju aktivnosti i osobina novih potencijalnih hemioterapeutika će biti korišćeni 2D i 3D tumorski modeli.

Uzimajući u obzir sinergističke efekte HDAC i ROCK inhibitora, koji su prethodno pokazani na PDAC i TNBC ćelijama u okviru ove doktorske disertacije biće primjenjeni 2D i 3D tumorski modeli PDAC-a i TNBC-a za evaluaciju antitumorskih svojstava novih potencijalnih hemioterapeutika.

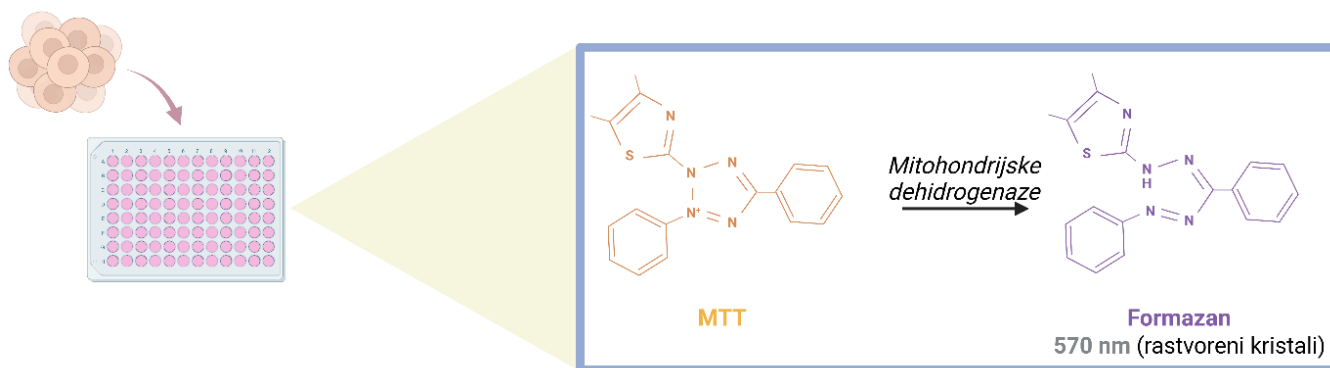
PDAC i TNBC se karakterišu izrazito invazivnim fenotipom, visokim stepenom heterogenosti i ograničenim terapijskim opcijama, što značajno otežava njihovo kliničko liječenje i smanjuje stopu preživljavanja pacijenata. PDAC predstavlja jedan od najsmrtonosnijih tumora, sa izuzetno niskom petogodišnjom stopom preživljavanja od svega 11%. Njegova agresivnost je posljedica više međusobno povezanih faktora, uključujući ranu metastatsku diseminaciju, gusto stromalno mikrokruženje bogato fibroblastima i imunskim supresorima, izraženu hemiorezistenciju, kao i odsustvo specifičnih simptoma u ranim fazama bolesti, što često dovodi do kasne dijagnoze i ograničenih terapijskih mogućnosti [70,268]. Sa druge strane, TNBC obuhvata približno 15–20% svih karcinoma dojke i predstavlja podtip sa najnepovoljnijom prognozom [71,269]. Ovaj podtip karakteriše odsustvo ekspresije estrogenskih (*estrogen receptor*, ER) i progesteronskih (*progesterone receptor*, PR) receptora, kao i receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2), što TNBC čini rezistentnim na ciljane hormonske terapije i anti-HER2 terapije koje su efikasne kod drugih podtipova karcinoma dojke. Međutim, hemioterapija je i dalje osnovni terapijski pristup za TNBC, uprkos njenoj ograničenoj efikasnosti i izraženim nuspojavama. Procjenjuje se da čak 45% pacijenata sa TNBC-om razvija udaljene metastaze, dok je petogodišnja stopa preživljavanja pacijenata sa razvijenim metastazama svega 12% [270].

1.10.1. Ispitivanje citotoksičnosti antineoplastika putem MTT testa

U okviru evaluacije potencijala novih antineoplastika, jedan od početnih koraka je određivanje citotoksičnosti jedinjenja. Među različitim metodama koje se koriste **testovi ćelijske vijabilnosti** zauzimaju centralno mjesto, jer omogućavaju kvantifikaciju broja zdravih, metabolički aktivnih ćelija u prisustvu testiranog lijeka. Na taj način se precizno procenjuje citotoksični efekat jedinjenja i njegova potencijalna terapijska primjena.

Metode bazirane na **tetrazolijum solima** su posebno značajne zbog svoje pouzdanosti i reproduktivnosti. Ove tehnike se zasnivaju na sposobnosti metabolički aktivnih ćelija da redukuju tetrazolijum soli u nerastvorna formazanska jedinjenja, čime omogućavaju direktno praćenje ćelijske aktivnosti [271].

Među najčešće korišćenim metodama za evaluaciju citotoksičnosti je MTT test, koji se zasniva na upotrebi žutog jedinjenja, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida ((3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide assay, MTT). Ovo jedinjenje služi kao supstrat za mitohondrijske dehidrogenaze, enzime prisutne samo u metabolički aktivnim ćelijama. Zdrave ili tumorske ćelije se tretiraju testiranim jedinjenjima tokom 48 ili 72 sata, čime se omogućava potencijalno ispoljavanje citotoksičnih efekata. Nakon završene inkubacije, ćelijama se dodaje MTT reagens. Žive ćelije redukuju MTT do nerastvornih kristala ljubičasto-crvenog formazana uz pomoć mitohondrijskih enzima (**Slika 14**). Kristali formazana se dalje rastvaraju dodatkom deterdženta, najčešće natrijum-dodecilsulfata (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS). Rastvoreni kristali daju obojeni produkt čija se apsorbancija mjeri na talasnoj dužini od 570 nm pomoću čitača mikroploča [272]. Na osnovu apsorbancije, računa se IC_{50} vrijednost, koja predstavlja koncentraciju jedinjenja potrebnu za smanjenje vijabilnosti ćelija za 50%.



Slika 14. Prikaz reakcije na kojoj je zasnovano sprovođenje MTT testa u cilju ispitivanja ćelijske vijabilnosti. *Created in* <https://BioRender.com>

1.10.2. Testovi za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na apoptozu ćelija

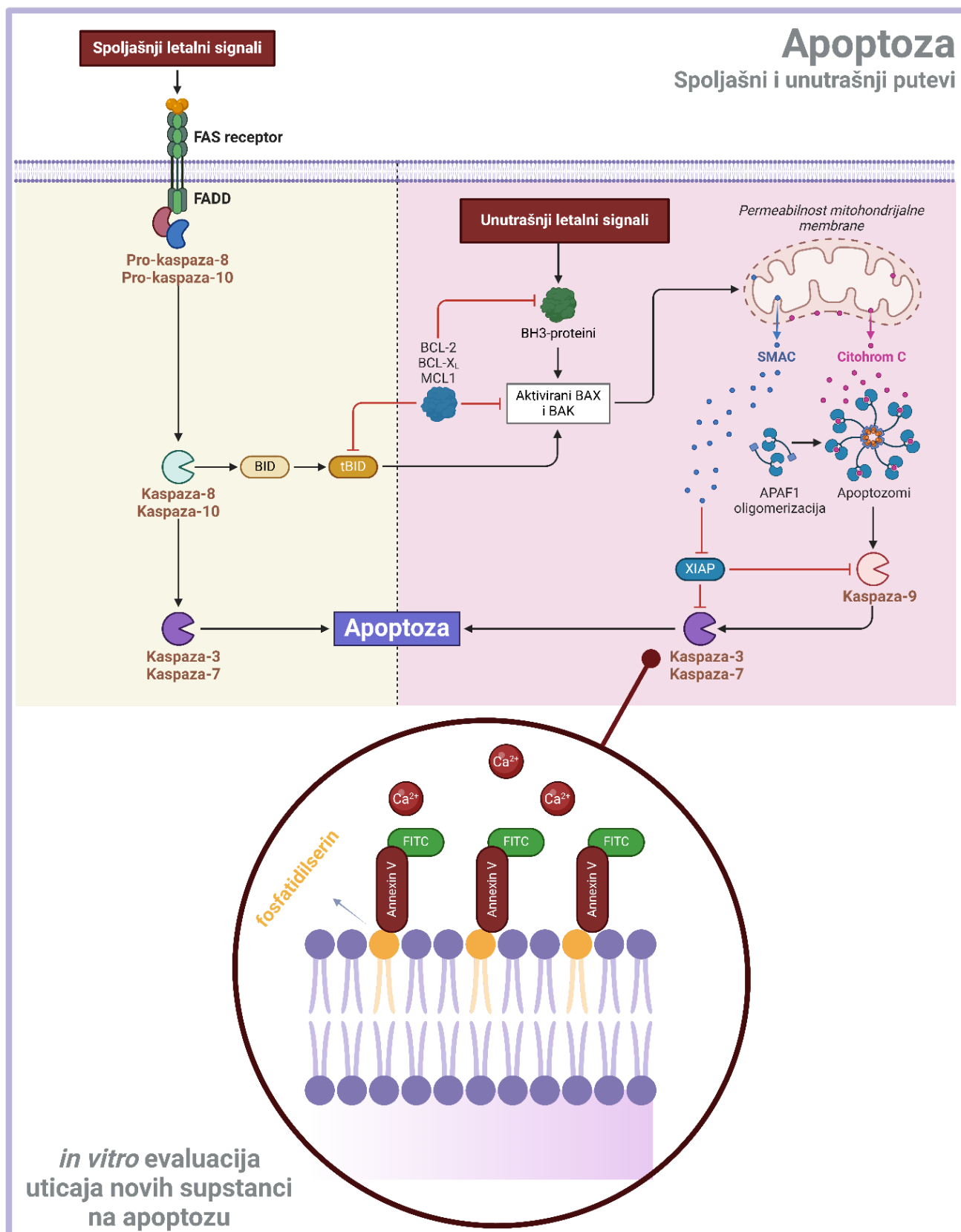
Ekstracelularni stimuli koji oštećuju ćeliju pokreću kompleksne signalne puteve unutar ćelije, što u određenim okolnostima dovodi do ćelijske smrti. Najčešći mehanizam ćelijske smrti koji indukuju antineoplastici je **apoptoza**. Kao oblik programirane ćelijske smrti, apoptoza se često opisuje kao ćelijski

„suicid” i predstavlja suprotnost procesu ćelijskog rasta. Precizna regulacija balansa između proliferacije i smrti ćelija je ključna za održavanje homeostaze u organizmu [273].

Postoje dva osnovna puta aktivacije apoptotskog procesa: **ekstrinzični (spoljašnji)** i **intrinzični (unutrašnji)** (Slika 15). Centralni događaj u oba puta je aktivacija kaspaza, specifičnih proteolitičkih enzima koji razgrađuju ciljane proteine i omogućavaju sprovođenje apoptoze.

- a) **Ekstrinzični put apoptoze** započinje aktivacijom receptora smrti, poput CD95 receptora, koji pripada porodici faktora nekroze tumora-TNF (*Tumor Necrosis Factor*) receptora i lokalizovan je na ćelijskoj membrani. Nakon vezivanja odgovarajućeg liganda, transmembranski receptor prenosi signal preko svog intracelularnog domena, što dovodi do aktivacije kaspaze-8. Ova kaspaza zatim pokreće kaskadu reakcija koja, direktnim ili indirektnim putem, vodi ka apoptozi ćelije [274].
- b) **Intrinzični put apoptoze** je primarno povezan sa mitohondrijama. Ovaj proces uključuje aktivaciju proapoptotskih proteina iz porodice BCL-2, koji stvaraju pore na spoljašnjoj membrani mitohondrija. Kao posljedica ovih poremećaja, dolazi do oslobađanja citohroma C i drugih proapoptotskih molekula u citoplazmu, što pokreće dalje apoptotske signale [275].

Finalno, oba signalna puta rezultiraju aktivacijom kaspaze-3 i kaspaze-8 koje posreduju u završnim fazama apoptoze. Završne faze uključuju translokaciju fosfatidilserina na spoljašnju stranu ćelijske membrane kao i degradaciju ćelijskih komponenti koja rezultira ćelijskom smrću [273].



Slika 15. Detaljan prikaz spoljašnjih i unutrašnjih puteva apoptoze, kao i *in vitro* evaluacije uticaja novih supstanci na apoptozu. Created in <https://BioRender.com>

Tokom apoptoze dolazi do translokacije fosfatidilserina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane što omogućava njegovu detekciju pomoću specifičnih metoda. Jedan od najčešće korišćenih markera apoptoze je Aneksin-V, protein koji se u prisustvu kalcijuma specifično vezuje za fosfatidilserin. Za vizuelizaciju i kvantifikaciju apoptotskih ćelija, Aneksin-V se obilježava fluorescentnim bojama, poput FITC-a (fluorescein izotiocijanata), što omogućava njegovu detekciju protočnom citometrijom (**Slika 15**). Bojenje Aneksinom-V obilježenim FITC-om omogućava diferencijaciju ćelija u različitim fazama apoptoze – ranoj i kasnoj, kao i identifikaciju nekrotičnih ćelija [276].

Kako bi se precizno razlikovale apoptotske od nekrotičnih ćelija, dodatno se primenjuje bojenje DNK-specifičnim bojama, poput propidijum-jodida (PI) i 7-aminoaktinomomicina D (7-AAD). Ove boje ne mogu spontano proći kroz netaknutu ćelijsku membranu što ih čini pouzdanim markerima za identifikaciju ćelija koje su izgubile integritet membrane uslijed kasne apoptoze ili nekroze [276].

1.10.3. Test za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na ćelijski ciklus tumorskih ćelija

Ćelijski ciklus je složen i precizno regulisan proces koji omogućava ćelijama da rastu, repliciraju genetički materijal i podijele se na dvije ćerke ćelije. Sastoji se od četiri osnovne faze, koje se hronološki odvijaju i koordinisano regulišu:

- **G1 faza:** Ovo je period intenzivnog rasta ćelije tokom kojeg se povećava zapremina citoplazme i sintetišu se molekuli neophodni za replikaciju DNK. Tokom ove faze ćelija ulazi u tzv. kontrolnu tačku (*G1/S checkpoint*) gdje se provjerava integritet DNK prije započinjanja replikacije.
- **S faza:** Faza sinteze u kojoj dolazi do replikacije DNK što rezultira udvostručenjem genetičkog materijala. Tokom ovog perioda, svaka hromatida formira sestrinsku hromatidu, pri čemu se posebna pažnja posvjećuje tačnosti replikacije kako bi se spriječile mutacije.
- **G2 faza:** U ovoj fazi ćelija se priprema za mitozu. Sintetišu se specifični proteini, uključujući one koji su ključni za formiranje deobnog vretena. Takođe se obavlja reparacija DNK, a ćelija prolazi kroz G2/M kontrolnu tačku, gde se provjerava kompletna replikacija DNK i integritet genoma.
- **M faza:** Ovo je mitotička faza, tokom koje se hromozomi ravnomjerno raspoređuju između dvije ćerke ćelije. Proces uključuje nekoliko podfaza (profaza, metafaza, anafaza, telofaza) i završava se citokinezom, kada se citoplazma dijeli i formiraju se dvije genetički identične ćerke ćelije.

Disfunkcija u regulaciji ćelijskog ciklusa predstavlja osnovni mehanizam karcinogeneze omogućavajući nekontrolisanu proliferaciju ćelija, izbjegavanje apoptoze i akumulaciju genetičkih oštećenja [277].

Protočna citometrija je jedna od najpouzdanijih metoda za analizu ćelijskog ciklusa. Proces uključuje fiksaciju ćelija hladnim etanolom kako bi se povećala propustljivost membrane za boje koje interaguju s DNK. Najčešće korišćeni fluorescentni agens je propidijum-jodid (PI) koji se interkalira u strukturu DNK molekula. Kada se PI ekscitira plavom svjetlošću (488 nm), emituje fluorescentni signal proporcionalan količini DNK u ćeliji. Kako bi se eliminisala potencijalna interferencija sa RNK, uzorci se tretiraju ribonukleazom (RNazom), enzimom koji razgrađuje RNK [278].

Rezultati dobijeni protočnom citometrijom omogućavaju preciznu kvantifikaciju ćelija u različitim fazama ciklusa (G1, S, G2/M), što je od ključnog značaja za ispitivanje efekata novosintetisanih terapijskih agenasa na proliferaciju ćelija. Dodatno, analiza distribucije ćelija u fazama ćelijskog ciklusa može pružiti uvid u potencijalne mehanizme djelovanja antineoplastika, poput indukcije ćelijskog zastoja

u specifičnoj fazi ili povećanja nivoa apoptoze. Ova metoda se često kombinuje sa drugim tehnikama radi sveobuhvatnog istraživanja dinamike ćelijskog ciklusa.

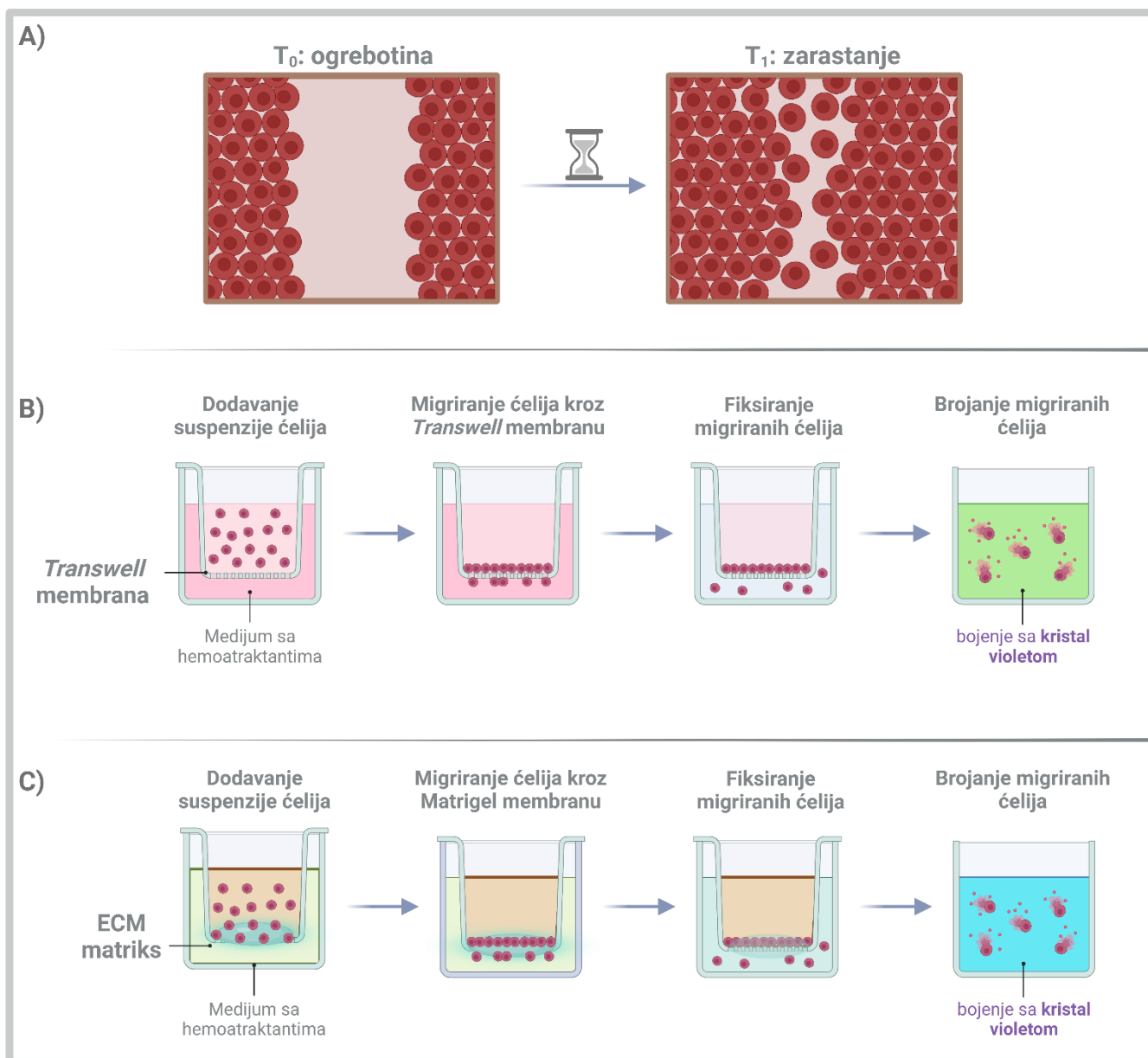
1.10.4. Testovi za ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na ćelijsku migraciju i invaziju

Proces razvoja metastaza predstavlja ključnu karakteristiku progresivnih oblika tumora, jer omogućava tumorskim ćelijama da se odvoje od primarnih tumora, migriraju u susjedna tkiva i kolonizuju udaljene organe. Ovaj složen proces zahtjeva sticanje migratornih i invazivnih sposobnosti od strane tumorskih ćelija. Metastatski fenotip tumorskih ćelija karakterišu značajne promjene u dinamici ćelijske adhezije i pokretljivosti, što je povezano sa fenomenom epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) [279].

EMT omogućava ćelijama da izgube karakteristike epitelnih ćelija, čime stiču sposobnost kretanja, što im omogućava prodor u okolna tkiva i širenje po organizmu. Ovaj proces podrazumijeva značajne promjene u citoskeletu, uključujući reorganizaciju aktinskih filamenata, promjene u kontraktilnosti ćelija, kao i povećanu invazivnost [280]. U kontekstu metastaziranja invazivnost ćelija se razlikuje od same migracije, jer invazivne ćelije koriste enzime, kao što su matriksne metaloproteinaze, za degradaciju ekstracelularnog matriksa, čime se olakšava njihov prodor u vaskularni i limfni sistem. Ovaj proces degradacije ekstracelularnog matriksa predstavlja ključnu fazu u omogućavanju invazije ćelija iz primarnog tumora u dalja tkiva i organe, što je temelj za razvoj metastaza [281].

Ispitivanje uticaja novih jedinjenja na migraciju tumorskih ćelija može se sprovoditi pomoću dvodimenzionalnih (2D) i trodimenzionalnih (3D) modela. Najčešće korišćeni 2D testovi uključuju:

- ***Scratch wound-healing test (test zarastanja rana)***: Ćelije se kultivišu u monosloju do postizanja 70-80% konfluentnosti, nakon čega se formira ogrebotina sterilnom pipetom. Ćelije se zatim tretiraju ispitivanim jedinjenjima, a kvantifikuje se razlika u širini brazde prije i posle tretmana (**Slika 16-A**) [282].
- ***Transwell migration assay***: Ćelije se postavljaju u gornju komoru sa polikarbonatnom membranom, dok donja komora sadrži hemoatraktante koji podstiču migraciju ćelija. Migracija ćelija kroz membranu se kvantifikuje bojenjem kristal-violet bojom nakon što migrirane ćelije prođu kroz membranu. Ovaj test omogućava preciznije mjerenje migracije u odnosu na test zarastanja rana, ali nedostatak mu je neophodnost kompleksnije opreme za njegovo sprovođenje (**Slika 16-B**) [283].



Slika 16. A- Šematski pojednostavljeni prikaz *Wound-healing* testa; B- Šematski prikaz *Transwell* migratornog testa; C- Šematski prikaz *in vitro* testa za ispitivanje anti-invazivnih osobina novih jedinjenja. Created in <https://BioRender.com>

Ispitivanje uticaja novih jedinjenja na invaziju tumorskih ćelija se sprovodi pomoću **testa za ispitivanje invazije kroz *Matrigel* membranu**, koja simulira ekstracelularni matriks. Aparatura koja se koristi za ispitivanje invazivnosti je slična onoj koja se koristi kod *transwell migration assay-a*, uz dodatak *Matrigel*-a u gornju komoru na polikarbonatnu membranu. Invazivne ćelije razgrađuju *Matrigel* i prelaze u donju komoru. Kvantifikacija ćelija u donjoj komori vrši se bojenjem fluorescentnim bojama ili svjetlosnom mikroskopijom, čime se procjenjuje uticaj ispitivanih jedinjenja na invazivnost ćelija [284].

2.CILJEVI RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

1. Razvoj protokola za racionalni dizajn ROCK inhibitora

- Implementacija metoda zasnovanih na strukturi ciljnog mjesta dejstva u cilju identifikacije bioaktivnih konformacija već poznatih ROCK1 i ROCK2 inhibitora.
- Formiranje i validacija 3D-QSAR modela korišćenjem generisanih bioaktivnih konformacija ROCK1 i ROCK2 inhibitora.
- Evaluacija ključnih interakcija između ROCK1 i ROCK2 inhibitora i ciljnih enzima (ROCK1 i ROCK2) primjenom molekuskog dokinga.
- Identifikacija farmakofore ROCK inhibitora na osnovu prethodno sprovedenih 3D-QSAR studija i studija molekuskog dokinga.
- Dizajn novih ROCK inhibitora na osnovu identifikovane farmakofore.

2. Racionalni dizajn i optimizacija struktura dualnih HDAC/ROCK inhibitora

- Identifikacija *solvent-exposed* regiona fasudila, poznatog ROCK inhibitora sa antitumorskim svojstvima, primjenom molekuskog dokinga na ROCK1 i ROCK2 izoformi.
- Dizajniranje HDAC/ROCK dualnih inhibitora korišćenjem dvije strategije:
 - modifikacijom strukture fasudila na osnovu identifikovanog *solvent-exposed* regiona;
 - na osnovu dobijenih rezultata o farmakofori ROCK inhibitora i postojećih znanja o farmakofori HDAC inhibitora.
- *In silico* simulacije vezivanja dizajniranih jedinjenja za ciljane enzime (ROCK1, ROCK2, HDAC1 i HDAC6) radi evaluacije njihovih vezivnih poza, funkcija vrijednovanja i selektivnosti.

3. Razvoj detaljnog *in silico* protokola za razvoj HDAC/ROCK dualnih inhibitora

- Razvoj ML 2D-QSAR modela za ROCK2 primjenom algoritma slučajnih šuma.
- Razvoj ML 2D-QSAR modela za HDAC6 primjenom algoritma slučajnih šuma.
- Dizajn dualnih HDAC/ROCK inhibitora na osnovu rezultata ML 2D-QSAR studije.
- Predviđanje aktivnosti novodizajniranih *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora primjenom generisanih ML 2D-QSAR modela.
- Predviđanje vezivnih poza dizajniranih jedinjenja primjenom molekuskog dokinga.
- Računanja slobodne energije vezivanja dizajniranih jedinjenja MM-GBSA metodom.
- Selekcija jedinjenja sa optimalnim predviđenim aktivnostima, vezivnim pozama (ROCK1, ROCK2, HDAC1 i HDAC6) i energijama vezivanja za dalju sintezu i biološka testiranja.

4. Sinteza, prečišćavanje i karakterizacija dizajniranih jedinjenja

- Razvoj i primjena optimalnih metoda za sintezu, izolovanje i prečišćavanje odabranih jedinjenja (ROCK inhibitora i HDAC/ROCK dualnih inhibitora) uz njihovu karakterizaciju NMR i masenom spektroskopijom radi potvrde strukture i čistoće.

5. *In vitro* evaluacija biološke aktivnosti sintetisanih jedinjenja primjenom enzimskih testova

- Ispitivanje aktivnosti i selektivnosti novosintetisanih jedinjenja određivanjem inhibitornih koncentracija (IC_{50}) primjenom enzimskih testova za ROCK1, ROCK2, HDAC1, HDAC2, HDAC3 i HDAC6.

6. *In vitro* evaluacija biološke aktivnosti sintetisanih jedinjenja primjenom 2D ćelijskih linija tumora dojke i pankreasa

- Ispitivanje citotoksičnosti novosintetisanih jedinjenja primjenom MTT testa.
- Ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na promjene u ćelijskom ciklusu.
- Ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na promjenu mitohondrijskog membranskog potencijala.
- Ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na indukciju apoptoze.
- Ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na produkciju mitohondrijskih i ukupnih reaktivnih oblika kiseonika.
- Ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na ekspresiju aktivacionih i supresornih antigena.

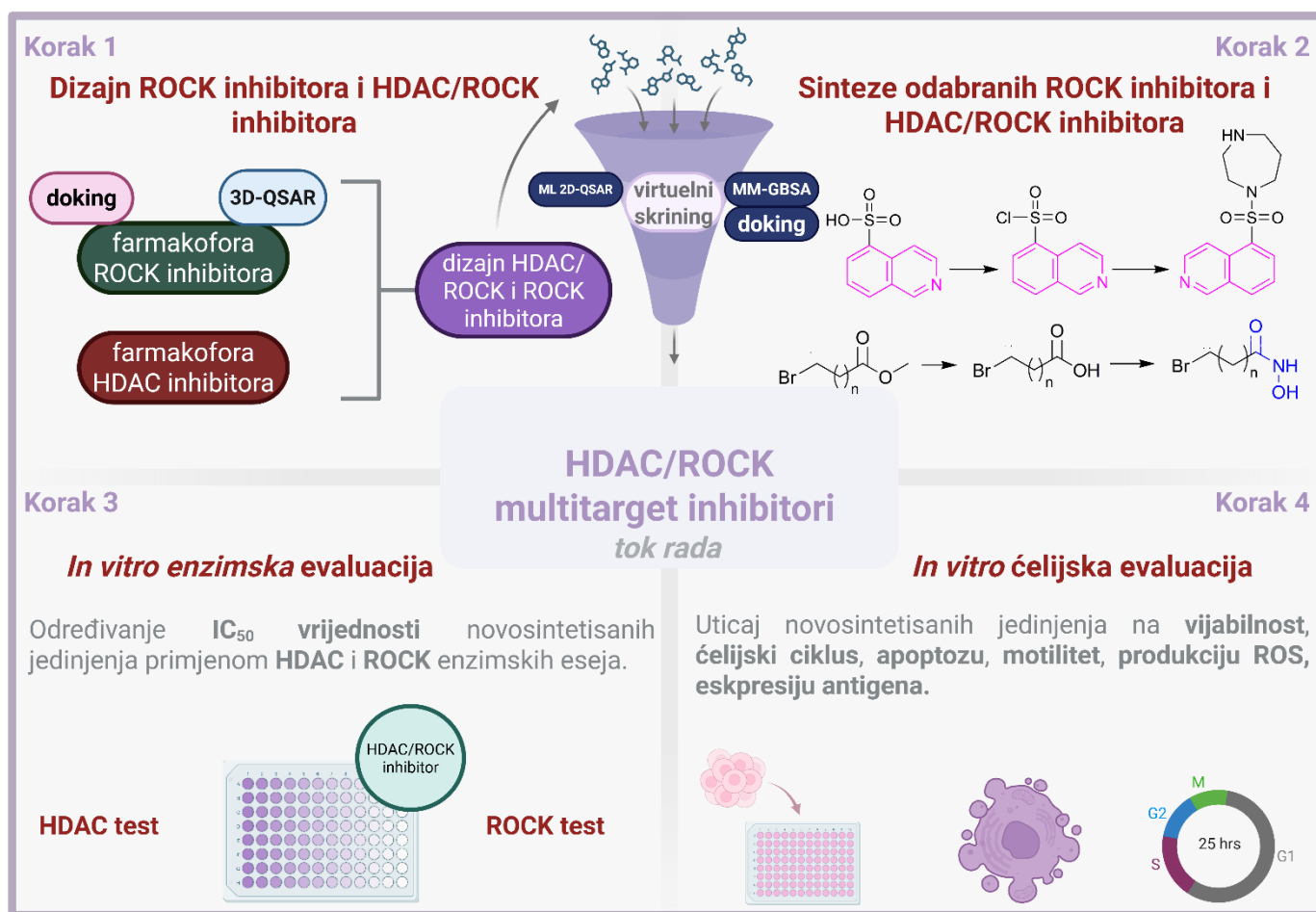
7. *In vitro* evaluacija biološke aktivnosti sintetisanih jedinjenja primjenom 3D modela tumora dojke i pankreasa

- Ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na vijabilnost tumorskih sferoida.
- Ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na formiranje tumorskih sferoida.

8. Ispitivanje antimigratornog i antiinvazivnog potencijala novosintetisanih jedinjenja

- Ispitivanje uticaja novosintetisanih jedinjenja na migraciju tumorskih ćelija primjenom testa zarastanja rana i *Transwell migration* testa.
- Ispitivanja uticaja novosintetisanih jedinjenja na invaziju tumorskih ćelija primjenom *Matrigel* sistema.

3. EKSPERIMENTALNI DIO



Slika 17. Tok doktorske disertacije. Created in <https://BioRender.com>

Na **Slici 17.** je prikazan tok rada eksperimentalnog djela ove doktorske disertacije koji će biti detaljno objašnjen u okviru ovog segmenta.

3.1. Studije 2D-QSAR, 3D-QSAR analize, molekuskog dokinga i LBVS u dizajnu novih ROCK inhibitora i *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora

Za potrebe ovog istraživanja je korišćen niz specijalizovanih softverskih paketa koji omogućavaju preciznu analizu molekulskih interakcija, predikciju biološke aktivnosti i modelovanje ključnih farmakoforskih karakteristika. Lista primjenjenih softverskih alata obuhvata:

- **ChemBio3D Ultra 13.0** (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA, USA, 2013)
- **GOLD Software 2022.1.0** (The Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, Cambridge, UK)
- **Play Molecule – ProteinPrepare.**
- **Discovery Studio 2020** (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA)
- **PyMOL** (Schrödinger, Inc., New York, USA)
- **Pentacle 1.07** (Molecular Discovery Ltd., Perugia, Italy, 2013)
- **ChemDraw Ultra 7.0.0** (CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA, USA, 2013)
- **Gaussian 09** (Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, USA, 1998)
- **SPSS v.20.0** (IBM Corp., Armonk, NY, USA, 2011)
- **Marvin Sketch 6.1.0** (ChemAxon, Budapest, Hungary, 2013)
- RDKit software in Python packages within Jupyter Notebook environment using scikit-learn machine learning library.
- Scikit-learn machine learning library in Python, version 1.6.1
- RDKit software, version 2024.9.6

3.1.1. Priprema molekula za 2D-QSAR, 3D-QSAR i molekulski doking

Svi molekuli korišćeni u studijama molekuskog dokinga i QSAR analize su inicijalno generisani u dvodimenzionalnom (2D) obliku korišćenjem softvera **Marvin Sketch 6.1.0** ili su SMILES oblici jedinjenja direktno ekstrahovani iz baza podataka (ChEMBL, PubChem), a potom standardizovani (tzv. *Canonical smiles*). U ovom koraku su određeni i dominantni oblici jedinjenja pri fiziološkom pH = 7,4, nakon čega su strukture sačuvane u **.mol ili .sdf format**.

Kako bi se osigurala adekvatna konformacijska reprezentacija molekula, izvršena je geometrijska optimizacija njihovih trodimenzionalnih (3D) struktura u okviru softverskog paketa ChemBio3D Ultra 13.0, koji koristi Gaussian 09 za sprovođenje kvantno-mehaničkih proračuna. Za optimizaciju geometrije molekula su primjenjene semiempirijska PM3 metoda i kvantno-mehanička *Hartree-Fock* metoda sa 3-21G baznim setom, čime su dobijene stabilne i fiziološki relevantne konformacije jedinjenja.

Optimizovane 3D strukture su sačuvane u **.mol2 formatu** koji je generisan pomoću softvera *Discovery Studio Visualiser*, nakon čega su korišćene za dalju molekulsku doking analizu u cilju dobijanja bioaktivnih konformacija jedinjenja. Bioaktivne konformacije jedinjenja su korišćene za dalju 3D-QSAR studiju.

Posebna pažnja je posvećena odabiru jedinjenja, s obzirom na ključni uticaj ovog koraka na validnost i prediktivnu sposobnost QSAR modela. Pri selekciji su razmotreni svi relevantni faktori prethodno opisani u **Poglavlju 1.9.2.1.**, sa posebnim fokusom na izbor jedinjenja za koja su IC₅₀ vrijednosti određene pod sličnim eksperimentalnim uslovima. Konkretno, korišćeni su isključivo rezultati enzimskih testova, dok su podaci iz ćelijskih testova izostavljeni kako bi se obezbijedila dosljednost.

3.1.2. Studije molekuskog dokinga

Molekulski doking predstavlja ključnu metodološku komponentu ove doktorske disertacije primjenjenu za generisanje bioaktivnih konformacija inhibitora koje su dalje korišćene u formiranju 3D-QSAR modela, s obzirom na to da ne postoje eksperimentalni kristalografski podaci o njihovim vezivnim konformacijama za ciljane enzime. Molekulski doking je primjenjen zajedno sa 3D-QSAR analizom u cilju generisanja farmakofore ROCK inhibitora. Dodatno, doking je korišćen i za virtuelni skrining (*docking-based virtual screening*, DBVS) novodizajniranih potencijalnih *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora. U okviru DBVS omogućena je predikcija afiniteta i stabilnosti interakcija između novodizajniranih *multitarget* inhibitora i ciljnih proteina HDAC1, HDAC6, ROCK1 i ROCK2, što je poslužilo kao osnova za selekciju najperspektivnijih jedinjenja sa visokim inhibitornim potencijalom.

3.1.2.1. Priprema kristalnih struktura enzima za molekulski doking

Kristalne strukture ciljanih enzima su preuzete iz Proteinske banke podataka (PDB, <https://www.rcsb.org/>), koja predstavlja referentni izvor eksperimentalnih strukturnih podataka biomolekula. Svakom enzimu u ovoj bazi je dodijeljen jedinstveni identifikacioni kod, a u okviru ove doktorske disertacije su korišćene sljedeće kristalne strukture:

- Humana izoforma HDAC1 izoenzima (**PDB: 5ICN**)
- Katalitički domen 2 (CD2) humane HDAC6 izoforme (**PDB: 5EDU**)
- Humana ROCK1 izoforma (**PDB: 6E9W**)
- Humana ROCK2 izoforma (**PDB: 7JNT**)

Za potrebe molekuskog dokinga, odabrane kristalne strukture enzima su podvrgnute standardizovanom postupku pripreme koji je realizovan pomoću besplatne platforme Play Molecule (<https://www.playmolecule.org/proteinPrepare/>) [285]. Ovaj process je uključivao sljedeće ključne korake:

- **Rekonstrukcija vodonične mreže** – dodavanje vodonikovih atoma koji nedostaju u eksperimentalno određenim kristalnim strukturama.
- **Titracija bočnih lanaca aminokiselina** – određivanje dominantnih oblika aminokiselinskih ostataka pri fiziološkom pH.
- **Eliminacija nepotrebnih strukturnih elemenata** – uklanjanje sekundarnih aminokiselinskih lanaca, kristalnih molekula vode koji nisu značajni za vezivanje liganda, kao i drugih molekula koji nisu ključni za enzimsku funkciju.

Nakon završetka ovog postupka, pripremljene enzimске strukture preuzete su u PDB formatu, nakon čega su korišćene u daljim simulacijama molekuskog dokinga.

3.1.2.2. Protokol molekuskog dokinga

Nakon pripreme struktura liganada i enzima, molekulski doking je sproveden korišćenjem softverskog paketa **GOLD v.5.8.1** [215], koji omogućava precizno modelovanje interakcija između liganda i aktivnog mjesta enzima. Za specifične interakcije između liganda i metaloenzima (HDAC1 i HDAC6) primijenjena je konfiguracija *gold_metallo_protease_gen_VS*, koja osigurava pravilno formiranje koordinativnih veza između liganda i Zn^{2+} jona u katalitičkom centru enzima. Za ROCK enzime je korišćena konfiguracija *chemscore_kinase*, optimizovana za procjenu interakcija inhibitora sa ROCK1 i ROCK2.

Vezivno mjesto za doking inhibitora je definisano sferom prečnika 10 Å u odnosu na ko-kristalni ligand. Broj generisanih konformacija je podešen na 100 uz efikasnost od 100%, dok su za svaki inhibitor sačuvane tri najbolje rangirane konformacije. Sve interakcije između liganada i enzima su vizuelizovane primjenom *Discovery Studio Visualizer-a 2020* i *PyMOL* [286,287].

Procjena stabilnosti vezivanja liganda za ciljano aktivno mjesto histon-deacetilaza je izvršena korišćenjem **ChemScore** funkcije vrijednovanja, dok je za procjenu afiniteta inhibitora ka ROCK kinazama korišćena **ChemPLP** funkcija. Vrijednosti ovih funkcija su korišćene za rangiranje liganda i identifikaciju najpovoljnijih konformacija.

3.1.2.3. Validacija doking studija

Za validaciju pouzdanosti doking simulacija je primijenjena metoda ponovljenog dokinga ko-kristalnog liganda. Pouzdanost je procijenjena upoređivanjem eksperimentalne ko-kristalne poze liganda sa njegovom ponovo dokovanom pozom, pri čemu je kvantitativni kriterijum bio korijen srednjeg kvadratnog odstupanja atomskih pozicija (*Root Mean Square Deviation*, RMSD). RMSD je definisan kao prosječno odstupanje pozicija atoma ponovo dokovanog liganda u odnosu na referentnu eksperimentalnu strukturu, prema sljedećoj jednačini:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i^{dok} - r_i^{exp})^2}$$

Gdje su:

- N – broj upoređenih atoma liganda
- r_i^{dok} – koordinata atoma u ponovo dokovanoj konformaciji
- r_i^{exp} – koordinata istog atoma u eksperimentalnoj strukturi

Doking procedura se smatra pouzdanom ako je RMSD između eksperimentalne i ponovo dokovane strukture liganda manji od 2 Å.

Pored RMSD analize, vizuelna inspekcija rezultata je omogućila dodatnu evaluaciju, uključujući:

- položaj i orijentaciju liganda u aktivnom mjestu enzima;
- formiranje koordinativnih interakcija između hidroksamske kiseline i Zn^{2+} jona u okviru katalitičkog domena metaloenzima;
- odsustvo sternih sudara i nepovoljnih torzionih napona u ligandu (npr. *clashes*, *bumps*).

3.1.3. 2D-QSAR studije ROCK2 i HDAC6 inhibitora

3.1.3.1. Priprema skupa podataka

Skupovi podataka za inhibitore ROCK2 i HDAC6 enzima sa eksperimentalnim IC_{50} vrijednostima su preuzeti iz ChEMBL baze podataka i naknadno ručno pregledani i pripremljeni za dalje formiranje 2D-QSAR modela (**Tabele P3.1. i P3.2**). Prilikom selekcije podataka za QSAR studiju, sprovedena je detaljna evaluacija i filtracija preuzetih podataka, uključujući:

- **Hemijsku evaluaciju** koja je podrazumijevala provjeru ispravnosti molekulskih struktura, uključujući uklanjanje nerelevantnih struktura, kao što su neorganska i organometalna jedinjenja, uklanjanje smješa i soli i standardizaciju hemijskih struktura,
- **Biološku evaluaciju** koja je podrazumijevala identifikaciju i analizu duplikata.

Sve strukture su predstavljene u formatu kanonskog SMILES zapisa (*Canonical Simplified Molecular Input Line Entry System*). IC_{50} vrijednost je određena pomoću enzimskih testova sličnog protokola za oba ciljana proteina – ROCK2 i HDAC6. U okviru skupa podataka za ROCK2 identifikovana su dva duplikata (ChEMBL3680783 i ChEMBL3689361), za koje je izračunata prosječna vrijednost pIC_{50} . Stereoizomerni oblici molekula su takođe detaljno analizirani, budući da 2D modeli tretiraju izomere kao identične strukture i dodjeljuju im iste vrijednosti molekulskih deskriptora. Imajući u vidu da izomeri mogu pokazivati različitu biološku aktivnost, sve pIC_{50} vrijednosti za izomere su objedinjene kroz medijanu kada je za jednu molekulsku strukturu postojalo više od dva izomera (**Tabela P3.3**). U okviru skupa podataka za HDAC6 nisu detektovani ni izomeri ni duplikati.

Oba skupa podataka za razvoj *Random Forest* (RF) regresionog modela su racionalno podijeljena na trening set (ROCK2:206 jedinjenja; HDAC6:145 jedinjenja) i test set jedinjenja (ROCK2:102 jedinjenja; HDAC6:72 jedinjenja) prema rastućem redosledu pIC_{50} vrijednosti, pri čemu je svaka treća molekula dodijeljena test skupu. Opseg pIC_{50} vrijednosti kod izabranih jedinjenja je bio u intervalu od 4,91 do 9,71 (QsarDB repozitorijum). Zavisna promjenljiva u okviru RF regresionog modela predstavljena je kao negativni logaritam koncentracije jedinjenja potrebne za inhibiciju aktivnosti ciljnog proteina za 50% (*half maximal inhibitory concentration*, IC_{50} odnosno pIC_{50}).

3.1.3.2. Izračunavanje molekulskih deskriptora

Nakon selekcije jedinjenja, pristupilo se izračunavanju 2D molekulskih deskriptora pomoću softverskog paketa *RDKit* u programskom okruženju *Jupyter Notebook*, uz podršku *Python* biblioteka i alata za

mašinsko učenje iz paketa *scikit-learn* [Pedregosa, F. et al., 2011. *Scikit-learn: Machine learning in Python. Journal of Machine Learning Research*, 12(Oct), str. 2825–2830.].

Izračunati deskriptori su analizirani i rangirani prema značaju u odnosu na biološku aktivnost jedinjenja. Deskriptori koji su imali nedostajuće vrednosti ili su pokazivali višak informacija bez doprinosa modelu su uklonjeni iz matrice podataka. Pored toga, korišćen je kriterijum niske varijanse uz primjenu metode *VarianceThreshold* iz modula *feature_selection* biblioteke *scikit-learn*, kako bi se eliminisali deskriptori koji ne doprinose varijabilnosti skupa podataka.

3.1.3.3. Razvoj 2D-QSAR modela primjenom metoda nasumičnih šuma (*Random Forest Regression*)

Modeli regresije metodom nasumičnih šuma (*Random Forest Regression*, *RF*) su razvijeni korišćenjem savremenih Python biblioteka u okviru programskog okruženja *Jupyter Notebook*, uz primjenu biblioteke *scikit-learn* za mašinsko učenje.

RF predstavlja ansambl-metodu koja kombinuje predikcije većeg broja stabala odlučivanja radi postizanja robusnije i preciznije regresione analize. Ova metoda koristi princip *bootstrap aggregating*-a (skraćeno *bagging*), gde se iz inicijalnog skupa podataka nasumično uzorkuje 2/3 molekulskih entiteta (od ukupnog broja n) za treniranje svakog stabla odlučivanja. Preostalih 1/3 podataka se koristi za internu validaciju modela putem „*out-of-bag*“ (*OOB*) procjene greške, što omogućava objektivniju evaluaciju bez potrebe za eksternim test setom jedinjenja.

Svako stablo odlučivanja u okviru *Random Forest* modela se inicijalno formira iz korjenskog čvora koji obuhvata cijeli uzorak, nakon čega se podaci sukcesivno razdvajaju kroz hijerarhiju čvorova odlučivanja koji se granaju ka terminalnim čvorovima u kojima se donose krajnje regresione vrijednosti.

Konstrukcija svakog stabla se zasniva ne samo na nasumičnom uzorkovanju molekula, već i na nasumičnom izboru podskupa molekulskih deskriptora pri svakom čvoru odlučivanja. Naime, u svakom čvoru model nasumično bira $p/3$ deskriptora (gde je p ukupan broj raspoloživih deskriptora) kao kandidate za optimalno razdvajanje. Ova strategija dodatno smanjuje korelaciju između pojedinačnih stabala, čime se smanjuje mogućnost prekomjernog prilagođavanja (*overfitting*) i poboljšava generalizaciona sposobnost modela.

Nakon izgradnje svih stabala odlučivanja (njihov broj se označava kao $n_estimators$), model koristi agregaciju predikcija svakog pojedinačnog stabla (npr. srednja vrednost u regresiji) kako bi se dobila konačna vrijednost ciljne varijable. Parametri poput ukupnog broja stabala ($n_estimators$) i maksimalne dozvoljene dubine svakog stabla (max_depth) imaju ključan uticaj na performanse modela i moraju se pažljivo optimizovati u skladu sa specifičnostima skupa podataka i kompleksnošću problema.

Nakon formiranja, vrši se validacija modela pomoću parametara interne i eksterne validacije koji su objašnjeni u **Poglavlju 1.8.2.1.2**. Domen primjenljivosti 2D-QSAR modela zasnovanih na algoritmima mašinskog učenja je analiziran pomoću analize minimalnih i maksimalnih vrijednosti korišćenih deskriptora, kako bi se stekao uvid u to koliko se prostor deskriptora test seta uklapa u prostor trening seta.

3.1.3.4. Dostupnost 2D-QSAR modela

U skladu sa savremenim smjernicama i najboljim praksama za izveštavanje i validaciju QSAR modela, razvijeni regresioni modeli mašinskog učenja bazirani na algoritmu nasumičnih šuma su javno dostupni putem QsarDB repozitorijuma. Za svaki model (HDAC6 i ROCK2) i prateći skup podataka je dodjeljen jedinstveni digitalni identifikator objekta (*Digital Object Identifier* – DOI), što obezbeđuje transparentnost, citabilnost i dugoročnu dostupnost rezultata istraživanja [288].

Implementacijom modela u okviru QsarDB infrastrukture je omogućeno njihovo ponovno korišćenje i primjena u prediktivnoj toksikologiji i farmaceutskoj hemiji. Konkretno, modeli kreirani u okviru ove doktorske disertacije se mogu koristiti za *in silico* procjenu biološke aktivnosti novodizajniranih jedinjenja, kako za potencijalne dvostruke inhibitore enzima ROCK2 i HDAC6, tako i za selektivne inhibitore svakog od pomenutih enzima pojedinačno. Ovakav pristup doprinosi ubrzanju procesa racionalnog dizajna lijekova, smanjenju potrebe za skupim i dugotrajnim eksperimentalnim ispitivanjima, i u skladu je sa principima zamjene, smanjenja i poboljšanja upotrebe životinja u naučnim istraživanjima (*3R – Replacement, Reduction, Refinement*).

3.1.4. 3D-QSAR studije

3.1.4.1. Selekcija jedinjenja u trening i test set

Za potrebe generisanja 3D-QSAR modela za ROCK1 i ROCK2 kinaze, odabrano je ukupno 49 inhibitora ROCK1 i 47 inhibitora ROCK2 enzima [289–291]. Strukturni podaci i eksperimentalno određene IC₅₀ vrijednosti ovih jedinjenja su preuzeti iz ChEMBL baze podataka, pri čemu su dodatno verifikovani kroz izvorne naučne radove iz kojih su prvobitno ekstrahovani [292]. U pripremi 3D-QSAR modela su korišćene bioaktivne konformacije odabranih inhibitora koje su generisane molekulskim dokingom.

Sva selektovana jedinjenja su podijeljena na trening set (34 jedinjenja za 3D-QSAR modelovanje ROCK1 i 32 jedinjenja za 3D-QSAR modelovanje ROCK2) i test set (15 jedinjenja za 3D-QSAR modelovanje ROCK1 i 15 jedinjenja za 3D-QSAR modelovanje ROCK2). Prije same podjele podataka sprovedena je analiza glavnih komponenti (*Principal Component Analysis*, PCA), korišćenjem softverskog paketa **Pentacle 1.0.7**, kako bi se procijenila homogenost i raspodjela jedinjenja unutar seta jedinjenja. Ovaj postupak je omogućio identifikaciju četiri strukturno različita klastera jedinjenja:

- **Klaster I** – izohinolinski derivati
- **Klaster II** – piridinski derivati
- **Klaster III** – indazolski derivati
- **Klaster IV** – pirazolski derivati.

Analiza glavnih komponenti (PCA) koristi matematičke metode za smanjenje dimenzionalnosti podataka, omogućavajući vizuelizaciju i identifikaciju ključnih promijenljivih koje doprinose varijabilnosti unutar skupa podataka. U ovom istraživanju, PCA je primijenjena kako bi se osigurala homogenost unutar ispitivanog seta i identifikovali reprezentativni uzorci. Ovaj pristup omogućava pouzdanu selekciju jedinjenja za trening i test setove.

Trening set je pažljivo dizajniran kako bi obuhvatio širok spektar hemijskih karakteristika, uključujući predstavnike sva četiri klastera, osiguravajući tako precizno modelovanje. Test set je strukturiran tako da uključuje reprezentativne uzorke koji omogućavaju validaciju prediktivne sposobnosti modela. Podjela podataka je izvršena na način koji osigurava ravnomjernu raspodjelu cjelokupnog raspona pIC_{50} vrijednosti između oba seta, čime je postignuta optimalna reprezentativnost podataka i pouzdanost modela.

Ovakav pristup raspodjeli podataka garantuje da su razvijeni 3D-QSAR modeli sposobni za precizno predviđanje pIC_{50} vrijednosti, uz osiguranu primjenljivost na raznovrsne hemijske strukture. Time se dodatno potvrđuje njihova korisnost u budućim istraživanjima usmjerenim ka inhibiciji ROCK kinaza.

3.1.4.2. Razvoj 3D-QSAR modela za ROCK1 i ROCK2

3D-QSAR modeli za ROCK1 i ROCK2 kinaze su razvijeni korišćenjem softverskog paketa Pentacle 1.07, sa ciljem identifikacije ključnih strukturnih determinanti koje su neophodne za efikasnu inhibiciju ovih kinaza. Ovi modeli pružaju detaljan uvid u molekulske interakcije koje utiču na inhibitorski potencijal jedinjenja, čime mogu značajno doprinijeti dizajnu novih farmaceutskih agenasa.

Razvoj 3D-QSAR (ROCK1) i 3D-QSAR (ROCK2) modela je započet izračunavanjem trodimenzionalnih molekulskih deskriptora nezavisnih od poravnanja, GRIND deskriptora pomoću Pentacle 1.07 [245]. Ovi deskriptori se baziraju na konceptu polja molekulskih interakcija (MIF), koji omogućava identifikaciju ključnih ligand-receptor interakcija [244]. Receptori su predstavljeni pomoću četiri vrste hemijskih proba koje simuliraju različite tipove interakcija sa ligandom u biološkom sistemu:

- **DRY proba** reprezentuje hidrofobne interakcije;
- **TIP proba** analizira sterne interakcije i oblik jedinjenja, što doprinosi optimizaciji molekulske zapremine i konformacione fleksibilnosti;
- **O proba** (karbonilni kiseonik) i **N1 proba** (amidni azot) simuliraju akceptore i donore vodoničnih veza i samim tim formiranje vodoničnih interakcija koje su presudne za specifičnost i jačinu ligand-receptor vezivanja.

Polja molekulskih interakcija se generišu postavljanjem liganda u centar trodimenzionalnog koordinatnog sistema ("kavez"), dok se hemijske probe pomjeraju duž mreže sa razmakom od 0,5 Å. Ovaj postupak omogućava preciznu identifikaciju energetski favorizovanih interakcija. Dobijeni podaci često sadrže stotine hiljada potencijalno značajnih MIF-ova, od kojih se selektuju energetski najznačajniji čvorovi pomoću ALMOND algoritma [244].

U narednom koraku CLACC algoritam transformiše odabrane MIF-ove u GRIND deskriptore nezavisne od poravnanja, ekstrahujući do 1000 najznačajnijih interakcija. Dodatna selekcija GRIND varijabli se postiže primjenom frakcionog faktorskog dizajna (FFD), čime se eliminišu redundantne informacije i smanjuje dimenzionalnost podataka, što poboljšava pouzdanost predviđanja QSAR modela [293].

Nakon selekcije najrelevantnijih GRIND varijabli, pristupa se formiranju 3D-QSAR modela za ROCK1 i ROCK2. Kao zavisna varijabla koriste se eksperimentalno određene vrijednosti pIC_{50} , dok GRIND deskriptori predstavljaju nezavisne varijable. Modeli se razvijaju metodom parcijalne regresije najmanjih kvadrata (PLS), koja omogućava efikasnu analizu višedimenzionalnih podataka i uspostavljanje korelacije između molekulske strukture i biološke aktivnosti.

Rezultati ovih 3D-QSAR modela omogućavaju identifikaciju ključnih molekulskih determinanti za inhibiciju ROCK kinaza i njihovu dalju primjenu u racionalnom dizajnu novih terapijskih jedinjenja sa potencijalnom aktivnošću.

Finalno, 3D-QSAR modeli su validirani pomoću parametara interne i eksterne validacije koji su detaljno predstavljeni u **Poglavlju 1.8.2.1.2**, a domen primjenljivosti ovih modela je određen primjenom *leverage* pristupa (**Poglavlje 1.8.2.1.2**).

3.1.5. Virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda (*Ligand-based virtual screening*, LBVS)

Virtuelni skrining zasnovan na strukturi liganda (*ligand-based virtual screening*, LBVS) se zasniva na identifikaciji vodećeg molekula koji se dalje podvrgava LBVS sa ciljem pronalaženja strukturno i farmakoforno sličnih molekula koji bi mogli ispoljiti uporedivu ili superiorniju biološku aktivnost. U okviru LBVS u ovoj doktorskoj disertaciji je bilo uključeno približno sedam miliona molekula iz ZINC15 baze podataka, koja predstavlja jedan od najobimnijih izvora komercijalno dostupnih, kao i dodatni interni skup racionalno dizajniranih jedinjenja sa potencijalnom *multitarget* HDAC/ROCK inhibicije [294].

Sva jedinjenja su prvobitno podvrgnuta trodimenzionalnoj optimizaciji pomoću softverskog paketa *LigPrep*, koristeći *OPLS4 Force Field* u cilju dobijanja energetski povoljnih i geometrijski relevantnih konformacija koje odražavaju biološki aktivne 3D oblike molekula.

Virtuelni skrining je sproveden primjenom metode *Shape screening*, zasnovane na konceptu strukturne komplementarnosti u trodimenzionalnom prostoru. Kao kriterijum selekcije je korišćena sličnost u odnosu na identifikovanu vodeći molekul, pri čemu je oblik molekula reprezentovan putem *Typed Pharmacophore* pristupa [295]. Ovaj metod uključuje zapreminsko poređenje farmakofornih elemenata, pri čemu su vodeći molekuli služili kao referentni obrasci (*shape queries*) za preklapanje preostalih molekula u bazi podataka.

Farmakoforne tačke su definisane prema standardima softverskog alata *Phase*, koji omogućava preciznu identifikaciju ključnih funkcionalnih grupa uključenih u vezivanje za ciljnu makromolekulu [296]. U okviru algoritma, svako farmakoforno mesto je modelovano kao sfera prečnika 2 Å, a sličnost je kvantifikovana na osnovu preklapanja volumena između mjesta istog tipa (npr. akceptor vodonične veze sa akceptorom, donor sa donatorom itd.).

Dobijeni rezultati su iskazani preko numeričke vrijednosti parametra ***Shape Sim***, koji predstavlja kvantitativnu mjeru sličnosti između molekula u bazi i vodećih struktura. Visoke vrijednosti ovog parametra ukazuju na visok stepen strukturne i farmakoforne podudarnosti, što dodatno opravdava izbor kandidata za dalju *in silico* i eventualnu eksperimentalnu validaciju u kontekstu razvoja *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora.

3.2. Sintetske procedure

3.2.1. Hemikalije i oprema

Svi korišćeni reagensi i hemikalije su bili visoke čistoće i nabavljeni od renomiranih proizvođača, kako bi se osigurala pouzdanost i reproduktivnost eksperimentalnih rezultata.

U eksperimentalnom radu je korišćena visokokvalitetna laboratorijska oprema kako bi se osigurala preciznost i tačnost svih analiza i sinteza:

- **Analitička vaga:** Adventurer-Pro, proizvođač Ohaus Corporation
- **Magnetna mješalica sa grejačem:** Tehtnica Rotamix SHP-10
- **NMR spektrometar:** Bruker Ascend 400, USA
- **Ploče za tankoslojnu hromatografiju (TLC):** Kieselgel 60 F254, dimenzije 20 × 20 cm, proizvođač Merck
- **Rotacioni vakuum uparivač visokih performansi:** Rotary vane pump RZ 2.5, Vacuumbrand, Wertheim, Nemačka
- **Rotacioni vakuum uparivač:** Heidolph Rotary Evaporator
- **Tečni hromatograf sa masenim detektorom (LC/MS):** Agilent Technologies 6210 Time-of-Flight sistem sa elektrosprej izvorom jonizacije
- **UV komora za vizuelizaciju TLC rezultata:** UV-Cabinet, Camag, Muttentz, Švajcarska

3.2.2. Sinteza benzil-bromid derivata – Opšta procedura A

Supstituisani benzaldehid (1,25 ekvivalenata) je rastvoren u 10 mL 1 M rastvora natrijum-hidroksida (NaOH), nakon čega je postepeno dodat natrijum-borohidrid (NaBH_4 , 1 ekvivalent) uz održavanje temperature na 0 °C. Reakciona smješa je zatim ostavljena da se mješa na sobnoj temperaturi 30 minuta kako bi se omogućila potpuna redukcija karbonilne grupe do odgovarajućeg alkohola. Nakon završetka redukcije, dodat je 2 M rastvor hlorovodonične kiseline (HCl) na 0 °C, sve dok nije postignuta potpuna neutralizacija smješe.

Dobijeni benzilni alkohol je ekstrahovan pomoću etil-acetata, nakon čega je organski sloj osušen nad anhidrovanim natrijum-sulfatom (Na_2SO_4). Uparavanjem rastvarača je dobijeno uljasto jedinjenje, koje je zatim rastvoreno u 10 mL dihlometana (DCM), nakon čega je u kapima dodat fosfor-tribromid (PBr_3 , 1,5 ekvivalenata), uz pažljivo održavanje temperature reakcione smješe na 0 °C. Mješanje reakcione smješe je nastavljeno na sobnoj temperaturi tokom 3 sata, čime je omogućena potpuna konverzija alkohola u benzil-bromid.

Po završetku reakcije, dodat je ledeno hladan rastvor natrijum-bikarbonata (NaHCO_3), kako bi se neutralisali eventualni ostaci kiselih reagenasa i nusprodukata reakcije. Dobijeni derivati benzil bromida su ekstrahovani pomoću DCM, a organski sloj je zatim osušen nad anhidrovanim sredstvom (Na_2SO_4) i uparen do suva. Preostali uljani product je korišćen bez prečišćavanja u narednim fazama sinteze.

3.2.3. Sinteza derivata sekundarnih amina – **Opšta procedura B**

U rastvor odgovarajuće karboksilne kiseline (2,39 mmol) u 0,5 mL dimetilformamida (DMF), je pažljivo dodato 3 mL tionil-hlorida (SOCl_2) ili oksalil-hlorida (COCl_2). Reakciona smješa je zagrijavana do 70 °C i miješana tokom noći, omogućavajući efikasnu konverziju karboksilne kiseline u odgovarajući acil-hlorid. Nakon hlađenja, višak tionil-hlorida/oksalil-hlorida i DMF-a je uparen na vakuum uparivaču, čime su dobijeni odgovarajući acil-hloridi.

Dobijeni acil-hloridi su rastvoreni u 5 mL acetonitrila, nakon čega je uslijedilo dodavanje odgovarajućeg N-Boc-sekundarnog diamina (1 ekvivalent) i trietilamina (3 ekvivalenta) kao baze. Reakciona smješa je zagrijavana na refluksu tokom 3 sata, omogućavajući formiranje amidne veze. Po završetku reakcije, acetonitril je uklonjen uparavanjem, a dobijeni ostatak je rastvoren u 5 mL dihlorometana. Zatim je dodato 0,7 mL trifluorosirćetne kiseline (TFA), a smješa je ostavljena da se mješa preko noći na sobnoj temperaturi, uz praćenje završetka reakcije tankoslojnom hromatografijom (TLC).

Po završetku reakcije, dihlorometan je uklonjen uparavanjem, a ostatak je tretiran zasićenim rastvorom kalijum-karbonata (K_2CO_3). Proizvod je zatim ekstrahovan pomoću etil-acetata (3×10 mL), a organski slojevi su osušeni nad anhidrovanim natrijum-sulfatom (Na_2SO_4). Nakon uklanjanja rastvarača uparavanjem izolovani su dobijeni derivati sekundarnih amina u prinosima od 50-65%.

3.2.4. Sinteza bromo-hidroksamskih derivata – **Opšta procedura C**

Mješavina bromokarboksilne kiseline (5 mmol) i tionil-hlorida (SOCl_2 , 5 mL) je zagrijavana na temperaturi refluksa tionil-hlorida tokom noći, čime je omogućena potpuna konverzija u odgovarajući acil-hlorid. Nakon završetka reakcije, višak tionil-hlorida je uklonjen pomoću vakuum uparivača, a dobijeni ostatak je rastvoren u 10 mL dietil-etra.

Pripremljeni etarski rastvor je dodat postepeno, u kapima, u vodeni rastvor hidroksilamina (NH_2OH , 2,2 ekvivalenta, 50%-ni maseni udio), pri čemu je temperatura reakcione smješe održavana na sobnoj temperaturi. Mješanje je nastavljeno tokom jednog sata kako bi se omogućila potpuna reakcija acil-hlorida sa hidroksilaminom, pri čemu su formirani derivati bromohidroksamske kiseline.

Dobijeni produkti su ekstrahovani pomoću etil-acetata (3×15 mL), a organski slojevi su osušeni nad anhidrovanim natrijum-sulfatom (Na_2SO_4). Nakon filtracije, rastvarač je uklonjen uparavanjem čime su dobijene čvrste supstance. Ovi produkti su bez prečišćavanja korišćeni u daljoj sintezi *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora.

3.2.5. Sinteza novih ROCK inhibitora – **Opšta procedura D**

Derivat benzil bromida (1,1 ekvivalent) i trietilamin (2 ekvivalenta) su dodati u rastvor odgovarajućeg sekundarnog amina (1 ekvivalent) u 10 mL acetonitrila. Reakciona smješa je zatim ostavljena na refluksu tokom noći, omogućavajući efikasno alkilovanje amina.

Po završetku reakcije, acetonitril je uklonjen uparavanjem. Dobijeni ostatak je tretiran dodatkom vodenog rastvora natrijum-bikarbonata (NaHCO_3), a zatim ekstrahovan dihlorometanom. Organski sloj

je potom osušen nad anhidrovanim natrijum-sulfatom (Na_2SO_4). Nakon filtracije, rastvarač je uklonjen uparavanjem čime je dobijen sirovi produkt.

Sirova reakciona smješa je prečišćena fleš hromatografijom na koloni silica gela korišćenjem gradijentnog sistema eluiranja: prvo 100% dihlorometan, a zatim smješa DCM:metanol u odnosu 90:10. Na taj način su dobijeni krajnji proizvodi – novi inhibitori ROCK kinaza u prinosima od 30-50%, a njihove strukture su potvrđene NMR spektrometrijom.

3.2.6. Sinteza *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora – **Opšta procedura E**

Derivat bromohidroksamske kiseline (1,1 ekvivalenat) i trietilamin (2 ekvivalenta) su dodati u rastvor odgovarajućeg derivata sekundarnog amina (1 ekvivalenat) u 10 mL DMF. Reakciona smješa je zagrijavana na 85 °C tokom noći. Nakon završetka reakcije, DMF je uklonjen uparavanjem, a preostali produkt je tretiran sa 10 mL vodenog rastvora natrijum-hidrogenkarbonata (NaHCO_3). Smješa je miješana na sobnoj temperaturi 10 minuta, nakon čega je voda uklonjena vakuum-rotacionim uparivačem. Na kraju, sirovi produkt je prečišćen fleš hromatografijom na koloni silica gela koristeći sistem rastvarača dihlorometan:metanol (90:10), čime su dobijeni finalni proizvodi – *multitarget* HDAC/ROCK inhibitori u prinosima od 25–40%.

3.3. Biološka evaluacija novosintetisanih jedinjenja

3.3.1. *In vitro* evaluacija korišćenjem enzimskih testova

3.3.1.1. ROCK enzimski testovi

Za potrebe inicijalne evaluacije, izvršen je skrining svih jedinjenja na ROCK1 i ROCK2 enzime pri koncentraciji od 10 μM . Na osnovu rezultata ovog skrininga, dalje su određene IC_{50} vrijednosti za najpotentnija jedinjenja iz grupe *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora i ROCK inhibitora.

Pri određivanju IC_{50} vrijednosti korišćeno je deset različitih koncentracija test jedinjenja, generisanih trostrukim serijskim razblaživanjem, počevši od inicijalne koncentracije 100 μM potencijalnog inhibitora. Kao referentne kontrole su korišćeni stauroporin i fasudil, koji su testirani prema istom IC_{50} protokolu, čime je omogućeno direktno poređenje rezultata.

Glavne komponente u sprovođenju ovog enzimskog testa su: ROCK1 i ROCK2 enzimi i peptidni supstrat *Long S6 kinase* pripremljen u reakcionom puferu sa sljedećim sastavom:

- 20 mM Hepes (pH 7,5) (4-(2-hidroksietil)-piperazin-1-etansulfonska kiselina),
- 10 mM MgCl_2 ,
- 1 mM EGTA (etilen glikol-bis(β -aminoetil etar)-*N,N,N',N'*-tetrasirćetna kiselina),
- 0,01% Brij35,
- 0,01% BSA (bovin serum albumin),
- 1 mM Na_3VO_4 ,

- 2 mM DTT (ditiotritol),
- 1% DMSO.

Test jedinjenja su dodavana reakcionoj smješi i inkubirana na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta. Nakon inicijalne inkubacije, dodat je ^{33}P -ATP u koncentracijama od 10 μM za ROCK1 i 50 μM za ROCK2. Reakcione smješe su miješane i inkubirane na sobnoj temperaturi tokom 2 sata. Aktivnost ROCK kinaza je finalno procijenjena primjenom metode vezivanja P81 filtera, koja omogućava kvantifikaciju fosforilacije peptidnog supstrata. ROCK enzimski testovi izvedeni su u saradnji sa *Reaction Biology Corporation* (Malvern, Pensilvanija, USA).

3.3.1.2. HDAC enzimski testovi

Procjena inhibitorne aktivnosti jedinjenja na hHDAC1, hHDAC2, hHDAC3 i hHDAC6 je izvedena pomoću specifičnih supstrata i optimizovanih reakcionih uslova.

Test jedinjenja su inkubirana u reakcionoj smješi čije su osnovne komponente:

- **Supstrat za hHDAC1, hHDAC2 i hHDAC3:** *Tosil-Gli-Pro-Lis(Ac)-AMC* (43 μM),
- **Supstrat za hHDAC6:** *RHKK(Ac)AMC*, izveden iz p53 aminokiselinskih ostataka 379-382,
- **Reakcioni pufer:** 25 mM Tris-HCl (pH 8), 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , i odgovarajuća koncentracija enzima (3×10^{-3} mg/mL nuklearnog ekstrakata ili 130 ng/mL rekombinantnih hHDAC proteina).

Reakcije su izvođene u *Greiner Fluotrac 200* pločama sa 96 bazena. Kontrolne grupe su uključivale:

- Supstrat inkubiran u puferu bez test jedinjenja (pozadinska kontrola),
- Reakciju sa DMSO umjesto test jedinjenja (kontrola za 100% aktivnosti enzima).

Nakon 45-minutne inkubacije na 37 °C, dodat je tripsin (8 μL , 1 mg/mL, Sigma T1005), a reakcione smješe su inkubirane dodatnih 15 minuta na sobnoj temperaturi. Reakcije su zaustavljene dodavanjem 60 μL ledenog etanola.

Fluorescencija je mjerena pomoću PerkinElmer EnVision pločastog čitača na talasnim dužinama:

- Ekscitacija: 380 nm,
- Emisija: 460 nm.

Specifičnost tripsina je potvrđena pod istim uslovima korišćenjem supstrata *Succinyl-Leu-Leu-Arg-AMC*. Pozadinska fluorescencija je oduzeta od ukupne fluorescencije, a podaci su normalizovani u odnosu na kontrolne vrijednosti (DMSO). Svi eksperimenti su izvedeni u duplikatu i ponovljeni najmanje dva puta nezavisno, kako bi se osigurala pouzdanost rezultata. Analiza podataka je izvršena korišćenjem softverskog paketa GraphPad koji omogućava precizno određivanje IC_{50} vrijednosti i evaluaciju inhibitornog potencijala jedinjenja.

3.3.2. *In vitro* evaluacija primjenom ćelijskih kultura

Ćelijske linije trostruko negativnog karcinoma dojke (MDA-MB-231, MDA-MB-468, ATCC HTB-26 i *HCC 1973*, ATCC CRL-2336) i duktalnog adenokarcinoma pankreasa (Panc-1, ATCC CRL-1469 i MiaPaCa-2, ATCC CRL-1420) su nabavljene iz Američke zbirke tipičnih kultura (ATCC, Rockville, MD, SAD). Ove ćelijske linije su održavane kao jednoslojne kulture u DMEM medijumu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), uz dodatak 10% toplotno inaktivisanog fetalnog telećeg seruma (FCS), penicilina (192 U/mL) i streptomicina (200 µg/mL). Ćelije su kultivisane na 37 °C u inkubatoru sa 5% CO₂ i visokim stepenom vlažnosti, dok je subkultivacija vršena dva puta nedjeljno.

3.3.2.1. *Test vijabilnosti ćelija (MTT test)*

Citotoksična aktivnost novosintetisanih jedinjenja je ispitana MTT testom na ćelijskim linijama karcinoma dojke (MDA-MB-231 i *HCC 1973*) i karcinoma pankreasa (MiaPaCa-2 i Panc-1) [297]. U ovom eksperimentu, MDA-MB-231 (5×10^3 ćelija/bazenu), MDA-MB-468 (3×10^3 ćelija/bazenu), *HCC 1973* (5×10^3 ćelija/bazenu), MiaPaCa-2 (2×10^3 ćelija/bazenu) i Panc-1 (3×10^3 ćelija/bazenu) ćelije su tretirane sa pet različitih koncentracija testiranih jedinjenja (50; 25; 12,5; 6,25 i 3,13 µM), pri čemu je svaki tretman izveden u pet ponavljanja. Rezultati su poređeni sa pozitivnim kontrolama – fasudilom (ROCK inhibitor) i Tubastatinom A (selektivni HDAC6 inhibitor). Jedinjenja su rastvorena u DMSO i korišćena u svježem stanju.

Posle 72 sata inkubacije, u svaki bazen je dodat MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) rastvor, 20 µL. Nakon 4 sata inkubacije, dodato je 100 µL 10% SDS rastvora (natrijum dodecil sulfat), a ploče su inkubirane na 37 °C preko noći. Sljedećeg dana je izmjerena apsorbancija na talasnoj dužini od 570 nm pomoću spektrofotometra. Procenat preživljavanja ćelija je izračunat kao odnos apsorbancije tretiranih i kontrolnih uzoraka, pomnožen sa 100. IC₅₀ vrijednosti su definisane kao koncentracije jedinjenja koje smanjuju vijabilnost ćelija za 50%.

U cilju procjene selektivnosti jedinjenja, citotoksična aktivnost je ispitana na netumorskoj ćelijskoj liniji humanih fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5). Izračunate vrijednosti IC₅₀ su korišćene za računanje indeksa selektivnosti (Si) kao odnosa IC₅₀ na MRC-5 u poređenju sa IC₅₀ na tumorskima ćelijama.

3.3.2.2. *Test apoptoze*

Indukcija apoptoze je procijenjena upotrebom kita za detekciju apoptoze - BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, San Diego, CA, SAD), koji omogućava razlikovanje rane i kasne apoptoze, kao i nekroze ćelija. Ćelijske linije trostruko negativnog karcinoma dojke (MDA-MB-231) i duktalnog adenokarcinoma pankreasa (MiaPaCa-2 i Panc-1) su tretirane testiranim jedinjenjima tokom 48 sati. Nakon tretmana ćelije su prikupljene, isprane hladnim PBS-om (*Phosphate-buffered saline*) i inkubirane sa bojom Annexin V-FITC i propidijum-jodidom (PI) prema protokolu proizvođača. Annexin V ima visoki afinitet za fosfatidilserin, koji se ispoljava na spoljašnjoj strani ćelijske membrane tokom rane apoptoze, dok je PI membransko-impermeabilni agens koji boji DNK samo u ćelijama sa oštećenjem membrane, omogućavajući detekciju ćelija u kasnoj apoptozi ili nekrozi. Analiza populacije apoptotičnih ćelija je izvršena protočnom citometrijom korišćenjem FACS

Calibur (BD Biosciences) uređaja. Dobijeni podaci su obrađeni pomoću softvera *Cell Quest*, pri čemu su ćelijske populacije klasifikovane u tri kvadranta:

1. **Žive ćelije** (Annexin V-/PI-),
2. **Ćelije u ranoj fazi apoptoze** (Annexin V+/PI-),
3. **Ćelije u kasnoj fazi apoptoze i ćelije u nekrozi** (Annexin V+/PI+).

3.3.2.3. *Analiza ćelijskog ciklusa*

Analiza distribucije ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa je sprovedena kako bi se procijenio efekat testiranih jedinjenja na regulaciju ćelijske proliferacije. Ćelijske linije su tretirane test jedinjenjima tokom 48 sati u kontrolisanim uslovima. Nakon tretmana, ćelije su sakupljene, isprane hladnim PBS-om, i fiksirane u 96% hladnom etanolu na ledu tokom 30 minuta kako bi se očuvala struktura DNK molekula i omogućila penetracija boje.

Nakon fiksacije, ćelije su ponovo isprane, a zatim inkubirane sa RNaza A (80 μ L, 200 μ g/mL) kako bi se spriječila kontaminacija uzrokovana molekulom RNK, čime se osigurava specifičnost bojenja DNK. Za bojenje DNK je korišćen propidijum-jodid (PI) (50 μ L, 50 μ g/mL) kojim je omogućena kvantifikacija sadržaja DNK u ćelijama. Inkubacija je sprovedena na 37 °C tokom 30 minuta u mraku kako bi se spriječila fotodegradacija PI.

Protočna citometrija (FACS Calibur, BD Biosciences) je korišćena za analizu sadržaja DNK i klasifikaciju ćelija u fazama ćelijskog ciklusa: G0/G1, S, i G2/M fazu. Dobijeni rezultati su izraženi kao procenat ćelija u svakoj fazi što omogućava procjenu potencijala jedinjenja da indukuju zastoj ćelijskog ciklusa u tačno određenoj fazi.

Indukcija zastoja ćelijskog ciklusa u specifičnim fazama, poput G0/G1 ili G2/M, može ukazivati na sposobnost jedinjenja da ometaju procese replikacije DNK ili mitoze, ključne za proliferaciju tumorskih ćelija. Na primjer, blokada u G2/M fazi je često povezana sa oštećenjem DNK ili poremećajem mikrotubularne dinamike, dok zastoj u G1 fazi može ukazivati na inhibiciju ciklin zavisnih kinaza (CDK) ili signalnih puteva povezanih sa ćelijskom rastom.

3.3.2.4. *Detekcija potencijala mitohondrijalne membrane*

Potencijal mitohondrijalne membrane (MMP) je procijenjen korišćenjem fluorescentnog markera JC-1, koji omogućava razlikovanje zdravih mitohondrija sa očuvanim membranskim potencijalom od onih sa oslabljenom funkcijom [298]. JC-1 koristi princip promjene u fluorescenciji, pri čemu se pri visokim vrijednostima MMP formiraju crveni agregati ($\lambda=590$ nm), dok pri smanjenju vrijednosti MMP dolazi do formiranja zelenih monomera ($\lambda=530$ nm). Ove promjene u fluorescenciji omogućavaju preciznu detekciju disfunkcije mitohondrija.

Ćelijske linije su tretirane različitim koncentracijama testiranih jedinjenja tokom 24 sata kako bi se procijenio njihov uticaj na mitohondrijalnu funkciju. Nakon tretmana, ćelije su isprane PBS-om i inkubirane sa JC-1 bojom u finalnoj koncentraciji od 15,4 μ M tokom 15 minuta na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂. Brza i precizna inkubacija u tamnim uslovima je spriječila degradaciju boje i osigurala tačnost mjerenja.

Promjene u fluorescenciji su analizirane protočnom citometrijom (FACS Calibur, BD Biosciences) što je omogućilo kvantifikaciju odnosa crvene i zelene fluorescencije. Ovaj odnos (crvena/zelena fluorescencija) predstavlja direktan pokazatelj MMP, pri čemu pad odnosa ukazuje na depolarizaciju mitohondrijalne membrane što je ključni rani marker apoptoze.

3.3.2.5. Određivanje intracelularnih i mitohondrijalnih reaktivnih oblika kiseonika

Procjenjivanje generisanja ukupnih reaktivnih oblika kiseonika (*reactive oxygen species*, ROS) je od značaja za razumijevanje oksidativnog stresa i njegovog uticaja na ćelijske funkcije. U ovom istraživanju, generisanje ROS je analizirano upotrebom 20,70-dihlorodihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA). DCFH-DA je nefluorescentni prekursor koji, nakon ulaska u ćeliju, hidrolizuje i transformiše se u DCF, koji može fluorescirati kada dođe u kontakt sa ROS. Ova promjena je osnova za mjerenje nivoa reaktivnih oblika kiseonika unutar ćelija.

Ćelije su tretirane sa odgovarajućim koncentracijama testiranih jedinjenja, dok su netretirane ćelije korišćene kao kontrolna grupa. Nakon 48 sati inkubacije, ćelije su prikupljene, isprane sa PBS i zatim inkubirane sa 10 mM DCFH-DA na 37 °C tokom 30 minuta u mraku. Ovaj period inkubacije omogućava da DCFH-DA uđe u ćeliju i da se u prisustvu ROS transformiše u fluorescentni DCF. Fluorescencija generisana od strane DCF molekula je kvantifikovana pomoću protočne citometrije čime se omogućava precizno mjerenje nivoa ROS u tretiranim ćelijama.

Dodatno, za analizu mitohondrijskih superoksida, je korišćen specifičan fluorescentni marker *MitoSOKS Red* koji selektivno označava superoksidne radikale unutar mitohondrija. Ćelije su tretirane sa 5 mM *MitoSOKS*, a zatim inkubirane na 37 °C u mraku tokom 10 minuta. Nivoi intracelularnih ROS i mitohondrijskih superoksida su analizirani korišćenjem protočne citometrije (FACS Calibur, BD Biosciences, SAD), a dobijeni podaci su obrađeni pomoću softverskog paketa Cell Quest (BD Biosciences).

3.3.2.6. Ispitivanje ekspresije površinskih antigena

Ekspresija površinskih antigena HLA-A, B, C, PD-L1, PVR i MICA je ispitivana na TNBC ćelijskim linijama MDA-MB-231 i MDA-MB-438 nakon 48-časovnog tretmana jedinjenjima u koncentraciji od 5 µM. Ćelije su bojene monoklonskim antitelima: PE-konjugovanim anti-MICA/B, FITC-konjugovanim anti-CD155 (PVR) (BioLegend, San Dijego, SAD), PE-konjugovanim anti-CD274 (PD-L1) i FITC-konjugovanim anti-HLA-A, B, C (eBioscience, Life Technologies, Karlsbad, SAD). Ekspresija površinskih antigena u tretiranim ćelijama je analizirana protočnom citometrijom pomoću aparata FACS Calibur BD i softverskog paketa CellQuest, a dobijeni rezultati su upoređeni sa kontrolnim tretmanima - ćelijskim medijumom.

3.3.2.7. Formiranje i analiza višćelijskih tumorskih sferoida

Pristup zasnovan na generisanju tumorskih sferoida je široko korišćen u istraživanjima kako bi se simulirali uslovi rasta tumora u 3D okruženju, što je bliže fiziološkim uslovima u odnosu na tradicionalne 2D modele. Višćelijski tumorski sferoidi su generisani zasijavanjem ćelijskih linija MDA-MB-231,

MiaPaCa-2 i Panc-1 (1000 ćelija po bazenu) u 100 μ L DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) medijuma obogaćenog sa 10% fetalnog telećeg seruma (FCS). Ovaj medijum je obezbijedio odgovarajuće uslove za ćelijsku proliferaciju i rast. Za stvaranje sferoida korišćene su ploče sa ultraniskim adhezionim svojstvima (NuncTM SpheraTM 96-bunar ploče, Thermo Scientific NuncTM), koje omogućavaju formiranje sferoidnih struktura zbog smanjenog prijanjanja ćelija za podlogu. Nakon 4 dana inkubacije, formiranje i rast tumorskih sferoida su procenjeni i dokumentovani korišćenjem mikroskopa Olympus CKX53 sa 4x objektivom. Za procjenu citotoksičnosti različitih ispitivanih jedinjenja, u bazene sa formiranim sferoidima je dodat medijum obogaćen različitim koncentracijama testiranih jedinjenja. Nakon inkubacije od 72 sata, efekti tretmana na vijabilnost ćelija su procijenjeni korišćenjem MTT testa.

U dodatnim eksperimentima je sprovedena ko-kultivacija ćelija raka dojke i pankreasa sa testiranim jedinjenjima. Ovaj pristup omogućava dublje razumijevanje međusobnih interakcija između ćelija u tumorskom mikrokruženju, uključujući moguće sinergističke ili antagonističke efekte terapijskih jedinjenja na tumor. Nakon 4 dana inkubacije, sferoidi su pažljivo analizirani mikroskopski, a rast sferoida je kvantifikovan korišćenjem ImageJ softverskog paketa. Ovaj softver omogućava preciznu analizu slike, omogućavajući kvantifikaciju rasta i promjene u volumenu sferoida u odnosu na kontrolne i tretirane uzorke.

3.3.2.8. Test migracije ćelija (test zarastanja rana)

Za procjenu migracionih sposobnosti ćelija HCC1937 i Panc-1, korišćen je *scratch test* (test zarastanja rana) kako bi se simulirao proces zarastanja rana, koji je ključni aspekt tumorske invazije i metastaziranja. U ovom eksperimentu, 1×10^5 ćelija je bilo zasijano u ploče sa 24 bazena i inkubirano do postizanja konfluencije. Nakon toga, mehanički ogrebotinski rez je napravljen u centru ćelijskog monosloja pomoću sterilnog pipetnog vrha od 200 μ L. Ovaj rez oponaša oštećenje tkiva koje se može iskoristiti za procjenu ćelijske migracije u odgovoru na povrede.

Ćelije su zatim inkubirane 24 sata u prisustvu ili odsustvu testiranih jedinjenja kako bi se pratili efekti tretmana na migraciju ćelija u pravcu oštećenja. Na kraju inkubacije, ćelijski monoslojevi su fiksirani u ledenom metanolu, isprani sa PBS (fiziološki rastvor) i obojeni sa 0,1% kristalno ljubičastim rastvorom. Ovaj postupak bojenja omogućava jasnu vizualizaciju ćelija koje ostaju u području ogrebotine, kao i onih koje su migrirale ka sredini. Fotografisanje ogrebotina je izvršeno odmah nakon pravljenja ($t = 0$) i nakon inkubacije kako bi se uporedile promjene širine ogrebotine tokom vremena.

Površine zarastanja rana su analizirane pomoću softvera NIH ImageJ koji omogućava kvantifikaciju brzine migracije ćelija računajući količinu prostora koji je zarastao. Ova tehnika je standardna za procjenu ćelijske migracije i često se koristi u istraživanjima metastaza i ćelijske mobilnosti, jer odražava sposobnost ćelija da migriraju kroz okolinu.

3.3.2.9. Transwell testovi migracije i invazije ćelija

Sposobnosti migracije i invazije tumorskih ćelija su ključne za proces metastaziranja, pa su dodatno testirane uz pomoć *Transwell* sistema. U ovom eksperimentu, migracija i invazija ćelijskih linija MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 su procijenjene korišćenjem *Transwell* membrana sa porama prečnika 8,0 μ m

(Corning® Costar® CLS3464) za migraciju, i membrana obloženih Matrigel™ matriksom (Corning™ BioCoat™) za invaziju.

Za migracioni test, u gornju komoru *Transwell* aparata je dodato 200 µL suspenzije ćelija (6×10^5 ćelija), dok je u donju komoru stavljeno 800 µL medijuma sa ili bez testiranih jedinjenja. Ćelije koje su migrirale sa gornje strane membrane na donju stranu tokom 24 sata inkubacije su prvobitno bile fiksirane u metanolu, a potom obojene sa 0,1% kristalno ljubičastim rastvorom i analizirane pod mikroskopom. Ovaj metod omogućava preciznu procjenu migracijskih sposobnosti ćelija kroz membranu koja simulira fizički otpor.

Isti *Transwell* sistem je korišćen za test invazije, ali uz dodatak Matrigel™ matriksa, što omogućava simulaciju invazije kroz složeniji ekstracelularni matriks. Ćelije koje su uspjele da probiju Matrigel™ i migriraju do donje strane membrane su bile obojene i kvantifikovane na isti način. Kvantifikacija migriranih i invazivnih ćelija je izvršena korišćenjem softvera NIH ImageJ.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Identifikacija farmakofore i dizajn novih ROCK inhibitora

4.1.1. Rezultati 3D-QSAR studije za ROCK1 i ROCK2 inhibitore

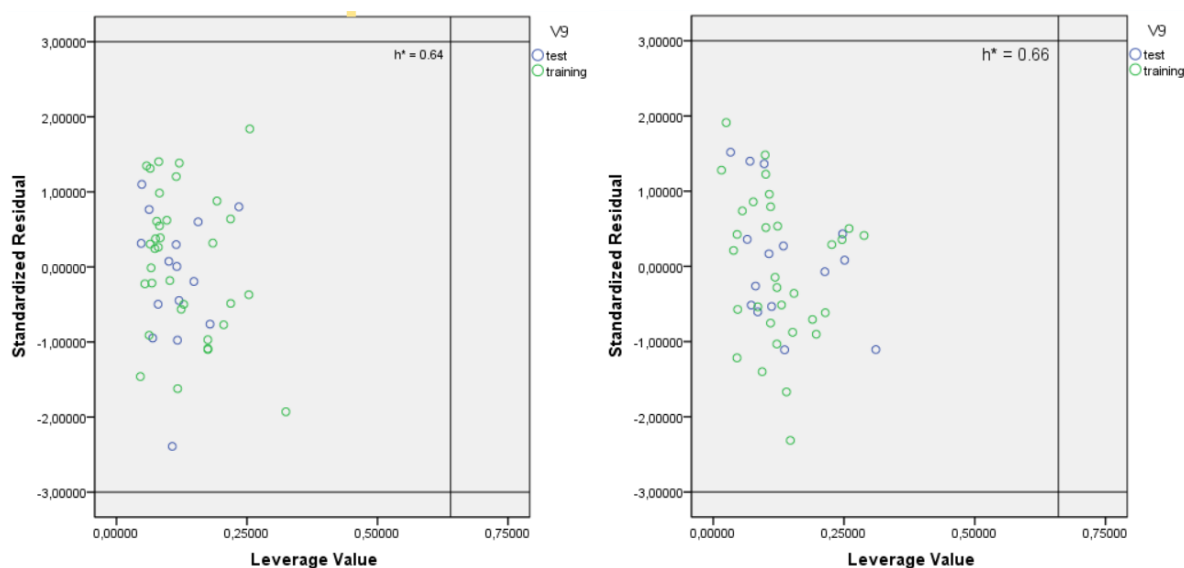
Razvijeni 3D-QSAR modeli za ROCK1 i ROCK2 inhibitore su primjenjeni u cilju identifikacije ključnih strukturnih karakteristika neophodnih za efikasnu inhibiciju ROCK1 i ROCK2 enzima. Rezultati interne i eksterne validacije ovih modela, prikazani u **Tabelama 3 i 4**, potvrđuju njihovu pouzdanost i prediktivnu sposobnost. Na osnovu vrijednosti validacionih parametara, zaključuje se da 3D-QSAR (ROCK1) i 3D-QSAR (ROCK2) (**Tabele 3 i 4**) modeli predstavljaju pouzdane alate za procjenu inhibitorne aktivnosti novodizajniranih ROCK1 i/ili ROCK2 inhibitora koji se uklapaju u domen primjenljivosti razvijenih modela. Distribucija eksperimentalnih pIC₅₀ vrijednosti jedinjenja iz trening i test seta, zajedno sa pIC₅₀ vrijednostima koje su predviđene pomoću razvijenih 3D-QSAR (ROCK1) i 3D-QSAR (ROCK2) modela detaljno je prikazana u **Tabelama P1.1. i P1.2. (Prilog)**. Sva jedinjenja iz trening i test seta (**Tabela P1.3.**) su se nalazila unutar domena primjenljivosti razvijenih modela, čime se dodatno potvrđuje njihova validnost u predviđanju aktivnosti novodizajniranih ROCK inhibitora (**Slika 18**).

Tabela 3. Rezultati interne i eksterne validacije 3D-QSAR (ROCK1) modela

Interni validacioni parametri				
	R ²	Q ² _{Loo}	RMSEE	
	0,914	0,59	0,393	
Kriterijum	>0,9	>0,5		
Eksterni validacioni parametri				
	R ² _{pred}	RMSEP	r _m ²	r ² _m
	0,792	0,561	0,759	0,573
Kriterijum	>0,6	≤2RMSEE	>0,5	>0,5
	$\overline{r_m^2}$	Δr ² _m	(r ² -r ² ₀)/r ²	k'
	0,666	0,186	0,099	0,974
Kriterijum	>0,5	<0,2	<0,1	0,85 ≤ k' ≤ 1,15

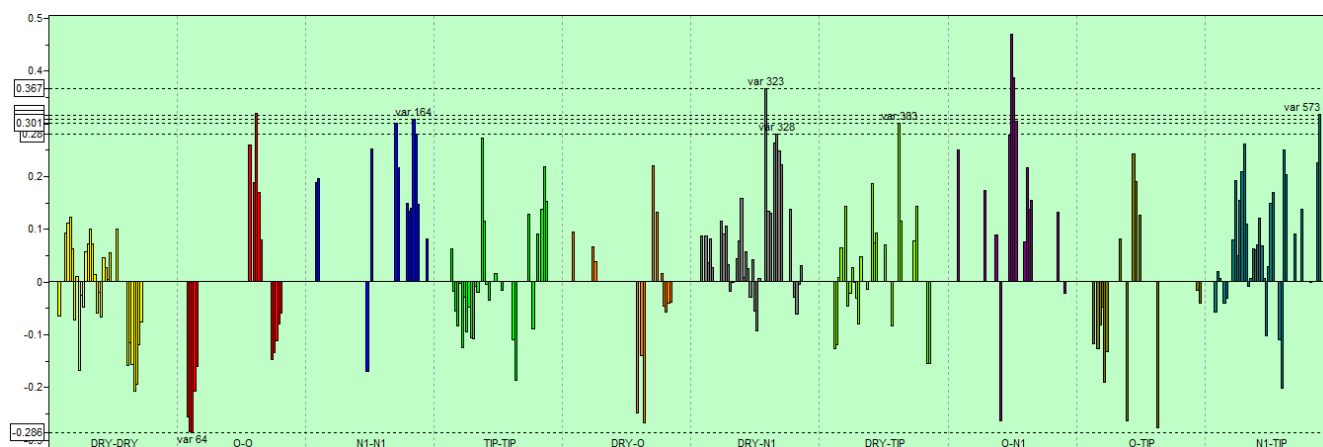
Tabela 4. Rezultati interne i eksterne validacije 3D-QSAR (ROCK2) modela

Interni validacioni parametri				
	R ²	Q ² _{LOO}	RMSEE	
	0,933	0,54	0,327	
Kriterijum	>0,9	>0,5		
Eksterni validacioni parametri				
	R ² _{pred}	RMSEP	r _m ²	r ² / _m
	0,851	0,499	0,753	0,616
Kriterijum	>0,6	≤2RMSEE	>0,5	>0,5
	$\overline{r_m^2}$	Δr ² _m	(r ² -r ² / ₀)/r ²	k'
	0,684	0,137	0,032	0,963
Kriterijum	>0,5	<0,2	<0,1	0,85 ≤ k' ≤ 1,15



Slika 18. Domeni primjenljivosti za ROCK1 (lijevo) i ROCK2 (desno). *Leverage value* – leverage vrijednost, *Standardized residual* – standardizovani ostaci, *training* – trening set jedinjenja.

Ključne GRIND promijenljive koje koreliraju sa ROCK1 inhibitornom aktivnošću su prikazane na dijagramu PLS koeficijenata (**Slika 19**).



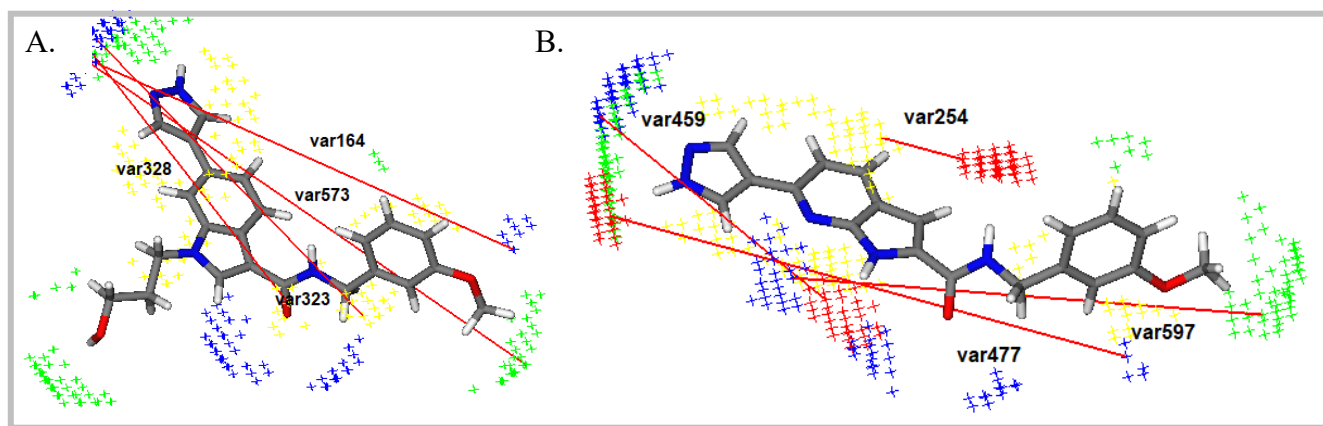
Slika 19. Dijagram PLS koeficijenata za 3D-QSAR (ROCK1) model. Najznačajnije GRIND promijenljive koje utiču na aktivnost ROCK1 inhibitora su obilježene na dijagramu.

Pozitivne promijenljive **var323** (DRY-N1: 13,2–13,6 Å) i **var328** (DRY-N1: 15,2–15,6 Å) su identifikovane u sva četiri klastera između akceptora vodoničnih veza – atoma azota ili kiseonika u heterociklusu (tetrahydroizohinolin, piridin, pirazol ili indazol) ili hidroksilne grupe u tetrahydroizohinolinu, kao i hidrofobnog regiona koji je opisan oko fenil grupe i linkera. Ove promijenljive nisu prisutne u manje aktivnim molekulima, poput CHEMBL67352 ($pIC_{50}(\text{ROCK1}) = 4,120$), CHEMBL20232147 ($pIC_{50}(\text{ROCK1}) = 4,230$) i fasudila ($pIC_{50}(\text{ROCK1}) = 6,180$). Nasuprot tome, najaktivnija jedinjenja, poput CHEMBL1922035 ($pIC_{50}(\text{ROCK1}) = 8,700$) i CHEMBL1922128 ($pIC_{50}(\text{ROCK1}) = 8,520$) se karakterišu prisustvom **var323** i **var328** što dodatno potvrđuje njihov značaj u inhibitornom potencijalu ROCK1 inhibitora (**Slika 20-A**). CHEMBL20232147 ($pIC_{50}(\text{ROCK1}) = 4,230$) ne posjeduje voluminozne supstituenate na indazolnom prstenu, uključujući fenil grupu, što je slučaj i sa jedinjenjima CHEMBL67352 ($pIC_{50}(\text{ROCK1}) = 4,120$) i fasudilom ($pIC_{50}(\text{ROCK1}) = 6,180$). Ovi rezultati sugerišu da je prisustvo heterociklusa koji sadrži akceptora vodonične veze na optimalnoj udaljenosti od aromatičnih supstituenata, poput fenil grupe, od suštinskog značaja za efikasnu ROCK1 inhibiciju.

Promijenljiva **var573** (N1-TIP: 20,4–20,8 Å) je uočena kod svih molekula koji sadrže supstituent u *meta*- ili *para*- položaju benzenovog prstena, uključujući i najaktivnije inhibitore (CHEMBL1922035 ($pIC_{50}(\text{ROCK1})=8,700$), CHEMBL1922128($pIC_{50}(\text{ROCK1})=8,520$ - **Slika 20-A**). **Slika 20-A** ilustruje optimalnu udaljenost između akceptora vodonične veze –azotovog atoma u heterociklusu – i sterne probe opisane oko supstituenata benzenovog prstena (metil ili hidroksilna grupa). Odsustvo ovih strukturnih karakteristika, samim tim i pozitivne promijenljive **var573**, se primjećuje u slabije aktivnim jedinjenjima, poput CHEMBL2023148 ($pIC_{50}(\text{ROCK1})=3,800$), CHEMBL67352 ($pIC_{50}(\text{ROCK1})=4,120$) and CHEMBL2023147 ($pIC_{50}(\text{ROCK1})=4,230$). Značaj supstituenata na benzenovom prstenu je dodatno potvrđen i promijenljivom **var383** (DRY-TIP: 14,0–14,4 Å). **Var383** naglašava pozitivnu korelaciju između optimalne udaljenosti hidrofobnog regiona, opisanog oko heterocikličnog prstena (piridin, indol) i sternog regiona, opisanog oko supstituenata na benzenovom prstenu sa ROCK1 inhibicijom. Finalno, uzimajući u obzir pozitivan uticaj promijenljivih **var573** i **var383**, zaključuje se da *meta* i *para* supstitucija benzenovog prstena mogu doprinijeti poboljšanju potentnosti ROCK1 inhibitora. Štaviše,

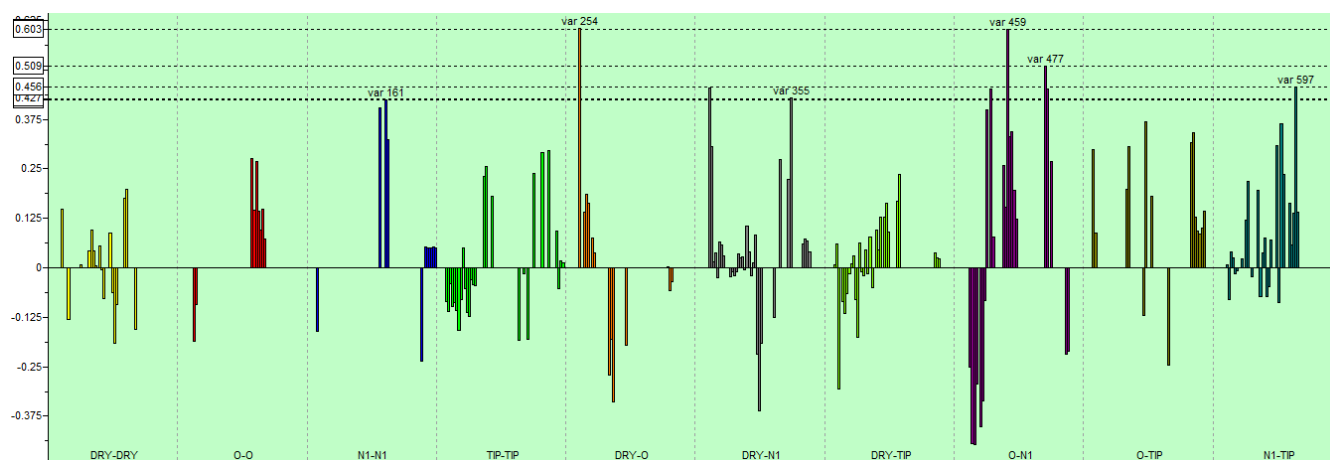
prisustvo supstituenata na benzenovom prstenu koji imaju osobine akceptora vodoničnih veza pozitivno koreliše sa ROCK1 inhibicijom. Ova korelacija je potvrđena pozitivnom varijablom **var164** (N1-N1: 19,2–19,6 Å) koja opisuje interakciju između akceptora vodonične veze u heterociklusu (pirazol, indazol ili piridin) i srodnih funkcionalnih grupa na benzenovom prstenu. **Var164** je detektovana u najaktivnijim molekulima iz trening seta (**Slika 20-A**).

Struktura linkera, djela molekula koji povezuje heterociklični dio i fenil grupu, može u značajnoj mjeri uticati na ROCK1 inhibicijom. U okviru ovog segmenta je identifikovano prisustvo promijenljive **var64** (O-O: 2,4–2,8 Å) koja ukazuje na negativan uticaj ureido grupe na aktivnost ROCK1 inhibitora. Ova promijenljiva je najčešće opisana između dva donora vodoničnih veza, odnosno dva atoma azota u ureido grupi. Kod određenih molekula (CHEMBL1922143, CHEMBL1922142, CHEMBL1922034), **var64** je opisana između nesupstituisanog atoma azota indolnog prstena i atoma azota karbamoil grupe. S druge strane, ova promijenljiva nije detektovana kod derivata klastera IV, gdje su azotni atomi ureido grupe supstituisani (CHEMBL1922042, CHEMBL1922043, CHEMBL1922135, CHEMBL1922044, CHEMBL1922134, CHEMBL1922133, CHEMBL1922030, CHEMBL1922126, CHEMBL1922035, CHEMBL1922127, CHEMBL1922033, CHEMBL1922128, CHEMBL1922125). Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da bi uvođenje supstituenata na azotne atome ureido grupe moglo eliminisati negativne efekte povezane sa **var64** čime bi se potencijalno poboljšala aktivnost ROCK1 inhibitora.



Slika 20. A. Prikaz pozitivnih promijenljivih **Var164**: N1-N1, **Var323**: DRY-N1, **Var328**: DRY-N1 i **Var573**: N1-TIP najaktivnijeg molekula trening seta CHEMBL1922128 iz 3D-QSAR (ROCK1) modela. **B.** Prikaz pozitivnih promijenljivih **Var254**: DRY-O, **Var459**: O-N1, **Var477**: O-N1 i **Var597**: N1-TIP najaktivnijeg molekula trening seta CHEMBL1921034 iz 3D-QSAR (ROCK2) modela; Hidrofobne probe (DRY) su obilježene žuto, sterne probe (TIP) zeleno, probe koje identifikuju donore vodoničnih veza su obojene crveno, dok su probe koje ukazuju na prisustvo akceptora vodoničnih veza istaknute plavim krstićima.

Ključne GRIND promijenljive koje utiču na aktivnost ROCK2 inhibitora su prikazane na dijagramu PLS koeficijenata (**Slika 21**).



Slika 21. Dijagram PLS koeficijenata za 3D-QSAR (ROCK2) model. Najznačajnije GRIND promijenljive koje utiču na ROCK2 inhibornu aktivnost su obilježene na dijagramu.

Pozitivna varijabla **var254** (DRY-O: 2,4–2,8 Å) ukazuje na značaj optimalne udaljenosti između hidrofobnog regiona opisanog oko heterocikličnog prstena i donora vodonične veze – nesupstituisanog azotnog atoma linkera. Dodatno, promijenljiva **var459** (O-N1: 10,0–10,4 Å) ističe uticaj specifične udaljenosti između donora vodonične veze u linkeru i akceptora vodonične veze u heterociklusu na ROCK2 inhibornu aktivnost (**Slika 20-B**). **Var254** i **var459** sugerišu da je prisustvo heterocikličnog prstena sa akceptorom vodonične veze (atom azota) povezanog sa donorom vodonične veze u linkeru (nesupstituisani atom azota) ključna strukturna osobina za efikasnu ROCK2 inhibiciju.

Prisustvo promijenljive **var355** (DRY-N1: 18,0–18,4 Å) ukazuje da rastojanje između grupe koja ima osobine akceptora vodonične veze unutar heterociklusa (atom azota) i hidrofobnog regiona opisanog oko benzenovog prstena pozitivno utiče na ROCK2 inhibornu aktivnost. **Var355** je prisutna u najaktivnijim inhibitorima, dok nije detektovana u najmanje aktivnom molekulu CHEMBL2023148 ($pIC_{50}(ROCK2) = 4,210$), vjerovatno uslijed nedovoljne distance između ova dva strukturna elementa - heterociklusa i benzenovog prstena. Na osnovu ovih rezultata se može pretpostaviti da prisustvo aromatičnog prstena, poput fenil grupe, doprinosi povećanju aktivnosti ROCK2 inhibitora samo ako se aril grupa nalazi na tačno odgovarajućoj udaljenosti (0,4 Å) od heterociklusa.

Prisustvo promijenljive **var161** (N1-N1: 14,8–15,2 Å) potvrđuje da dužina linkera treba biti pažljivo razmotrena prilikom dizajniranja novih ROCK2 inhibitora. Ova promijenljiva opisuje optimalnu udaljenost između akceptora vodonične veze u heterociklusu (piridin, pirazol, izohinolin) i grupe koja je akceptor vodonične veze u linkeru (atom kiseonika karbonilne grupe). Međutim, kod pojedinih jedinjenja iz klastera III, uključujući najmanje aktivno jedinjenje CHEMBL2023148 ($pIC_{50}(ROCK2) = 4,210$), iako je prisutan akceptor vodonične veze u linkeru, njegova udaljenost od heterociklusa nije optimalna. Na osnovu ovih podataka se može zaključiti da je, osim prisustva akceptora vodonične veze, neophodno uzeti u obzir i njegovu optimalnu udaljenost (0,4 Å) od heterociklusa kako bi se dizajnirali potentniji ROCK2 inhibitori.

Udaljenost između grupe heterocikličnog prstena koja je akceptor vodonične veze (azotov atom piridina, pirazola, izohinolina ili indazola) i supstituenata benzenovog prstena u *meta* ili *para* položaju takođe se pokazala kao značajna za inhibiciju ROCK2 što je potvrđeno promijenljivom **var597** (N1-TIP: 15,6–16,0 Å) (**Slika 20-B**). Uvođenje grupa, koje su akceptori vodonične veze, kao supstituenata benzenovog prstena je identifikovano kao pozitivan parametar za ROCK2 inhibiciju na osnovu prisustva

promijenljive **var477** (O-N1: 17,2–17,6 Å). **Var477** opisuje interakciju između donora vodonične veze u heterociklusu (atomi azota piridina, pirazola, indazola ili kiseonika 2H-izohinolina-1-on) i akceptora vodonične veze u *meta* ili *para* položaju benzenovog prstena. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da uvođenje grupa koje imaju osobine akceptora vodoničnih veza u benzenov prsten značajno doprinosi efikasnoj ROCK2 inhibiciji.

Zaključak

Na osnovu svih prethodnih rezultata, može se pretpostaviti da su sljedeće strukturne karakteristike ključne za postizanje dualne ROCK1 i ROCK2 inhibitorne aktivnosti:

1. **Heterociklus sa atomom azota kao akceptorom vodonične veze**, što je potvrđeno pozitivnim uticajem promijenljivih:
 - var323 (DRY-N1: 13,2–13,6 Å) (ROCK1)
 - var328 (DRY-N1: 15,2–15,6 Å) (ROCK1)
 - var254 (DRY-O: 2,4–2,8 Å) (ROCK2)
 - var459 (O-N1: 10,0–10,4 Å) (ROCK2)
2. **Linker sa grupom koja je akceptor i donor vodonične veze (amidna grupa)**, čiji značaj je potvrđen promijenljivošću:
 - var459 (O-N1: 10,0–10,4 Å) (ROCK2)
3. **Benzenov prsten sa akceptorima vodoničnih veza kao supstituentima u *meta* ili *para* položaju**, usled uticaja promijenljivih:
 - var573 (N1-TIP: 20,4–20,8 Å) (ROCK1)
 - var383 (DRY-TIP: 14,0–14,4 Å) (ROCK1)
 - var164 (N1-N1: 19,2–19,6 Å) (ROCK1)
 - var597 (N1-TIP: 15,6–16,0 Å) (ROCK2)
 - var477 (O-N1: 17,2–17,6 Å) (ROCK2)

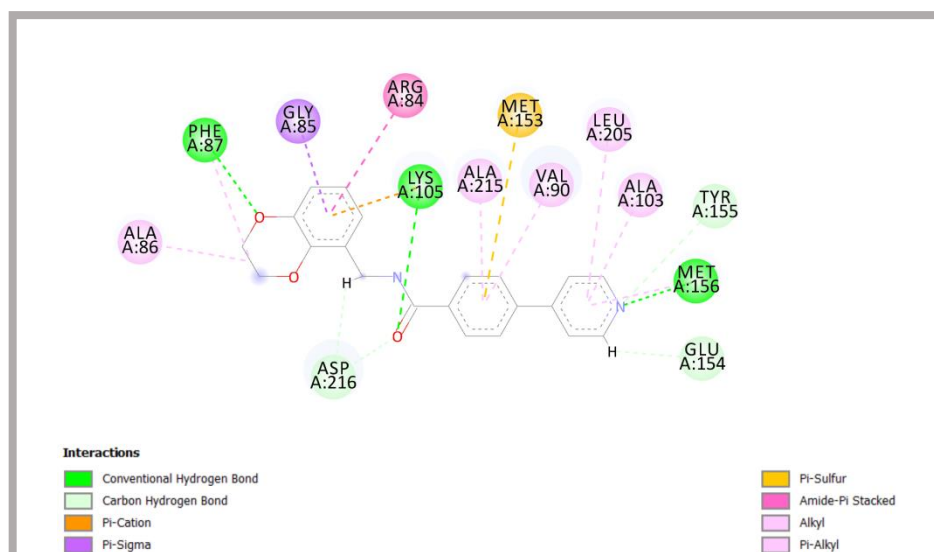
Ovi rezultati ukazuju na to da se dualna ROCK1/ROCK2 inhibicija može postići preciznim strukturnim dizajnom inhibitora, uz optimizaciju ključnih međumolekulskih interakcija i prostorne organizacije farmakofornih elemenata.

4.1.2. Rezultati studije molekuskog dokinga

Objekti doking procedure, sprovedene sa enzimima ROCK1 (PDB: 6E9W) i ROCK2 (PDB: 7JNT), se mogu smatrati validnim što je potvrđeno izračunavanjem RMSD vrijednosti za svaki od enzima (RMSD<2Å).

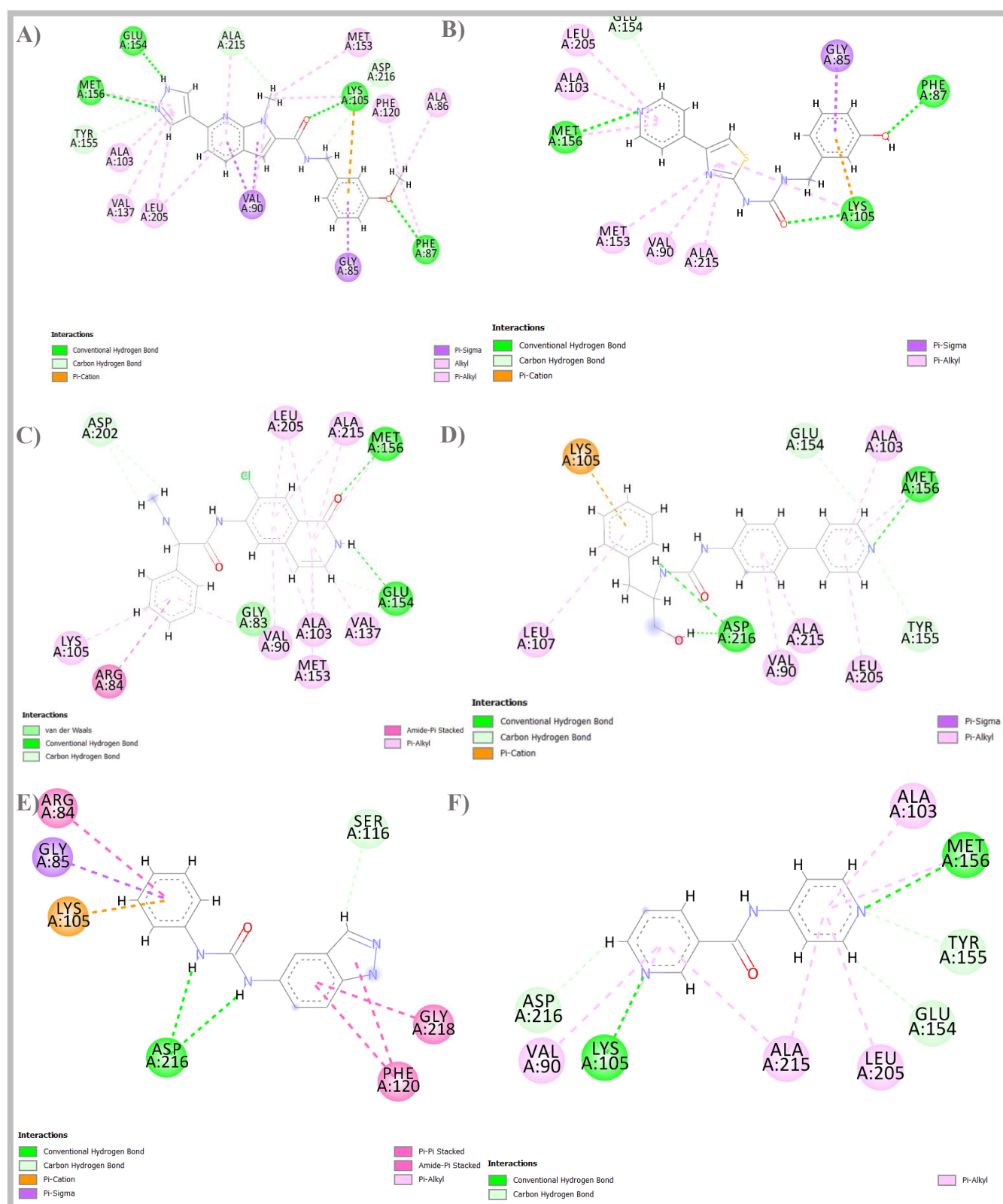
Atom azota piridinskog prstena u ko-kristalnom ligandu **JOP501** (ChemPLP vrijednost: 82,68, PDB: 6E9W) formira ključnu interakciju sa Met156 koja značajno doprinosi ROCK1 inhibiciji. Pored toga,

kompleks J0P501–ROCK1 je dodatno stabilizovan vodoničnim vezama: jednom između karbonilne grupe liganda i Lys105 i drugom između kiseonikovog atoma 1,4-dioksana i Phe87. Brojne hidrofobne interakcije sa aminokiselinским ostacima poput Leu205, Ala103, Val90, Ala215, Arg84, Met153 i Gly85 dodatno olakšavaju vezivanje J0P501 za aktivno mjesto ROCK1 (**Slika 22**).



Slika 22. 2D-prikaz ključnih interakcija ko-kristalnog liganda J0P501 i ROCK1 (PDB:6E9W).

Pirazolni fragment (*hinge*-vezujući domen) najaktivnijeg jedinjenja, CHEMBL1922035 ($pIC_{50} = 8,70$, ChemPLP vrijednost: 83,36, klaster IV – **Slika 23-A**), formira esencijalne vodonične veze sa Met156 i Glu154 koje značajno doprinose optimalnom usidravanju inhibitora u aktivnom mjestu ROCK1. Ove ključne interakcije (jedna ili obje) su dosljedno prisutne u ko-kristalnom ligandu J0P501 (**Slika 22**), kao i u drugim potentnim inhibitorima iz različitih klastera, uključujući RKI1447 ($pIC_{50} = 8,10$, ChemPLP vrijednost: 78,68, klaster II – **Slika 23-B**), CHEMBL1084892 ($pIC_{50} = 7,85$, ChemPLP vrijednost: 68,26, klaster I – **Slika 23-C**) i CHEMBL2023160 ($pIC_{50} = 5,85$, ChemPLP vrijednost: 64,36, klaster III – **Slika 23-D**). Nasuprot tome, najmanje aktivno jedinjenje iz trening seta, CHEMBL2023148 ($pIC_{50} = 3,80$, ChemPLP vrijednost: 60,97 – **Slika 23-E**), ne formira vodonične veze sa Glu154 i Met156. Ova korelacija sugerše da je formiranje vodoničnih veza između *hinge*-vezujućeg domena i Glu154 i/ili Met156 esencijalan element za efikasnu ROCK1 inhibiciju.



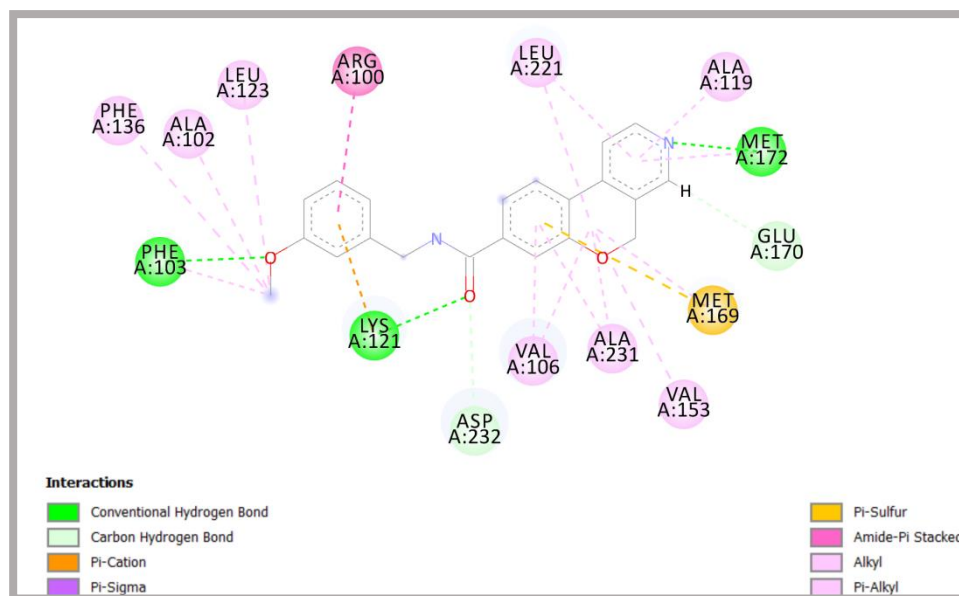
Slika 23: 2D-prikazi ključnih interakcija između: (A) CHEMBL1922035 i ROCK1 (PDB: 6E9W); (B) RKI1447 i ROCK1 (PDB: 6E9W); (C) CHEMBL1084892 i ROCK1 (PDB: 6E9W); (D) CHEMBL2023160 i ROCK1 (PDB: 6E9W); (E) CHEMBL2023148 i ROCK1 (PDB: 6E9W); (F) CHEMBL67352 i ROCK1 (PDB: 6E9W).

Kiseonik karbonilnog linkera i metoksi grupa na benzenovom prstenu jedinjenja CHEMBL1922035 formiraju vodonične veze sa Lys105 i Phe87, čime se dodatno poboljšava vezivanje ovog jedinjenja za enzim (**Slika 23-A**) što je u skladu sa vezivnom pozom ko-kristalnog liganda JOP501 (**Slika 22**). Vodonična veza sa Phe87 je prisutna i kod drugih visoko aktivnih inhibitora sa *meta*-supstituisanim benzenovim prstenom, kao što su RKI1447 ($pIC_{50} = 8,10$ – **Slika 23-B**), CHEMBL1922140 ($pIC_{50} = 8,22$), CHEMBL1922127 ($pIC_{50} = 8,05$) i CHEMBL1922128 ($pIC_{50} = 8,52$). Nasuprot tome, ova interakcija je odsutna kod najmanje aktivnih jedinjenja (CHEMBL2023148 ($pIC_{50} = 3,80$) – **Slika 23-E**; CHEMBL67352 ($pIC_{50} = 4,12$) – **Slika 23-F**), čiji benzenov prsten nije supstituisan grupom koja je akceptor vodonične veze, što ukazuje na pozitivnu korelaciju između elektron-donorske supstitucije i ROCK1 inhibicije.

Finalno, pri vezivanju inhibitora za aktivno mjesto ROCK1 su ostvarene brojne *Van der Waalsove* i π -sigma interakcije između pirazola, 7-azainodola, izohinolina ili benzenovog prstena i različitih aminokiselinskih ostataka, uključujući Ala103, Val137, Leu205, Met153, Phe120, Val90 i Gly85. Ovaj obrazac interakcija je sličan vezivanju ko-kristalnog liganda JOP501.

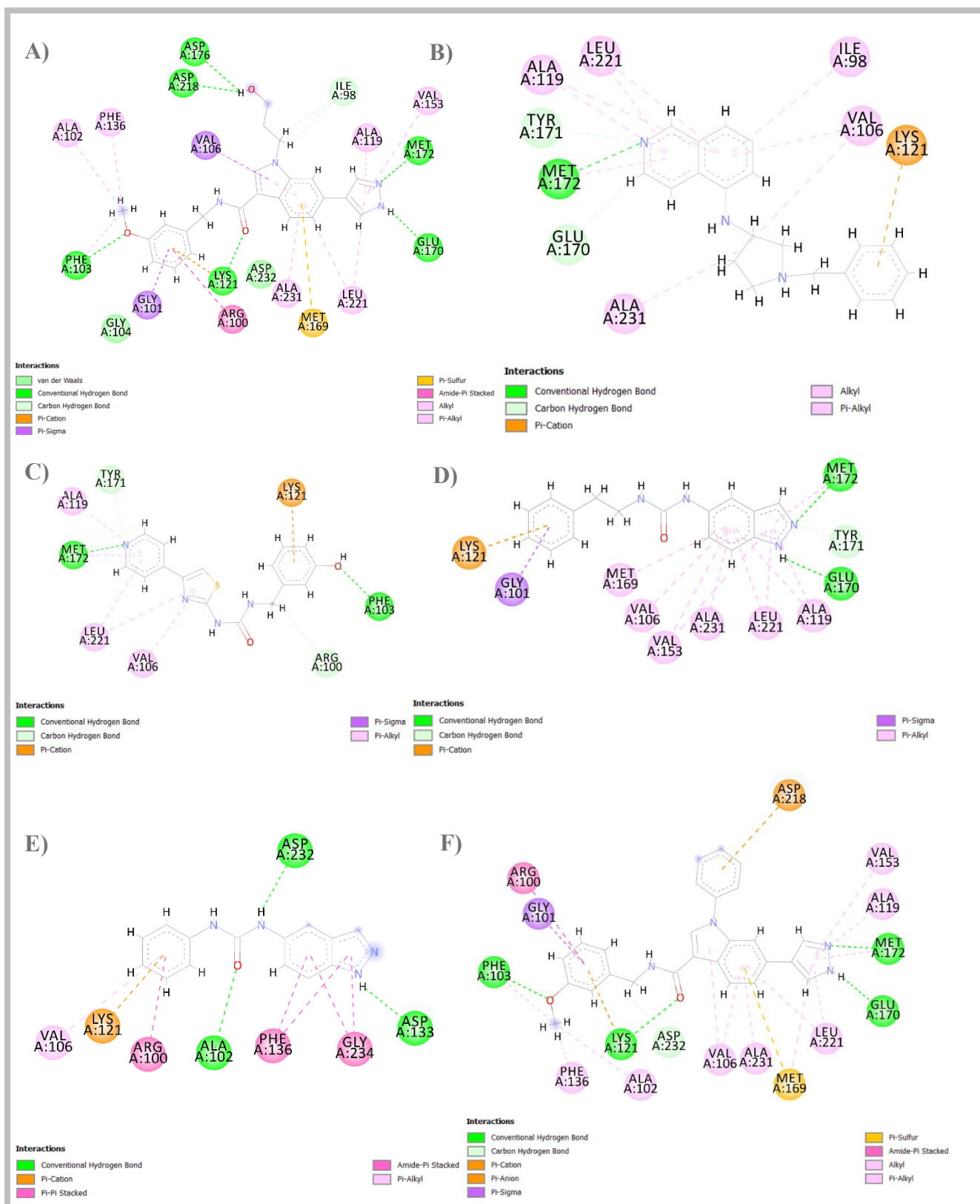
Neophodno je istaći da je kod pojedinih inhibitora, kao što su CHEMBL67352 (**Slika 23-F**) i CHEMBL2023147, zabilježena slabija ROCK1 inhibicija uprkos prisutvu vodoničnih veza između *hinge*-vezujućeg domena i aminokiselinskih ostataka. Ovo nas dovodi do zaključka da odsustvo vodoničnih veza i π -sigma interakcija sa linkerom ili benzenovim prstenom može rezultirati smanjenjem aktivnosti ROCK1 inhibitora, što implicira da se i ove interakcije moraju uzeti u razmatranje pri dizajniranju novih ROCK1 inhibitora.

Ko-kristalni ligand enzima ROCK2 – VFA501 (ChemPLP vrijednost: 82,46, PDB: 7JNT) ostvaruje vodoničnu vezu sa Met172 koja se smatra ključnom za ROCK2 inhibiciju (**Slika 24**). Pored toga, formiraju se dvije dodatne vodonične veze između VFA501 i ROCK2: jedna između karbonilne grupe linkera i Lys121, a druga između metoksi grupe benzenovog prstena i Phe103. Opisane su brojne *Van der Waalsove* interakcije između VFA501 i različitih aminokiselinskih ostataka, kao što su Val106, Val153, Met169, Ala119, Leu221, Arg100, Phe136, Ala102 itd., koje pozitivno korelišu sa ROCK2 inhibicijom (**Slika 24**).



Slika 24. 2D-prikaz ključnih interakcija ko-kristalnog liganda VFA501 i ROCK2 (PDB:7JNT).

Najaktivnije jedinjenje u trening setu za ROCK2, ChEMBL1922128, koje pripada klasteru IV ($pIC_{50} = 9,00$, ChemPLP vrijednost: 93,01), formira dvije ključne vodonične veze između *hinge*-vezujućeg domena (azotovi atomi pirazola) i aminokiselinskih ostataka Met172 i Glu170, što je u skladu sa načinom vezivanja ko-kristalnog liganda VFA501 (**Slike 24 i 25-A**). Vodonične veze između *hinge*-vezujućeg domena (azotnih atoma izohinolina, piridina ili indazola) i Met172 i/ili Glu170 su prisutne i kod drugih visoko aktivnih jedinjenja iz različitih klastera, uključujući ChEMBL3689470 ($pIC_{50} = 7,13$, ChemPLP vrijednost: 76,20, klaster I – **Slika 25-B**), RKI1447 ($pIC_{50} = 8,21$, ChemPLP vrijednost: 79,26, klaster II – **Slika 25-C**) i ChEMBL2023154 ($pIC_{50} = 6,17$, ChemPLP vrijednost: 67,13 – **Slika 25-D**). Nasuprot tome, najmanje aktivno jedinjenje u trening setu – ChEMBL2023148 ($pIC_{50} = 4,21$, ChemPLP vrijednost: 50,26 – **Slika 25-E**) nije ostvarilo vodoničnu vezu sa Met172 ili Glu170, što dodatno naglašava značaj ovih interakcija za ROCK2 inhibiciju.



Slika 25: 2D-prikazi ključnih interakcija između: (A) CHEMBL1922128 i ROCK2 (PDB: 7JNT); (B) CHEMBL3689470 i ROCK2 (PDB: 7JNT); (C) RKI1447 i ROCK2 (PDB: 7JNT); (D) CHEMBL2023154 i ROCK2 (PDB: 7JNT); (E) CHEMBL2023148 i ROCK2 (PDB: 7JNT) (F) ChEMBL1922125 i ROCK2 (PDB: 7JNT).

Metoksi grupa u *meta*-položaju benzenovog prstena (ChEMBL1922128 – **Slika 25-A**) formira vodoničnu vezu sa Phe103. Ova interakcija je prisutna i kod drugih visoko aktivnih jedinjenja, kao što su ChEMBL1922125 ($pIC_{50} = 8,30$, ChemPLP vrijednost: 90,84 – **Slika 25-F**) i RKI1447 ($pIC_{50} = 8,21$ – **Slika 25-C**), kao i kod ko-kristalnog liganda VFA501 (**Slika 24**). Pored toga, metoksi grupa benzenovog prstena učestvuje u hidrofobnim interakcijama sa P-petljom (*P-loop*) ROCK2 kinaze koja uključuje aminokiselinske ostatke Ala102, Phe103, Leu123 i Phe136. Ove interakcije su u skladu sa vezivnom pozama ko-kristalnog liganda (**Slika 24**) i najaktivnijih jedinjenja u trening setu koja imaju pIC_{50} iznad 8,00 (npr. ChEMBL1922128, ChEMBL1922034, ChEMBL1922042, ChEMBL1922125, RKI1447, ChEMBL1922043). Značajno je da vodonične veze sa Phe103 izostaju kod najmanje aktivnih molekula (npr. ChEMBL2023148 – **Slika 25-E**, ChEMBL2023161, ChEMBL2023159), vjerovatno zbog odsustva supstituenata koji su akceptori vodonika na benzenovom prstenu. Ovi rezultati ukazuju da *meta*-supstitucija benzenovog prstena može igrati ključnu ulogu u inhibiciji ROCK2 doprinoseći usidraivanju inhibitora u aktivnom mjestu enzima putem hidrofobnih interakcija sa P-petljom i vodoničnih veza.

Finalno, dodatna vodonična veza je identifikovana između kiseonikovog atoma karbonilne grupe u linkeru najaktivnijeg jedinjenja ChEMBL1922128 i Lys121 (**Slika 25-A**). Slične vodonične veze su formirane i kod drugih visoko aktivnih jedinjenja, npr. RKI1447 (**Slika 25-C**), gdje azotni atom ureido grupe formira vodoničnu vezu sa Lys121, kao i između ko-kristalnog liganda VFA501 i ROCK2 (**Slika 24**). Ovi rezultati naglašavaju da je za efikasnu ROCK2 inhibiciju značajno prisustvo grupa koje su donori vodonika u linker regionu molekula

4.1.3. Dizajn novih potencijalnih ROCK inhibitora

Na osnovu rezultata dobijenih primjenom 3D-QSAR modelovanja za ROCK1 i ROCK2, kao i analizom rezultata molekulskog dokinga, može se zaključiti da inhibicija ovih kinaza u značajnoj mjeri zavisi od prisustva strukturne jedinice sposobne za interakciju sa *hinge* regionom aktivnog mjesta enzima. Konkretno, heterociklični sistemi sa funkcionalnim grupama koje su akceptori vodoničnih veza predstavljaju ključne farmakoforne elemente za inhibiciju ROCK1 i ROCK2, što potvrđuju promijenljive **var323** (ROCK1), **var328** (ROCK1), **var254** (ROCK2) i **var459** (ROCK2). Dalje, rezultati molekulskog dokinga nedvosmisleno ukazuju da je formiranje vodoničnih veza između *hinge*-vezujućeg domena i ključnih aminokiselinskih ostataka (Glu154 i Met156 kod ROCK1, Glu170 i Met172 kod ROCK2) neophodno za ostvarivanje inhibitornog efekta.

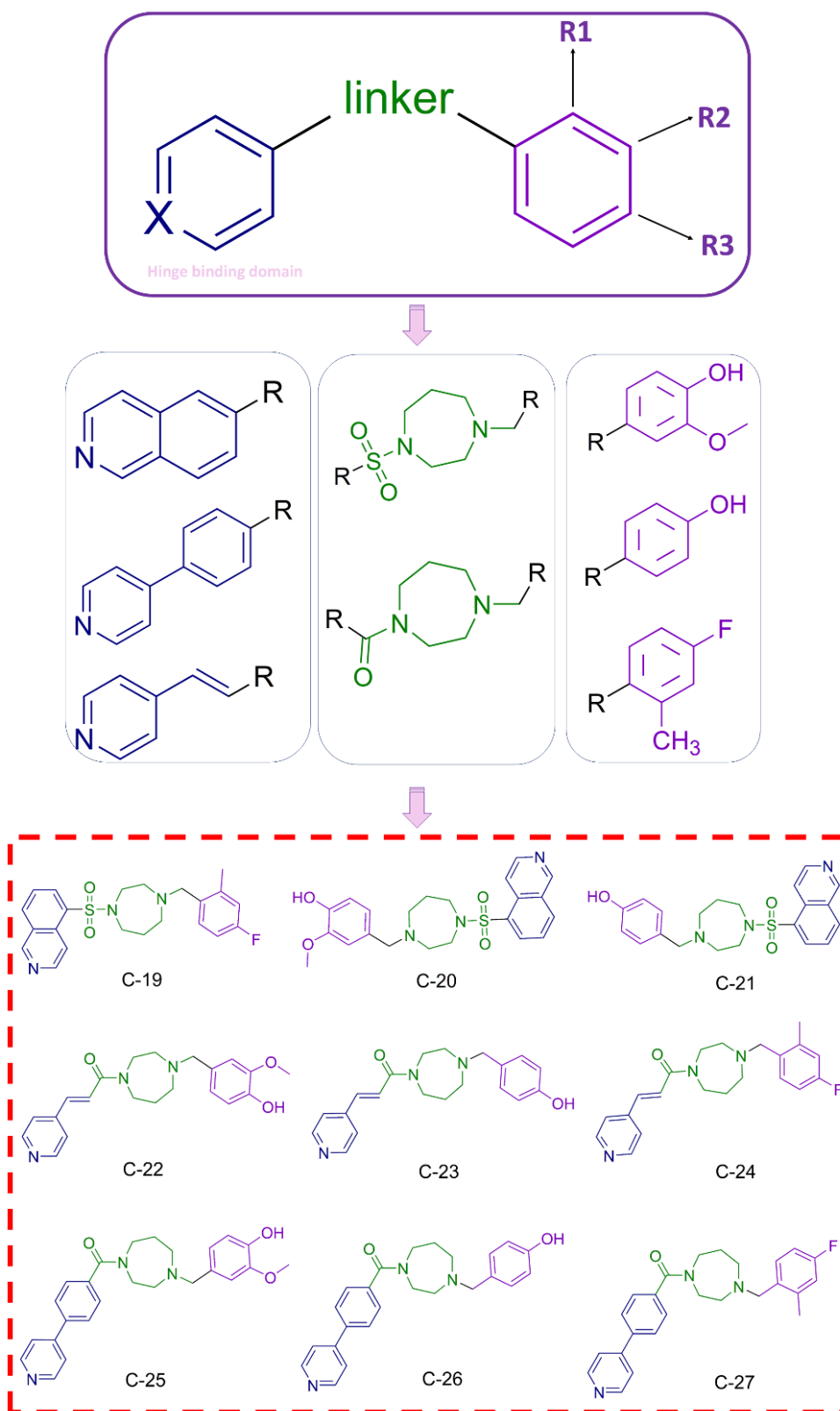
Pored *hinge*-vezujuće jedinice, prisustvo linkera koji sadrži funkcionalne grupe sposobne za doniranje ili prihvatanje vodoničnih veza dodatno doprinosi povećanju inhibitorne aktivnosti prema ROCK1 i ROCK2. Ovaj efekat je potvrđen analizom pozitivnog uticaja **var459** (ROCK2), kao i formiranjem vodoničnih veza sa ključnim aminokiselinama, uključujući Lys105 i Asp232 kod ROCK1 i Lys121 kod ROCK2. Nadalje, prisustvo benzenovog prstena u linker regiji dovodi do povećanja inhibitorne aktivnosti jedinjenja zahvaljujući formiranju hidrofobnih interakcija sa aminokiselinskim ostacima kao što su Ala103, Val137, Leu205, Met153, Phe120, Val90 i Gly85 kod ROCK1, te sa P-petljom kod ROCK2. Ove korelacije između strukture linkera i inhibitorne aktivnosti su dodatno potvrđene 3D-QSAR modelom za ROCK1, koji ukazuje da optimalno prostorno raspoređivanje vodonik-akceptorske grupe unutar heterociklusa i benzenovog prstena pozitivno utiče na aktivnost inhibitora, što se ogleda kroz promijenljive **var323** i **var328**. Sličan efekat je potvrđen i u slučaju 3D-QSAR (ROCK2) modela, gdje promijenljiva **var355** ukazuje na povoljan uticaj ovih strukturnih elemenata.

Modifikacija benzenovog prstena uvođenjem vodonik-akceptorskih supstituenata može značajno doprinijeti povećanju inhibitorne aktivnosti jedinjenja putem formiranja vodoničnih veza sa Phe87 kod ROCK1 i Phe103 kod ROCK2. Ova pozitivna korelacija između *meta*- i *para*-supstitucije benzenovog prstena i inhibitorne aktivnosti je potvrđena 3D-QSAR modelima, naročito kroz pozitivan uticaj promijenljivih **var573**, **var383** i **var164** kod ROCK1, odnosno **var597** i **var477** kod ROCK2.

Na osnovu integrisanih rezultata dobijenih 3D-QSAR analizama i dokingom dizajnirana je serija novih potencijalnih inhibitora ROCK enzima, prikazana na **Slici 26**. Pri selekciji *hinge*-vezujućeg domena uzeti su u obzir izohinolin, piridin i 4-fenil-piridin grupe, s obzirom na njihovu sposobnost formiranja vodoničnih veza putem heteroatoma azota što je u saglasnosti sa teorijskim predikcijama dobijenim računarsko-hemijskim metodama. Ove jedinice su povezane sa linkerom koji sadrži kako donorske (amidna azotna grupa), tako i akceptorske (karbonilna grupa) funkcionalne elemente, čime se dodatno osigurava njihova efikasna interakcija sa aktivnim mjestima enzima ROCK1 i ROCK2.

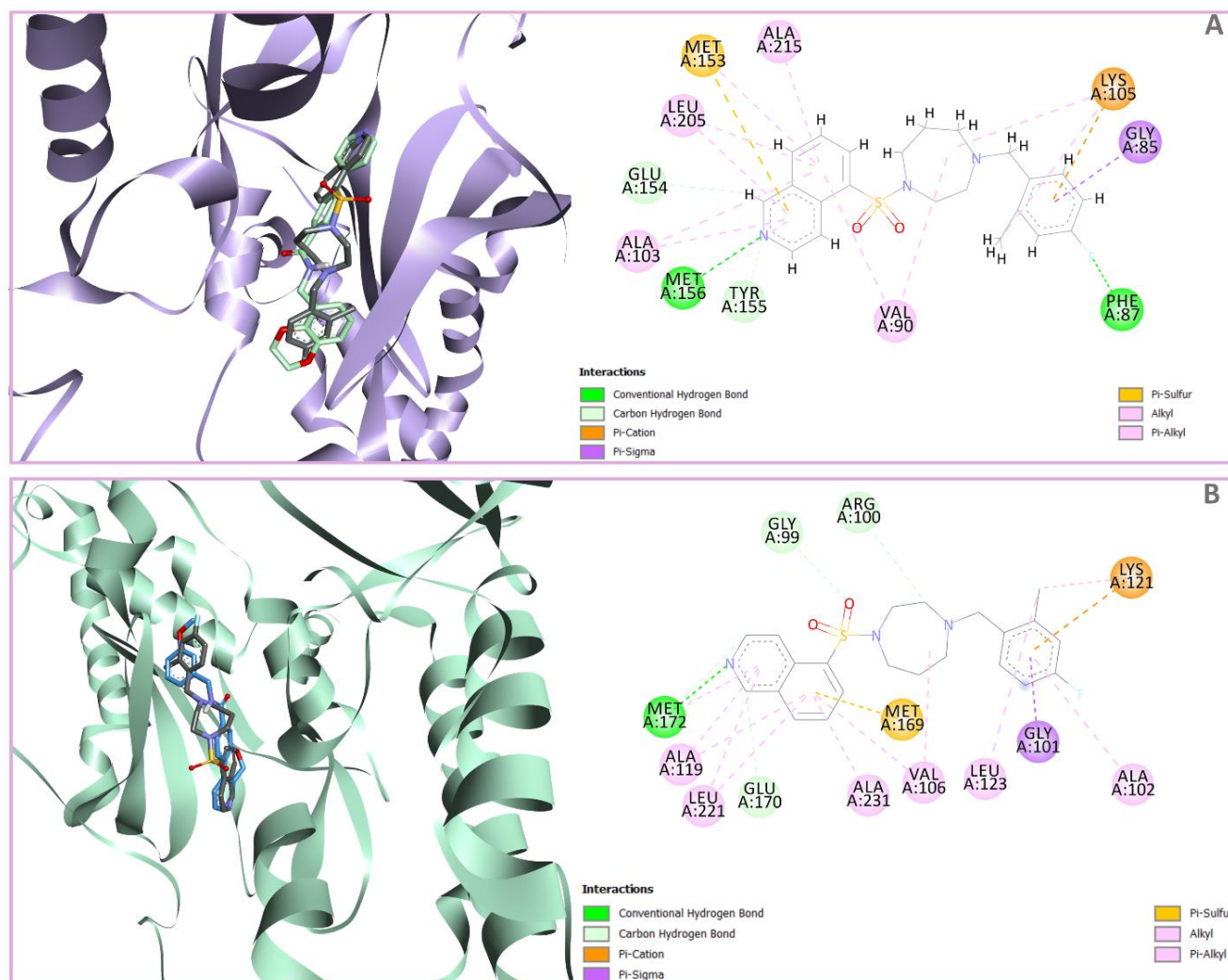
Takođe, inkorporacija benzenovog prstena unutar linker regije ima za cilj povećanje inhibitornog potencijala jedinjenja putem hidrofobnih interakcija sa ključnim aminokiselinskim ostacima u aktivnom mjestu ROCK1 (Ala103, Val137, Leu205, Met153, Phe120, Val90 i Gly85) i ROCK2 (P-petlja). Eksperimentalni i računarski podaci takođe ukazuju da supstituenti sa akceptorskim svojstvima na benzenovom prstenu mogu dodatno pojačati inhibitorni potencijal jedinjenja. Uzročno-posledično je predložena funkcionalizacija benzenovog prstena uvođenjem fluoro, hidroksi i metoksi grupa na različitim *meta*- i *para*-pozicijama, čime se omogućava efikasno formiranje vodoničnih veza sa ciljnim aminokiselinskim ostacima.

Kao rezultat ovog racionalnog dizajna razvijeno je devet novih potencijalnih ROCK inhibitora, čiji je strukturni dizajn prikazan na **Slici 26**.



Slika 26. Dizajn novih ROCK inhibitora, *hinge*-vezujući domen je obilježen plavo, linker zeleno i supstituisani benzenov prsten ljubičasto.

Načini vezivanja i ključne interakcije dizajniranih jedinjenja su evaluirani pomoću studija molekulskog dokinga na obje ROCK izoforme. **Slika 27.** ilustruje način vezivanja i ključne interakcije jednog od dizajniranih molekula, **C-19**. Sva dizajnirana jedinjenja su formirala vodoničnu vezu između azotovog atoma *hinge*-vezujućeg domena (azotov atom heterociklusa) i aminokiselinog ostatka Met156 u ROCK1 ili Met172 u ROCK2, koja je od suštinskog značaja za ROCK1/ROCK2 inhibiciju.



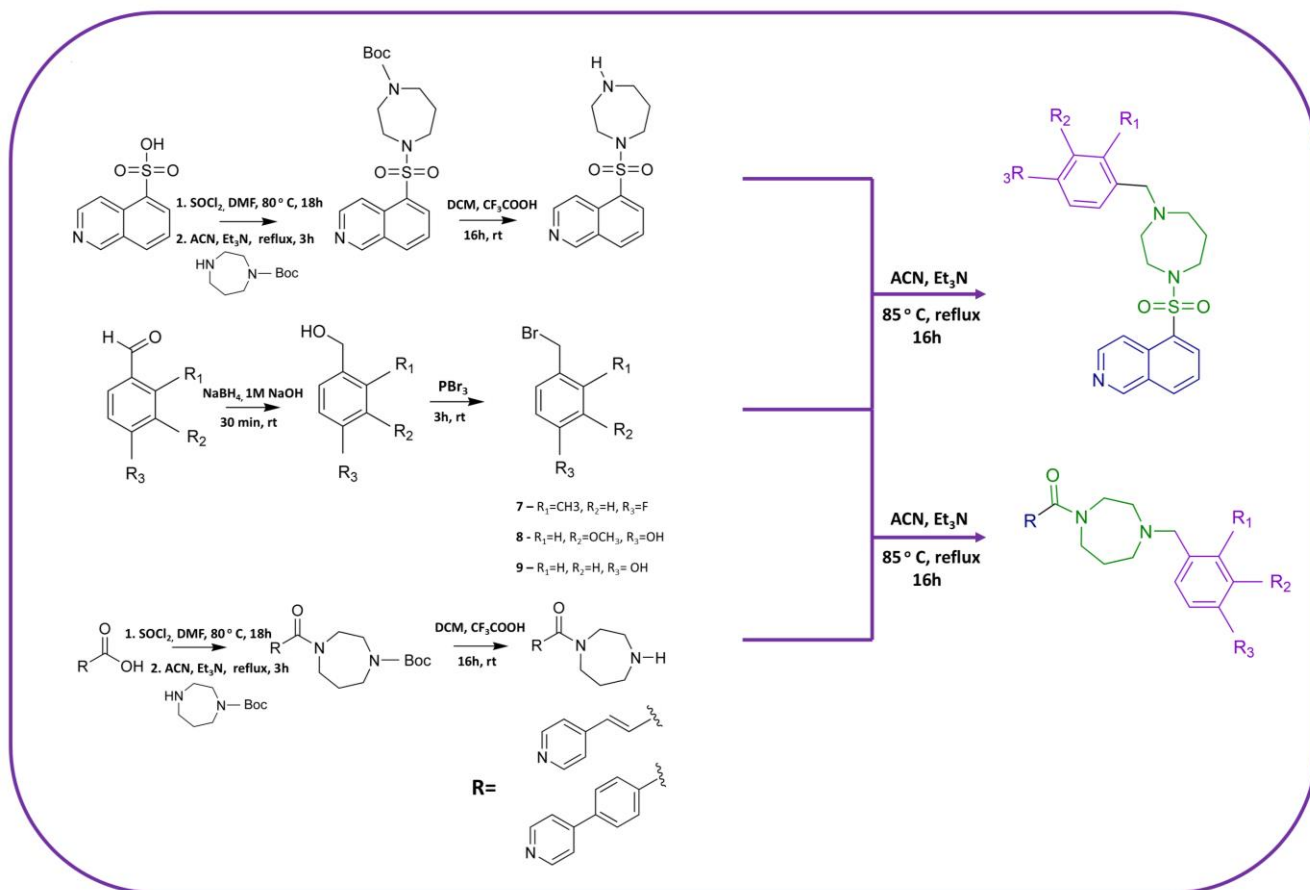
Slika 27. A. Položaj vezivanja dizajniranog ROCK inhibitora **C-19** (siva boja) sa ChemPLP vrijednošću od 80,32 i ko-kristalnog liganda J0P501 (zeleno) sa ChemPLP vrijednošću od 82,68, u aktivnom mjestu ROCK1 (lijevo), zajedno sa 2D prikazom ključnih interakcija između **C-19** i ROCK1 (desno). **B.** Položaj vezivanja **C-19** (siva boja) sa ChemPLP vrijednošću od 82,82 i ko-kristalnog liganda VFA501 (plavo) sa ChemPLP vrijednošću od 82,46, u aktivnom mjestu ROCK2 (lijevo), uz 2D dijagram koji ističe ključne interakcije između **C-19** i ROCK2 (desno).

4.2. Sinteza i karakterizacija dizajniranih ROCK inhibitora

Dizajnirani ROCK inhibitori su sintetisani korišćenjem sintetskih puteva prikazanih na **Slici 28**. Derivati homopiperazina su dobijeni reakcijom izohinolin-5-sulfonske kiseline, 3-(4-piridil)akrilne kiseline ili 4-(4-piridil)benzojeve kiseline sa homopiperazinom, pri čemu su korišćeni optimizovani reakcioni uslovi kako bi se postigla maksimalna efikasnost konverzije.

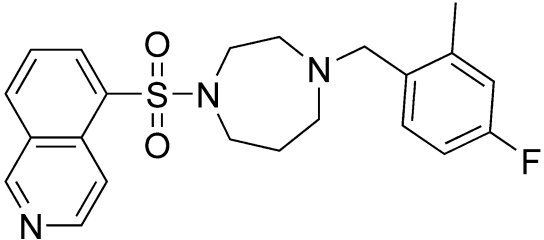
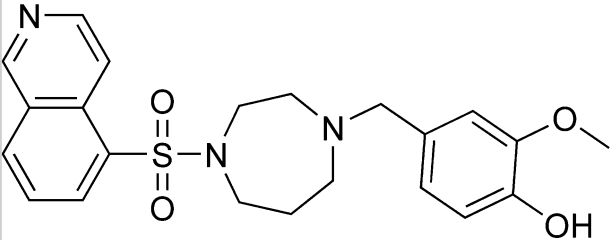
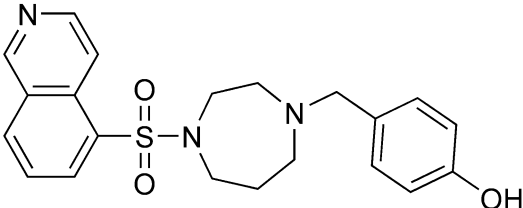
Derivati benzil bromida su sintetisani iz odgovarajućih benzaldehida u dvostepenom procesu, koji je uključivao početnu redukciju do alkohola upotrebom natrijum-borohidrida (NaBH_4), nakon čega je slijedila nukleofilna supstitucija pomoću fosfor-tribromida (PBr_3). Ovim postupkom su dobijeni intermedijeri visoke čistoće, što je omogućilo njihovu dalju upotrebu u sintezi finalnih jedinjenja.

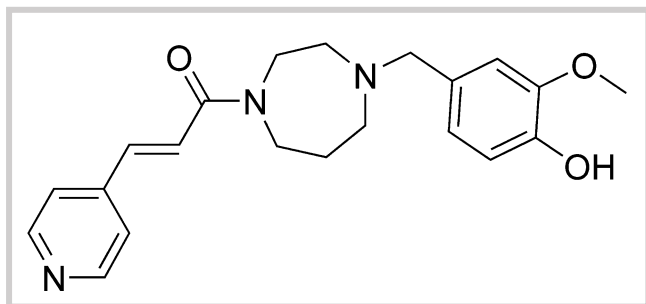
Ciljani ROCK inhibitori su dobijeni reakcijom nukleofilne supstitucije između derivata homopiperazina i odgovarajućih benzil bromida, pri čemu su finalni proizvodi izolovani u umjerenim prinosima (30-50%). Nakon sinteze, jedinjenja su prečišćena fleš hromatografijom na koloni silica gela primjenom gradijentnog sistema eluiranja: 100% DCM, a zatim smješa DCM:metanol u odnosu 9:1, čime je postignut visok stepen čistoće. Struktura dobijenih jedinjenja je potvrđena spektroskopskim metodama, uključujući nuklearnu magnetnu rezonancu (NMR) i masenu spektrometriju, čiji su detaljni rezultati prikazani u okviru **Tabele 5**. Slike ^1H i ^{13}C spektara su prikazane u **Prilogu 2**.



Slika 28. Šema sinteze potencijalnih ROCK inhibitora čije su strukture predstavljane na Slici 26. Hinge-vezujući domen je označen plavom, linker zelenom, a supstituisani benzenov prsten ljubičastom bojom.

Tabela 5. Strukturna karakterizacija potencijalnih ROCK inhibitora

Jedinjenje	Karakterizacija finalnih potencijalnih ROCK inhibitora
C-19  Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri D; m=23,6 mg, 34,4% prinos	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,35 (s, 1H), 8,68 (d, <i>J</i> = 6,1 Hz, 1H), 8,46 (d, <i>J</i> = 6,1 Hz, 1H), 8,34 (d, <i>J</i> = 7,4 Hz, 1H), 8,18 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H), 7,68 (t, <i>J</i> = 7,8 Hz, 1H), 7,18 – 7,07 (m, 1H), 6,86 – 6,76 (m, 2H), 3,51 – 3,43 (m, 6H), 2,66 (dd, <i>J</i> = 10,3, 5,1 Hz, 4H), 2,29 (s, 3H), 1,85 – 1,79 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 163,1, 160,6, 153,2, 145,1, 139,8, 139,8, 134,6, 133,3, 133,0, 132,6, 132,5, 131,7, 131,1, 131,0, 129,2, 125,8, 125,5, 117,7, 117,1, 116,9, 112,1, 111,9, 59,5, 55,8, 54,3, 48,4, 46,8, 30,3, 28,5, 19,3, 19,2. HRMS-ESI (m/z) izračunato za C₂₂H₂₄FN₃O₂S [M + H]⁺: 414,16460; izmjereno: 414,16389.
C-20  Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri D; m=19,7 mg, 37,7% prinos	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,35 (s, 1H), 8,68 (d, <i>J</i> = 6,1 Hz, 1H), 8,46 (d, <i>J</i> = 6,1 Hz, 1H), 8,35 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 1H), 8,19 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 1H), 7,68 (t, <i>J</i> = 7,8 Hz, 1H), 6,83-6,81 (m, 2H), 6,71 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,54 – 3,45 (m, 6H), 2,67 (d, <i>J</i> = 5,1 Hz, 4H), 1,88 – 1,82 (m, 2H), ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 153,2, 146,6, 145,0, 144,8, 134,6, 133,3, 133,0, 131,7, 130,7, 129,2, 125,8, 121,6, 117,7, 114,0, 111,2, 61,8, 55,9, 55,6, 54,4, 48,2, 46,8, 29,7, 28,4.
C-21  Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri D; m=19,4 mg, 38,5% prinos	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/MeOD=4:1) δ 9,32 (s, 1H), 8,61 (d, <i>J</i> = 6,2 Hz, 1H), 8,49 (d, <i>J</i> = 6,1 Hz, 1H), 8,37 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 1H), 8,27 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H), 7,76 (t, <i>J</i> = 7,8 Hz, 1H), 7,06 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H), 6,75 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H), 3,51 (dd, <i>J</i> = 10,5, 4,5 Hz, 6H), 2,66 (d, <i>J</i> = 4,8 Hz, 4H), 1,91 – 1,83 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃/MeOD=4:1) δ 157,8, 154,6, 145,7, 136,1, 135,3, 135,1, 133,5, 132,0, 131,0, 130,2, 128,0, 119,8, 116,7, 63,2, 57,2, 55,7, 49,3, 48,4, 31,3, 29,5.

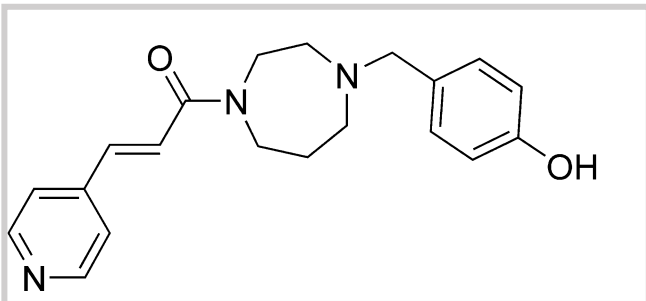
C-22

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri D; m=19,6 mg, 37,7% prinos

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,63 (s, 2H), 7,60 (dd, *J* = 15,5, 7,8 Hz, 1H), 7,36 (dd, *J* = 9,7, 5,5 Hz, 2H), 7,02 (dd, *J* = 19,7, 15,5 Hz, 1H), 6,86 (dd, *J* = 13,6, 6,4 Hz, 2H), 6,77 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 3,87-3,85 (m, 3H), 3,77-3,66 (m, 4H), 3,57 (d, *J* = 4,0 Hz, 2H), 2,74 (s, 2H), 2,66 (d, *J* = 4,7 Hz, 2H), 1,97 – 1,89 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165,5, 165,4, 150,4, 146,7, 146,6, 144,9, 142,7, 139,7, 139,5, 130,7, 122,4, 122,3, 121,7, 121,6, 114,1, 111,3, 111,2, 62,3, 62,2, 55,9, 55,9, 55,7, 55,2, 55,0, 54,1, 48,2, 47,2, 46,1, 45,2, 28,7, 27,2.

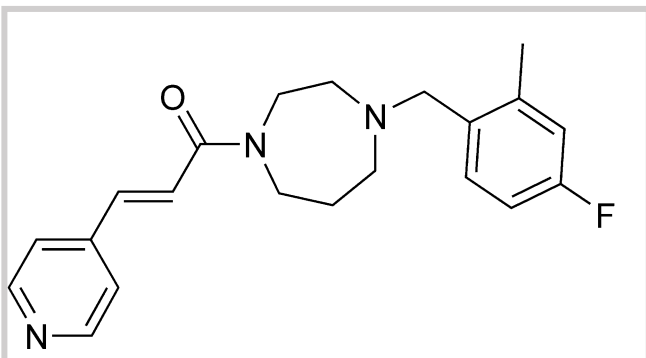
HRMS-ESI (m/z) izračunato za C₂₁H₂₅N₃O₃ [M + H]⁺: 368,19687; izmjereno: 368,19608.

C-23

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri D; m=15,2 mg, 35,5% prinos

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,62 (d, *J* = 4,8 Hz, 2H), 7,58 (dd, *J* = 15,1, 10,9 Hz, 1H), 7,43 – 7,33 (m, 2H), 7,14 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,02 (dd, *J* = 18,2, 16,1 Hz, 1H), 6,79 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 3,85 – 3,45 (m, 6H), 2,77-2,65 (m, 4H), 1,95 (d, *J* = 4,9 Hz, 2H).

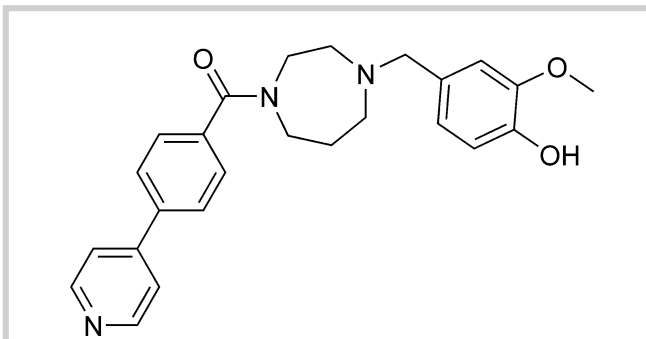
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165,7, 165,6, 156,2, 150,1, 149,9, 143,1, 142,9, 139,8, 139,5, 130,4, 130,2, 129,4, 122,7, 122,4, 122,0, 121,9, 115,4, 62,0, 61,9, 55,6, 54,9, 54,8, 54,2, 48,0, 47,2, 45,9, 45,3, 28,4, 27,1.

C-24

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri D; m=23,7 mg, 33,9% prinos

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,62 (s, 2H), 7,59 (dd, *J* = 15,5, 9,8 Hz, 1H), 7,35 (dd, *J* = 11,4, 5,6 Hz, 2H), 7,19 (dd, *J* = 14,1, 6,1 Hz, 1H), 7,01 (dd, *J* = 23,3, 15,5 Hz, 1H), 6,88 – 6,80 (m, 2H), 3,79 – 3,61 (m, 4H), 3,54 (s, 2H), 2,72 (d, *J* = 4,8 Hz, 2H), 2,66 – 2,60 (m, 2H), 2,34 (s, 3H), 1,90 (d, *J* = 4,9 Hz, 2H).

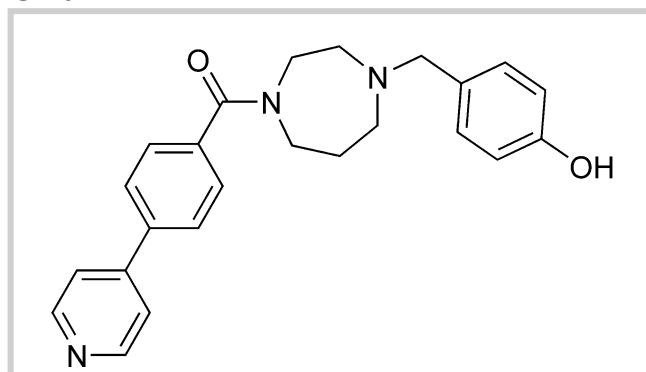
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165,5, 165,4, 163,1, 160,7, 150,5, 142,6, 139,9, 139,9, 139,8, 139,7, 139,6, 132,7, 132,5, 131,1, 131,0, 122,4, 122,3, 121,7, 121,7, 117,2, 117,1, 117,0, 116,9, 112,2, 112,1, 111,9, 111,9, 59,9, 59,7, 55,9, 55,4, 54,8, 54,0, 48,3, 47,2, 46,2, 45,3, 28,8, 27,2.

C-25

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri D; m=24,1 mg, 46,5% prinos

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,68 (d, *J* = 4,1 Hz, 2H), 7,66 (dd, *J* = 11,3, 8,2 Hz, 2H), 7,57 – 7,47 (m, 4H), 6,93 – 6,73 (m, 3H), 3,91 – 3,81 (m, 5H), 3,65 – 3,47 (m, 4H), 2,83 (m, 1H), 2,78 – 2,72 (m, 1H), 2,61 (d, *J* = 4,9 Hz, 2H), 2,02 – 1,99 (m, 1H), 1,85 – 1,79 (m, 1H).

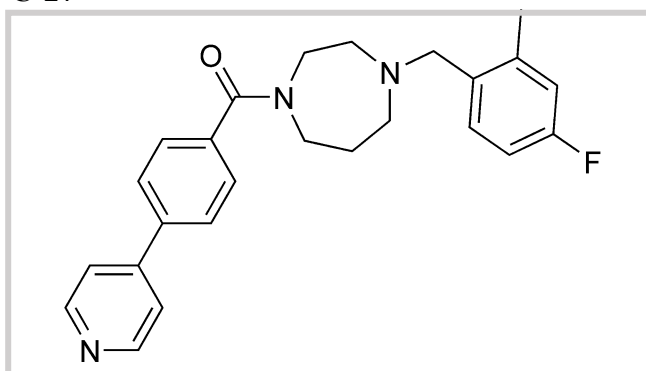
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170,9, 170,8, 150,3, 147,5, 146,6, 144,9, 139,0, 137,6, 127,6, 127,5, 127,1, 121,6, 114,0, 111,3, 111,1, 62,4, 62,2, 55,9, 55,8, 55,7, 54,6, 53,9, 49,9, 48,8, 45,5, 27,0.

C-26

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri D; m=15,3 mg, 31,9% prinos

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,68 (s, 2H), 7,66 (dd, *J* = 13,6, 8,0 Hz, 2H), 7,51 (dd, *J* = 13,7, 8,3 Hz, 4H), 7,19 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,13 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,82 – 6,73 (m, 2H), 3,80 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 3,66 – 3,45 (m, 4H), 2,91 – 2,79 (m, 1H), 2,79 – 2,70 (m, 1H), 2,70 – 2,63 (m, 1H), 2,63 – 2,56 (m, 1H), 2,03 – 1,97 (m, 1H), 1,88 – 1,79 (m, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 170,3, 170,3, 155,4, 147,8, 146,7, 137,3, 137,2, 135,8, 135,6, 129,1, 128,7, 127,9, 125,8, 125,8, 125,5, 120,3, 113,3, 113,2, 59,8, 59,7, 53,5, 53,4, 52,2, 51,7, 43,6, 43,1, 25,8, 24,7.

C-27

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri D; m=14,9 mg, 39,7% prinos

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,68 (d, *J* = 4,5 Hz, 2H), 7,66 (dd, *J* = 15,7, 7,9 Hz, 2H), 7,56 – 7,46 (m, 4H), 7,25 – 7,12 (m, 1H), 6,89 – 6,78 (m, 2H), 3,84 – 3,76 (m, 2H), 3,58 – 3,46 (m, 4H), 2,83 – 2,79 (m, 1H), 2,75 – 2,71 (m, 1H), 2,59 (d, *J* = 4,3 Hz, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,00 – 1,93 (m, 1H), 1,82 – 1,75 (m, 1H).

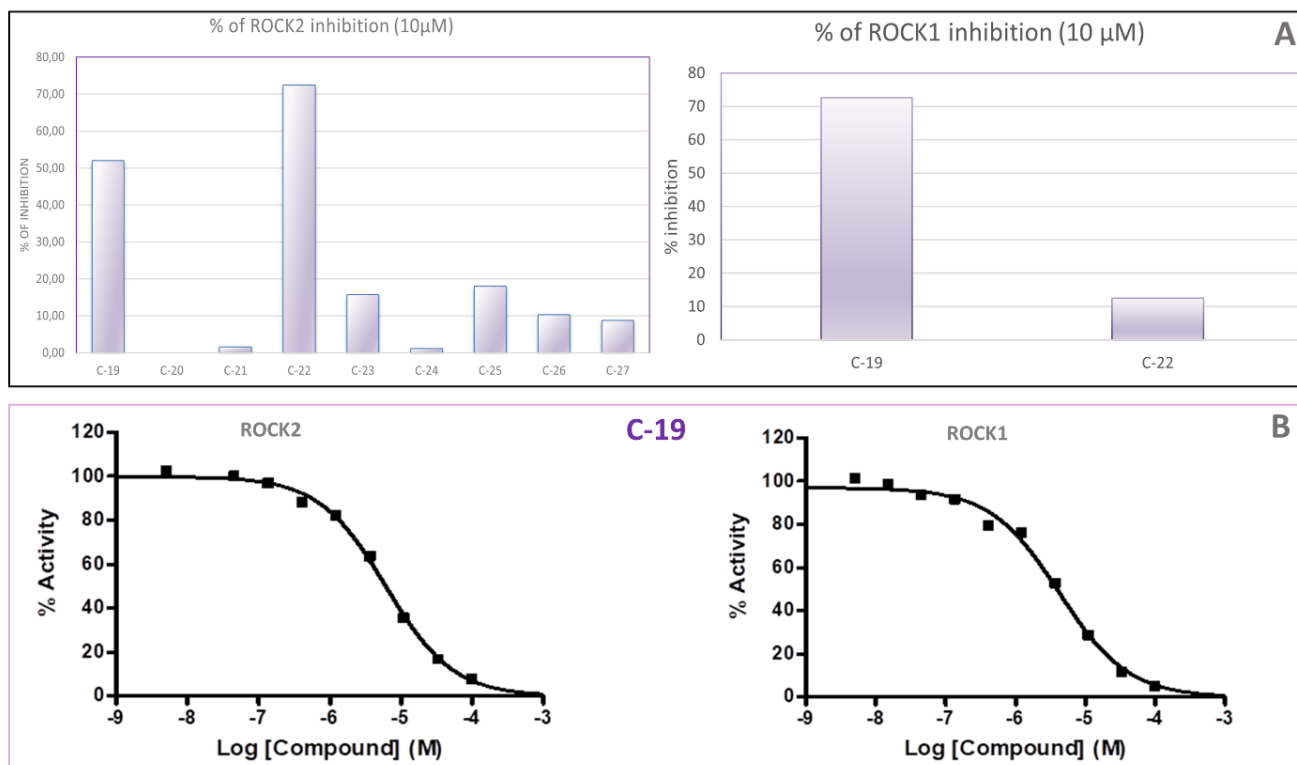
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170,9, 170,8, 163,1, 160,7, 150,4, 147,4, 139,9, 139,8, 139,0, 137,6, 132,5, 131,1, 131,0, 127,5, 127,1, 121,6, 117,2, 117,0, 112,1, 111,9, 59,9, 59,8, 55,9, 55,8, 54,8, 53,8, 49,9, 48,9, 46,2, 45,6, 29,1, 27,1, 19,3.

4.3. Rezultati *in vitro* enzimske evaluacije potencijalnih ROCK inhibitora

Sintetisani ROCK inhibitori su podvrgnuti evaluaciji njihove inhibitorne aktivnosti prema ROCK1 i ROCK2 izoformama korišćenjem komercijalnog *in vitro* biohemijskog testa. U početnoj fazi istraživanja je sproveden preliminarni skrining u cilju procjene inhibitornog efekta sintetisanih jedinjenja na ROCK2, pri čemu su eksperimenti izvedeni pri fiksnoj koncentraciji inhibitora od 10 μ M (Slika 29-A).

Rezultati preliminarnog skrininga su pokazali da su od svih testiranih jedinjenja samo dva, **C-19** i **C-22**, ispoljila značajnu inhibitornu aktivnost prema ROCK2, sa stepenom inhibicije od 52,03%, odnosno 72,45%. Na osnovu ovih rezultata, ova dva jedinjenja su podvrgnuta daljoj evaluaciji sa ciljem ispitivanja njihove aktivnosti prema ROCK1. Jedinjenje **C-19** je pokazalo izraženu inhibiciju ROCK1 sa vrijednošću od 72,64%, dok je jedinjenje **C-22** ispoljilo značajno nižu aktivnost, pri čemu je procenat inhibicije iznosio 27,36% (Slika 29-A).

Nakon potvrde ROCK1 i ROCK2 inhibicije u preliminarnom skriningu, određene su IC₅₀ vrijednosti za jedinjenje **C-19**, koje su ukazale na umjerenu inhibitornu aktivnost prema obje ROCK izoforme: **4,22 μ M** za ROCK1 i **6,13 μ M** za ROCK2 (Slika 29-B). Na osnovu postignutih rezultata i obećavajućeg inhibitornog profila (Tabela 6), jedinjenje **C-19** je izdvojeno kao perspektivan kandidat za dalju detaljnu biološku evaluaciju.



Slika 29. **A.** Prikaz procenta inhibicije ROCK1 i ROCK2 izoformi pri istoj koncentraciji testiranih jedinjenja od 10 μ M; **B.** Prikaz dijagrama odnosa doze i inhibicije ROCK1 i ROCK2 izoformi za jedinjenje **C-19**. *Inhibition* – inhibicija, *activity* – aktivnost, *compound* – jedinjenje.

Table 6. Eksperimentalno određena i 3D-QSAR (ROCK1, ROCK2) modelima predviđena pIC₅₀ vrednost jedinjenja **C-19**

Jedinjenje	ROCK1		ROCK2			
	pIC ₅₀ (predviđena)	pIC ₅₀ (eksperimentalna)	pIC ₅₀ (rezidualna)	pIC ₅₀ (predviđena)	pIC ₅₀ (eksperimentalna)	pIC ₅₀ (rezidualna)
C-19	5,76	5,37	-0,39	5,61	5,21	-0,40

4.4. Rezultati *in vitro* ćelijske evaluacije najaktivnijih ROCK inhibitora

4.4.1. Ispitivanje citotoksičnih efekata novodizajniranih i sintetisanih ROCK inhibitora

Ova studija je ispitala citotoksične efekte novodizajniranih i sintetisanih ROCK inhibitora (**C-19** i **C-22**) na četiri različite ćelijske linije tumora: MDA-MB-231, HCC1937, MiaPaCa-2 i Panc-1. Kao pozitivna kontrola u svim *in vitro* eksperimentima je korišćen registrovani inhibitor ROCK kinaza, fasudil.

Tretiranjem obje ispitivane ćelijske linije karcinoma pankreasa sintetisanim jedinjenjem **C-19**, uočen je dozno-zavisan citotoksični efekat nakon 72 časa, dok kod ćelijskih linija karcinoma dojke nije registrovan značajan citotoksični odgovor. Dobijene IC₅₀ vrijednosti su iznosile 19,10 µM za MiaPaCa-2 i 35,03 µM za Panc-1, što ukazuje na veću osjetljivost MiaPaCa-2 ćelija na ispitivani inhibitor.

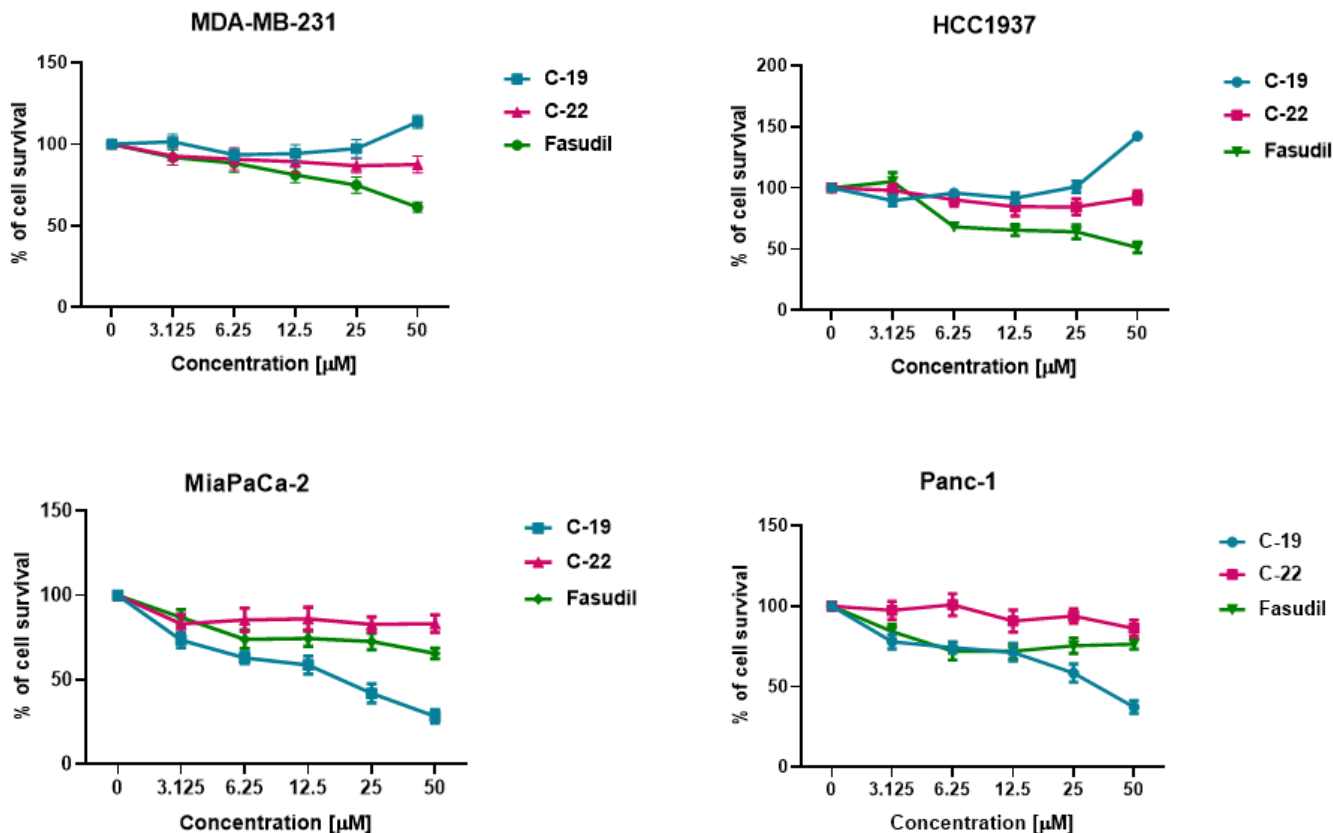
Nasuprot tome, tretiranjem ispitivanih ćelijskih linija karcinoma sintetisanim jedinjenjem **C-22**, kao i referentnim inhibitorom fasudilom, nije uočen značajan citotoksični efekat (**Tabela 7** i **Slika 30**). Ovi rezultati ukazuju na značajnu aktivnost jedinjenja **C-19** prema ćelijama karcinoma pankreasa, što opravdava dalja istraživanja njegovog potencijala kao antitumorskog agensa.

Tabela 7. Citotoksična aktivnost novosintetisanih ROCK inhibitora testirana na tumorskim ćelijskim linijama MDA-MB-231, HCC1937, MiaPaCa-2 i Panc-1

Jedinjenje	IC ₅₀ (µM)				
	MDA-MB-237	HCC1937	MiaPaCa-2	Panc-1	MRC-5
C-19	> 50	> 50	19,10 ± 1,89 (4,1)	35,03 ± 4,43 (2,2)	78,25 ± 4,22
C-22	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Fasudil	> 50	> 50	> 50	> 50	92,02 ± 3,67

IC₅₀ vrijednosti (µM) prikazane su kao srednje vrijednosti ± SD i predstavljaju rezultate tri nezavisna eksperimenta.

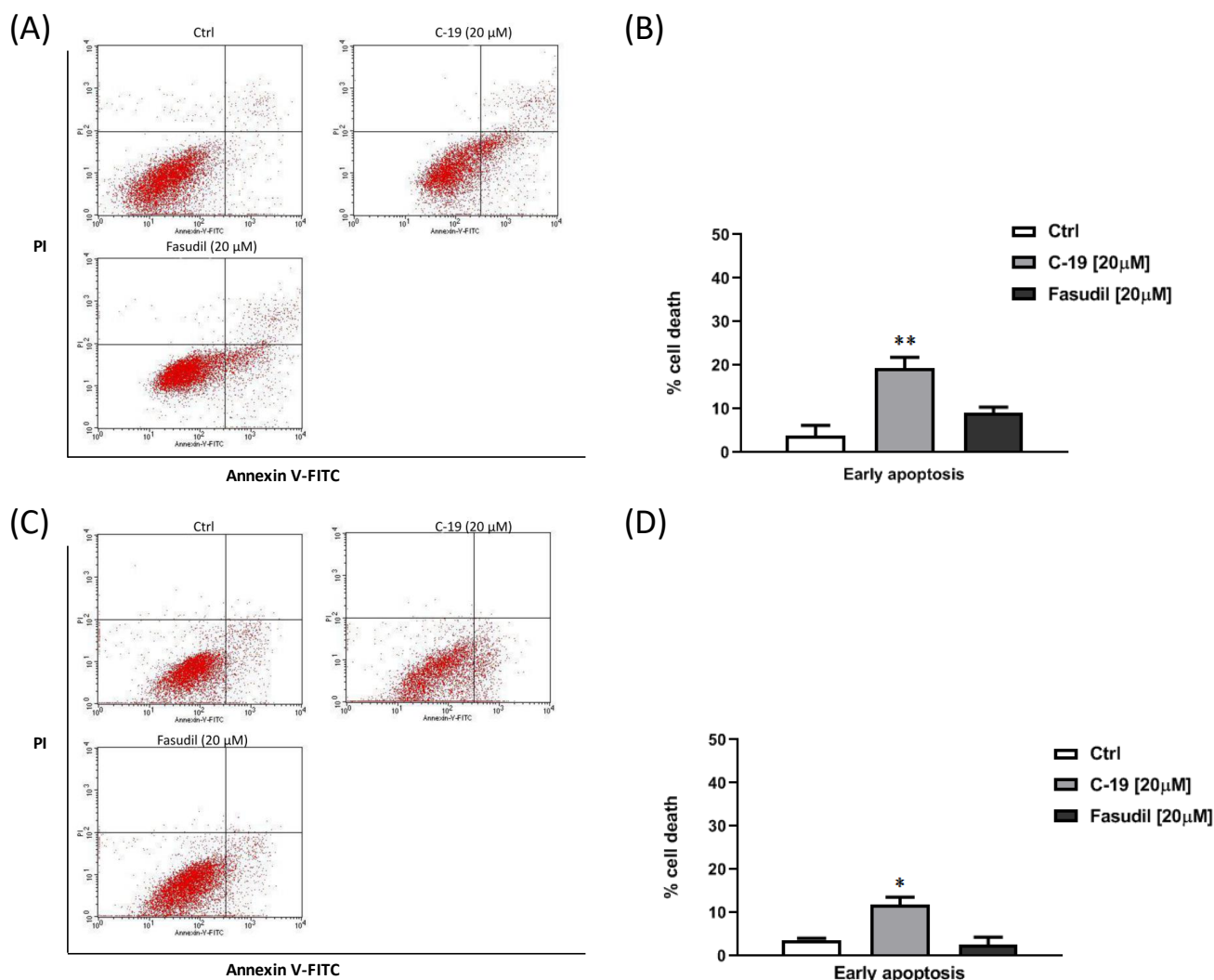
Toksikološki profil jedinjenja **C-19** je dalje evaluiran na humanoj ćelijskoj liniji porijeklom iz fibroblasta pluća, **MRC-5**, kako bi se procijenila njegova terapijska širina određivanjem **indeksa selektivnosti (Si)**. Rezultati su pokazali da **C-19** ispoljava izuzetnu selektivnost prema ćelijskoj liniji MiaPaCa-2, sa indeksom selektivnosti od 4,1, dok je selektivnost prema ćelijama Panc-1 umjereno izražena (Si = 2,2) (**Tabela 7**). Ovi rezultati sugerisu da **C-19** potencijalno može biti efikasan antitumorski agens sa poželjnom selektivnošću prema malignim ćelijama, uz minimalni citotoksični efekat na normalne ćelije.



Slika 30. Prikaz odnosa doze i citotoksičnosti dobijenih u MTT testu na ćelijskim linijama MDA-MB-231, HCC1937, MiaPaCa-2 i Panc-1 nakon 72 časa izloženosti ROCK inhibitorima. % of cell survival – procenat preživljavanja ćelija, concentration – koncentracija.

4.4.2. Ispitivanje uticaja C-19 na apoptozu

Nakon 48 sati izloženosti ćelija novosintetisanom ROCK inhibitoru **C-19** u koncentraciji od 20 μM došlo je do indukcije rane apoptoze u populaciji od preko 20% MiaPaCa-2 ćelija (**Slike 31-A i 31-B**) i približno 15% Panc-1 ćelija (**Slike 31-C i 31-D**). Ova analiza je sprovedena primjenom protočne citometrije uz korišćenje Annexin V-FITC/PI bojenja. Statistička obrada podataka ukazuje na značajno povećanje procenta apoptotičnih ćelija u obje ispitivane PDAC ćelijske linije u poređenju sa netretiranim kontrolnim ćelijama ($p \leq 0.05$ za Panc-1, $p \leq 0.01$ za Mia PaCa-2). Sa druge strane, fasudil je ostvario slabiji efekat u poređenju sa **C-19** na obje PDAC ćelijske linije – nije pokazao statički značajnu razliku u poređenju sa netretiranom kontrolom (**Slika 31**). Ovi rezultati potvrđuju potencijal jedinjenja **C-19** u indukciji programirane ćelijske smrti kod PDAC ćelijskih linija.

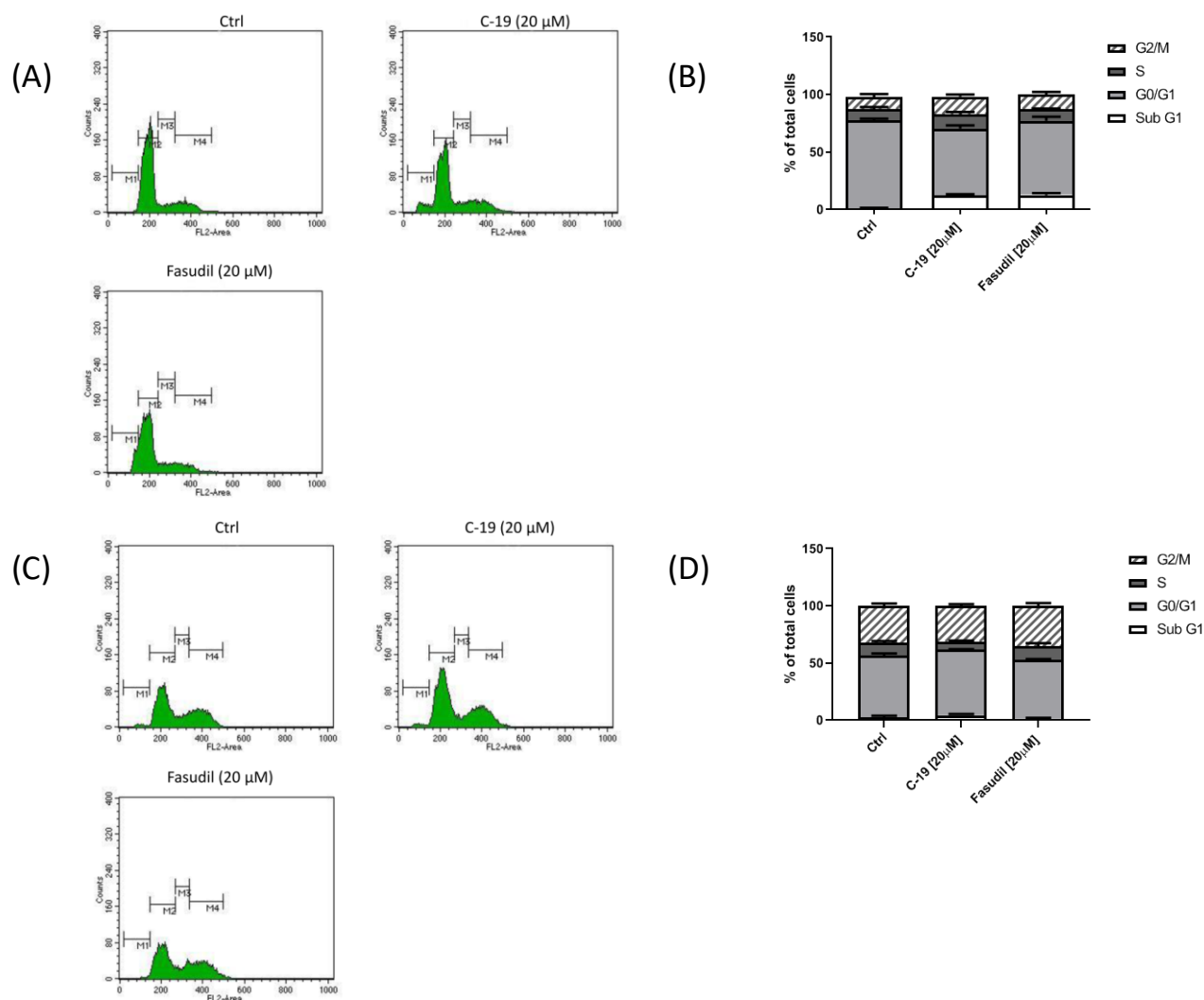


Slika 31: Uticaj 48-časovne izloženosti ROCK inhibitorima (**C-19** i **fasudil**) na indukciju rane apoptoze u ćelijama MiaPaCa-2 (**A**, **B**) i Panc-1 (**C**, **D**). Procenat apoptotičnih ćelija je kvantifikovan kvantifikovan protočnom citometrijom korišćenjem dvokolornog bojenja Annexin FITC i PI. Statistički značajne razlike između tretmana određene su t-testom (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$) u poređenju sa netretiranom kontrolom. Stubičasti dijagrami prikazuju srednje vrijednosti $\pm$ SD dobijene iz tri nezavisna eksperimenta. Tačkasti dijagrami ilustruju reprezentativne rezultate Annexin V/PI bojenja ćelija koji su analizirani protočnom citometrijom nakon 48-časovne izloženosti ćelijskih linija MiaPaCa-2 (**A**) i Panc-1 (**C**) ispitivanim jedinjenjima. % cell death – ćelijska smrt; early apoptosis – rana apoptoza.

4.4.3. Ispitivanja uticaja C-19 na ćelijski ciklus MiaPaCa-2 i Panc-1 tumorskih ćelija

Kako bi se procijenio antiproliferativni efekat sintetisanog inhibitora **C-19**, sprovedena je analiza promjena u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa pri prethodno određenim IC_{50} koncentracijama **C-19**. Ćelijske linije MiaPaCa-2 i Panc-1 su tretirane ROCK inhibitorima (**C-19** i fasudilom) u koncentraciji od 20 μM tokom 48 sati, što je rezultiralo blagim promjenama u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (**Slika 32**).

Izloženost Mia PaCa-2 ćelija inhibitoru **C-19** tokom 48 sati je dovela do blagog povećanja procenta ćelija u sub-G1 fazi, uz istovremeno smanjenje broja ćelija u G0/G1 fazi. Sličan obrazac promjena u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je primijećen i nakon tretmana fasudilom (**Slike 32-A i 32-B**). Nasuprot tome, tretiranjem Panc-1 ćelija inhibitorom **C-19** je rezultiralo blagim povećanjem procenta ćelija u G0/G1 fazi, dok tretiranje fasudilom nije izazvalo značajne promjene u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (**Slike 32-C i 32-D**).



Slika 32: Uticaj 48-časovne izloženosti ROCK inhibitorima (**C-19** i fasudil) na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa u Mia PaCa-2 (**A, B**) i Panc-1 ćelijama (**C, D**). Kako bi se procijenio uticaj

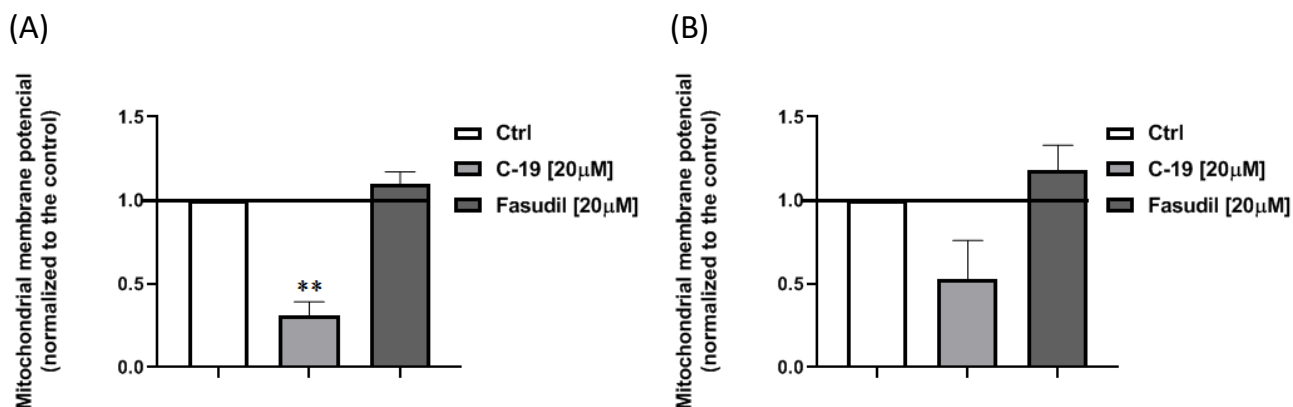
ROCK inhibitora na dinamiku ćelijskog ciklusa, ćelije pankreasnog adenokarcinoma (MiaPaCa-2 i Panc-1) su bile izložene ispitivanim inhibitorima (C-19 i fasudil) u koncentraciji od 20 μ M tokom 48 sati. Nakon tretmana, ćelije su obojene propidijum jodidom i analizirane protočnom citometrijom. Prikazani histogrami predstavljaju reprezentativne rezultate PI bojenja i ilustruju distribuciju ćelijskih populacija u različitim fazama ciklusa nakon 48 časova izloženosti ekvimolarnim koncentracijama C-19 i fasudila. **M1** – apoptotske ćelije sa sadržajem DNK koji odgovara sub-G1 frakciji, **M2** – ćelije u G0/G1 fazi, **M3** – ćelije u S fazi, **M4** – ćelije u G2/M fazi. % of total cells – procenat ukupnih ćelija.

4.4.4. Ispitivanje uticaja C-19 na promjene mitochondrijskog membranskog potencijala

Unutrašnji (intrinzični) apoptotski put se aktivira nizom događaja koji uključuju narušavanje integriteta mitochondrijske membrane i gubitak mitochondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\Psi_m$), što dovodi do oslobađanja proapoptotskih faktora poput citohroma C, i kaspazne aktivacije. Obzirom na značaj mitochondrijske disfunkcije u regulaciji ćelijske smrti, ispitani su efekti ROCK inhibitora **C-19** i fasudila na mitochondrijski membranski potencijal u ćelijama MiaPaCa-2 i Panc-1.

Tretiranjem MiaPaCa-2 ćelija sintetisanim ROCK inhibitorom **C-19** u koncentraciji od 20 μ M dovelo je do statistički značajnog smanjenja mitochondrijskog membranskog potencijala ($p \leq 0,01$) (**Slika 33-A**), što ukazuje na potencijalnu aktivaciju intrinzičnog apoptotskog puta. Nasuprot tome, u Panc-1 ćelijama nije uočena značajna promjena u mitochondrijskom membranskom potencijalu nakon 24-časovne izloženosti **C-19** u poređenju sa kontrolom (**Slika 33-B**), što sugerise različitu osetljivost ćelijskih linija na ovaj inhibitor.

Tretman fasudilom u istoj koncentraciji (20 μ M) tokom 24 sata nije doveo do smanjenja mitochondrijskog membranskog potencijala. Naprotiv, uočena je blaga hiperpolarizacija mitochondrija u obje ćelijske linije (**Slike 33-A i 33-B**). Ovi rezultati upućuju na to da bi efekti ROCK inhibicije mogli biti ćelijski specifični i da različiti inhibitori mogu indukovati različite mitochondrijske odgovore, što zahtjeva dalja istraživanja njihovih molekularnih mehanizama djelovanja.



Slika 33: Uticaj 24-časovne izloženosti ROCK inhibitorima (**C-19** i fasudil) na mitochondrijski membranski potencijal MiaPaCa-2 (A) i Panc-1 ćelija (B). Nakon 24-časovnog tretiranja PDAC ćelija ispitivanim ROCK inhibitorima u koncentraciji od 20 μ M, ćelije su obojene JC-1 bojom, a promjene u mitochondrijskom membranskom potencijalu su analizirane protočnom citometrijom. Statistički značajne razlike između tretmana su utvrđene t-testom: $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ (u poređenju sa netretiranom kontrolom).

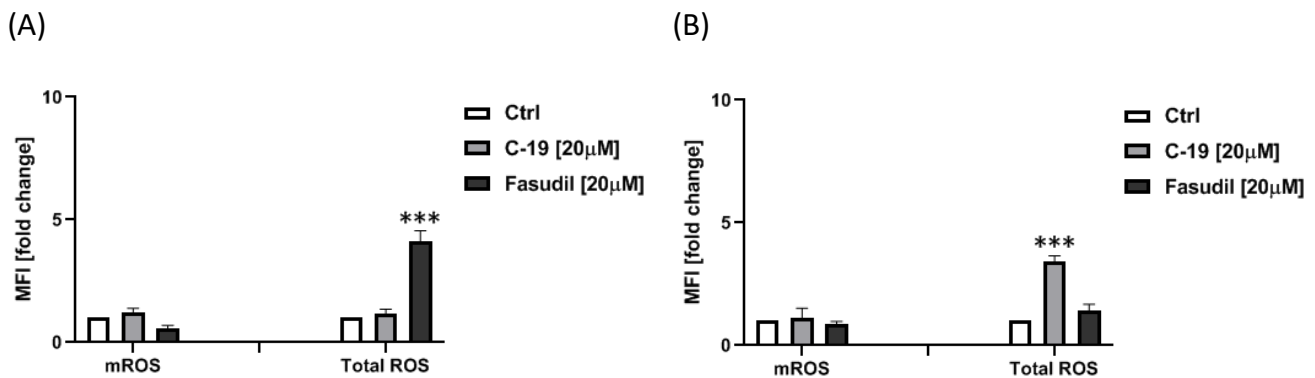
Mitochondrial membrane potential (normalized to control) – mitohondrijski membranski potencijal (normalizovan u odnosu na kontrolu).

4.4.5. Ispitivanje uticaja C – 19 na produkciju reaktivnih oblika kiseonika

Ćelije karcinoma karakteriše povećana proizvodnja reaktivnih oblika kiseonika (ROS) koji primarno potiču iz mitohondrija i imaju ključnu ulogu u progresiji tumora. ROS mogu uticati na karcinogenezu modulacijom ekspresije gena, izazivanjem genomske nestabilnosti i regulacijom različitih signalnih puteva, uključujući one povezane sa proliferacijom, angiogenezom i metastazama [299]. Zbog njihove uloge u preživljavanju i adaptaciji tumorskih ćelija, ispitani su efekti **C-19** i fasudila na ukupne i mitohondrijske nivoe ROS u MiaPaCa-2 i Panc-1 ćelijama.

Nakon 24-časovnog tretiranja Panc-1 ćelija inhibitorom **C-19** (koncentracija 20 μ M), uočen je statistički značajan porast ukupnog nivoa ROS ($p \leq 0,001$) u poređenju sa netretiranom kontrolom (**Slika 34-B**), što može ukazivati na potencijalni oksidativni stres i disfunkciju mitohondrija kao posledicu inhibicije ROCK signalnog puta. S druge strane, tretman MiaPaCa-2 ćelija fasudilom (koncentracija 20 μ M) tokom 24 sata je doveo do značajnog povećanja ukupnog nivoa ROS ($p \leq 0,001$) u poređenju sa kontrolom (**Slika 34-A**), što sugerise ćelijski specifične efekte različitih ROCK inhibitora.

Međutim, analiza mitohondrijskih ROS je pokazala da 24-časovna izloženost ispitivanim ROCK inhibitorima nije dovela do značajnih promena u nivou mitohondrijskih ROS ni u jednoj od ispitivanih ćelijskih linija adenokarcinoma pankreasa. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da povećanje ukupnog ROS prvenstveno potiče iz nemitohondrijskih izvora, kao što su NADPH oksidaze, peroksizomi ili citosolni oksidativni procesi. Dalja istraživanja su neophodna kako bi se razjasnili mehanizmi putem kojih ROCK inhibitori utiču na homeostazu reaktivnih oblika kiseonika i njihov potencijalni doprinos karcinogenezi i progresiji pankreasnog adenokarcinoma.



Slika 34: Uticaj 24-časovne izloženosti ROCK inhibitorima (**C-19** i fasudil) na nivoe ukupnih i mitohondrijskih endogenih ROS u ćelijama MiaPaCa-2 (A) i Panc-1 (B). Nakon 24-časovnog tretiranja ćelija adenokarcinoma pankreasa ispitivanim ROCK inhibitorima u koncentraciji od 20 μ M, ćelije su obojene dihalorofluorescinom (DCF) i MitoSOX Red bojom, a promjene u koncentraciji ukupnih i mitohondrijskih ROS su analizirane protočnom citometrijom. Statistički značajne razlike između tretmana su utvrđene t-testom: $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $*p \leq 0,001$ (u poređenju sa netretiranom kontrolom). *Fold change* -

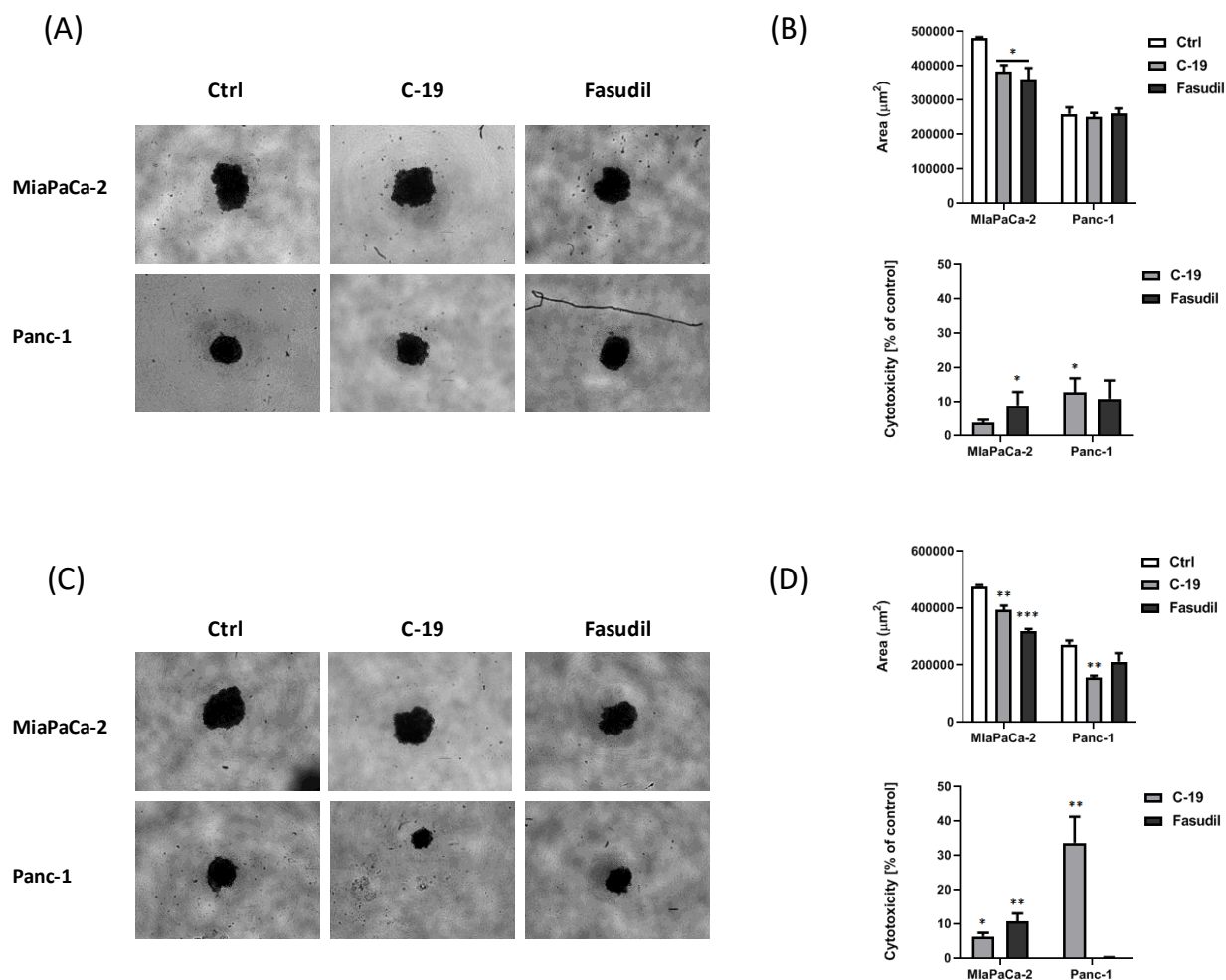
4.4.6. Analiza efikasnosti C-19 u 3D tumorskim modelima

Savremena istraživanja potvrđuju da trodimenzionalni (3D) modeli tumora preciznije oponašaju mikrokruženje tumorskog tkiva i ćelijsko ponašanje *in vivo* u poređenju sa klasičnim dvodimenzionalnim (2D) ćelijskim kulturama. Ovaj napredak je omogućio poboljšanu prediktivnu vrijednost prekliničkih testiranja lijekova, smanjujući stopu neuspjeha novih terapijskih agenasa u kasnijim fazama kliničkih ispitivanja [264].

Veličina tumorskih MiaPaCa-2 sferoida, tretiranih ispitivanim inhibitorima **C-19** i fasudilom, se značajno smanjila u poređenju sa netretiranom kontrolom (**Slike 35-A i 35-B**). Međutim, samo tretman fasudilom u koncentraciji korišćenoj u 2D modelu (20 μ M) je značajno smanjio ćelijsku vijabilnost MiaPaCa-2 tumorskih sferoida. S druge strane, Panc-1 tumorski sferoidi tretirani **C-19** inhibitorom nisu pokazali značajno smanjenje veličine u odnosu na netretiranu kontrolu (**Slike 35-A i 35-B**), ali je tretman ovom supstancom u koncentraciji od 20 μ M značajno smanjio vijabilnost Panc-1 sferoida. Tretman fasudilom nije izazvao promjene u veličini i vijabilnosti Panc-1 sferoida pri koncentraciji od 20 μ M (**Slike 35-A i 35-B**).

U drugom setu eksperimenata je ispitivana sposobnost jedinjenja da inhibiraju formiranje sferoida tumorskih ćelija. MiaPaCa-2 i Panc-1 ćelije su kultivisane u prisustvu ispitivanih supstanci (koncentracija 20 μ M) u uslovima pogodnim za formiranje sferoida tokom 4 dana (**Slike 35-C i 35-D**). Nakon ovog perioda, netretirane ćelije su formirale sferoide sa gustim, kompaktno raspoređenim ćelijama (**Slike 35-C i 35-D**).

Četvorodnevna inkubacija MiaPaCa-2 ćelija u prisustvu **C-19** i fasudila, pri koncentraciji korišćenoj u 2D modelu (20 μ M), je značajno inhibirala formiranje sferoida i smanjila njihovu vijabilnost (**Slike 35-C i 35-D**). Sa druge strane, tretman **C-19** je uzrokovao izražen citotoksični efekat na Panc-1 sferoide, kao i značajnu inhibiciju formiranja Panc-1 sferoida pri koncentraciji od 20 μ M (**Slike 35-C i 35-D**). Nasuprot tome, tretman fasudilom nije pokazao nijedan od ispitivanih efekata na Panc-1 sferoide (**Slike 35-C i 35-D**).



Slika 35. Inhibicija preživljavanja i rasta tumorskih sferoida MiaPaCa-2 i Panc-1 ćelija tretiranih sintetisanim jedinjenjima. Nakon 4 dana kultivacije, formirani sferoidi su tretirani jedinjenjima **C-19** i fasudilom u ekvimolarnoj koncentraciji (20 μM) tokom 72 sata. Formiranje i rast sferoida su analizirani i snimljeni korišćenjem Olympus CKX53 mikroskopa sa objektivom 4x/0.13. Skala: 200 μm . **(A)** Svjetlosna mikroskopska analiza MiaPaCa-2 i Panc-1 sferoida u "bright field" modu. **(B)** Veličina sferoida je određena pomoću ImageJ softvera, dok je citotoksičnost ispitivanih jedinjenja na MiaPaCa-2 i Panc-1 tumorske sferoide procijenjena MTT testom. **(C)** MiaPaCa-2 i Panc-1 ćelije su ko-kultivisane sa jedinjenjima **C-19** i fasudilom (20 μM) u uslovima pogodnim za formiranje sferoida tokom 4 dana. Rast i formiranje sferoida su analizirani i snimljeni korišćenjem Olympus CKX53 mikroskopa sa objektivom 4x/0.4. Skala: 200 μm . **(D)** Veličina sferoida je određena pomoću ImageJ softvera, dok je citotoksičnost ispitivanih jedinjenja u uslovima ko-tretmana sa MiaPaCa-2 i Panc-1 sferoidima procijenjena MTT testom. *Citotoxicity* – citotoksičnost, *area* – površina.

4.4.7. Ispitivanje uticaja C-19 na ćelijsku migraciju i invaziju u *in vitro* uslovima

Progresija malignih tumora uveliko zavisi od sposobnosti ćelija karcinoma da migriraju i vrše invaziju okolnih i udaljenih tkiva. Ovi procesi zahtevaju značajnu reorganizaciju citoskeleta i dinamičke promjene u ćelijskoj morfologiji koje uključuju formiranje lamelipodija i filopodija, ćelijskih struktura ključnih za migraciju i invaziju [300]. U tom kontekstu, Rho-kinaze (ROCK1 i ROCK2) predstavljaju

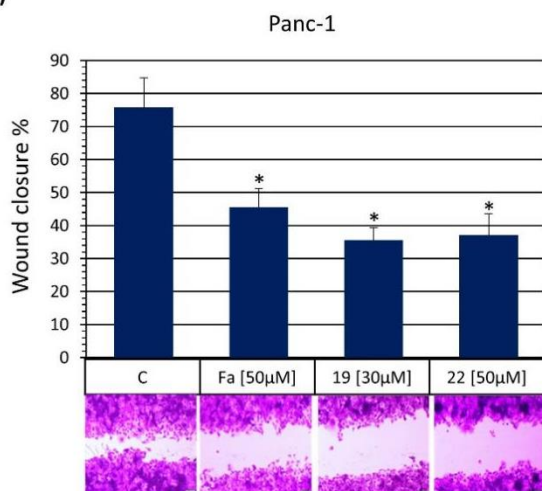
ključne regulatore citoskeletne dinamike čiji je neregulisan signalni put povezan sa povećanom proliferacijom, migracijom i invazivnošću tumorskih ćelija. Stoga, inhibicija ROCK signalizacije predstavlja perspektivnu strategiju za ograničavanje širenja malignih ćelija i smanjenje metastatskog potencijala tumora [157].

U ovom istraživanju su evaluirani anti-migratorni i anti-invazivni efekti ROCK inhibitora, **C-19** i **C-22**, na ćelijske linije trostruko negativnog karcinoma dojke (HCC1937 i MDA-MB-231) i adenokarcinoma pankreasa (Panc-1 i MiaPaCa-2). Prvo je sproveden **test zarastanja rana** koji omogućava procjenjivanje direktne migracije ćelija u *in vitro* uslovima [301]. Ovaj test je primjenjen na epitelne ćelije HCC1937 i Panc-1 koje karakteriše adherentan rast. Svi tretmani su izvedeni u skladu sa IC₅₀ vrijednostima navedenim u **Tabeli 7**, pri čemu testirani inhibitori nisu imali značajan citotoksični efekat tokom 24-časovnog perioda testiranja (podaci nisu prikazani). Rezultati prikazani na **Slikama 36-A i 36-B** su pokazali da tretman **C-19** i **C-22** inhibitorima značajno usporava zarastanje rane, pri čemu su efekti ovih jedinjenja bili uporedivi sa dejstvom fasudila.

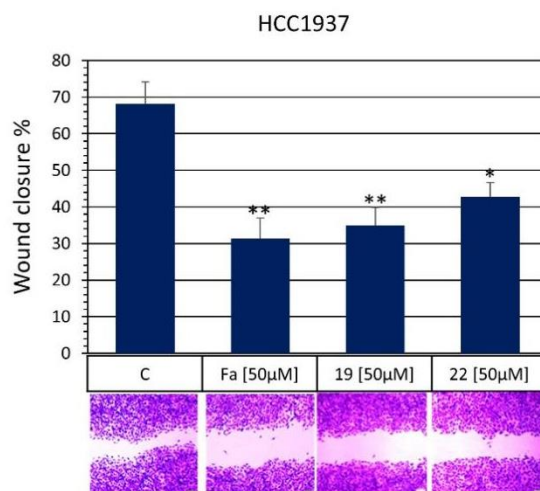
Nakon toga, primjenjen je **Transwell migracioni i invazioni test** na mezenhimalnim ćelijama MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 koje pokazuju fibroblastnu morfologiju i izraženu migratornu sposobnost. Ovi testovi omogućavaju kvantifikaciju sposobnosti ćelija da migriraju ili invadiraju kroz membranu sa ili bez dodatka matriksnih komponenti. Slično rezultatima dobijenim u testu zarastanja rana, inhibitori **C-19** i **C-22** su značajno smanjili kako migraciju (**Slike 37-B i 37-D**), tako i invaziju ćelija (**Slike 37-A i 37-C**), pri čemu su njihovi efekti bili uporedivi sa fasudilom. Ovo smanjenje potencijala migracije i invazije je potvrđeno analizom broja ćelija koje su prošle kroz *Transwell* membrane do donjih slojeva komore.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da inhibitori **C-19** i **C-22**, vjerovatno putem inhibicije ROCK1 i ROCK2 kinaza, mogu efikasno regulisati migraciju i invaziju tumorskih ćelija. Ovi rezultati dodatno potvrđuju terapijski potencijal ovih jedinjenja kao ciljnih agenasa u strategijama usmjerenim ka smanjenju metastatskog potencijala malignih tumora. Dalje studije usmjerene na detaljnu analizu molekulskih mehanizama djelovanja ovih inhibitora, kao i evaluaciju njihove efikasnosti u *in vivo* modelima, bi bile od suštinskog značaja za dalji potencijalni klinički razvoj.

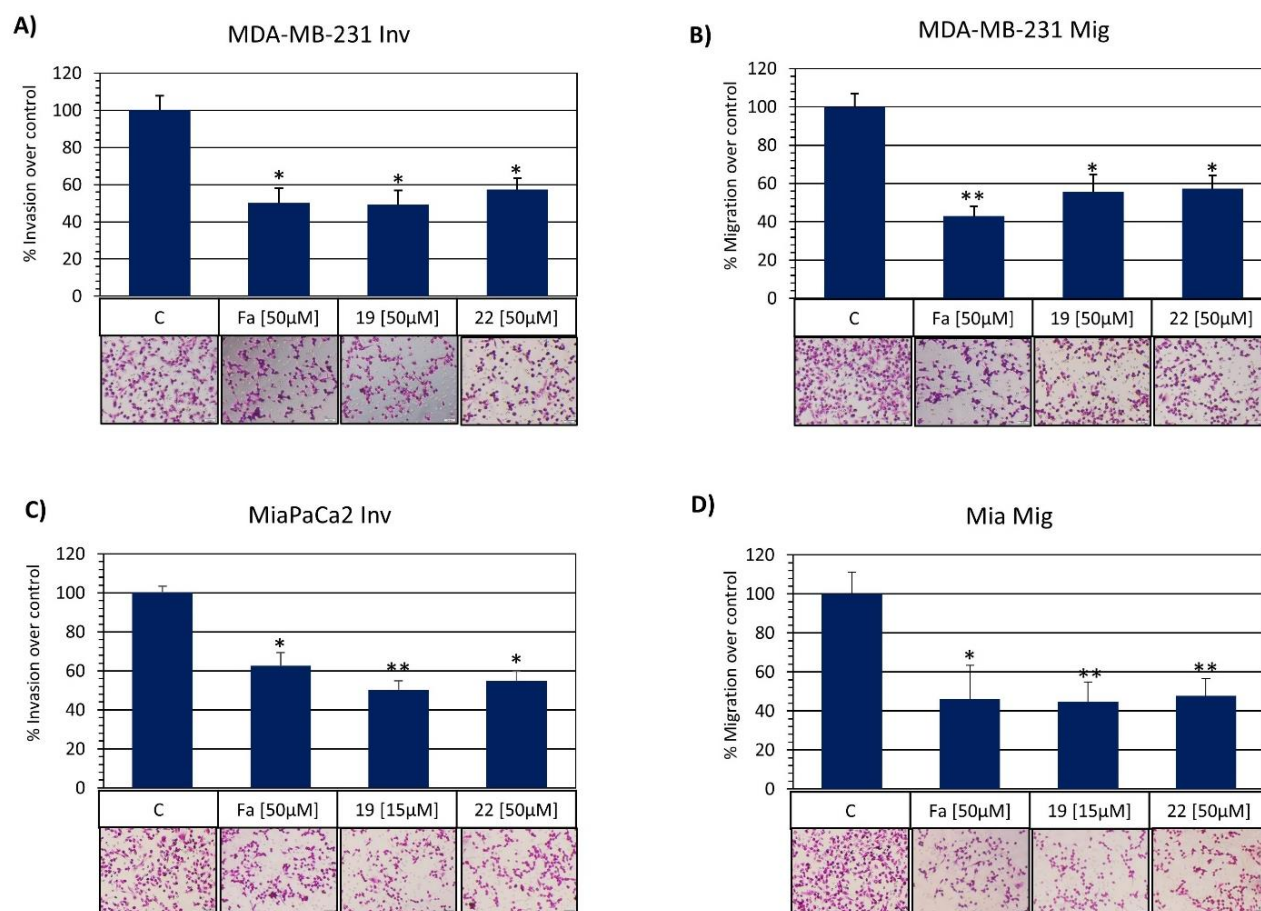
A)



B)



Slika 36. Anti-migratorni efekti novih ROCK inhibitora (C-19 i C-22) i fasudila (Fa) na ćelije Panc-1 (A) i HCC1937 (B). Uvećanje 40X, skala: 50 μ m. *Wound closure* – zarastanje rane, C – kontrola.



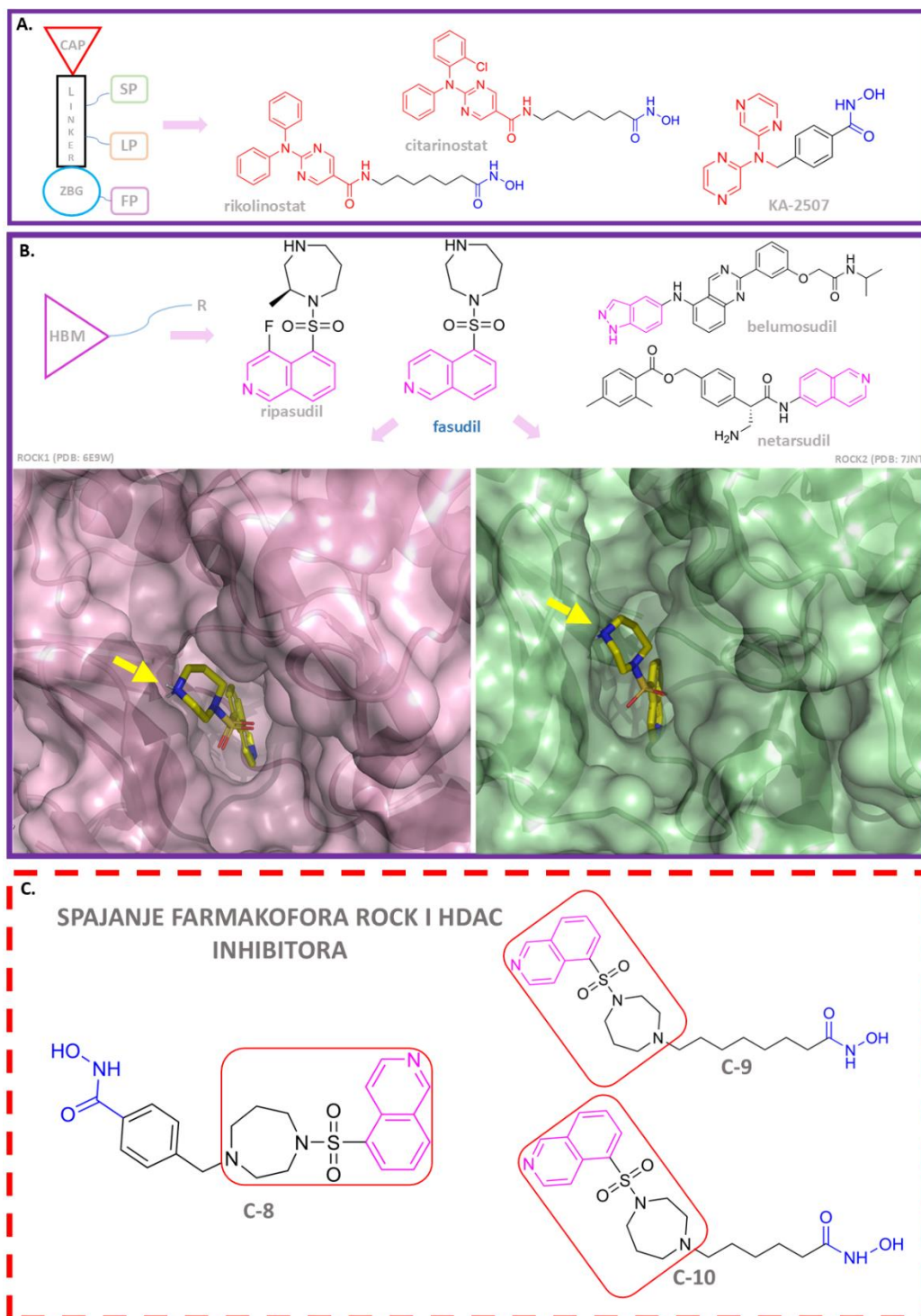
Slika 37. Anti-migratorni i anti-invazivni efekti novih ROCK inhibitora (C-19 i C-22) i fasudila (Fa) na ćelije MDA-MB-231 (A i B) i MiaPaCa-2 (C i D). Uvećanje 80x, skala: 100 μ m. (Inv: invazija, Mig: migracija). % *Invasion over control* - % invazije u odnosu na kontrolu (C); % *migration over control* - % migracije u odnosu na kontrolu (C).

4.5. Farmakofora i dizajn prvih *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora

U cilju razvoja *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora, sprovedena je detaljna molekulska doking studija korišćenjem GOLD 2022 softvera. Posebna pažnja je posvećena analizi doking položaja već poznatog ROCK inhibitora, fasudila, pri čemu je identifikovan region izložen rastvaraču, azotni atom homopiperazina koji nije ostvario značajne interakcije sa katalitičkim domenima ROCK1 (PDB: 6E9W) i ROCK2 (PDB: 7JNT) (Slika 38-B). Ova strukturna karakteristika je omogućila modifikaciju strukture fasudila i uvođenje farmakofornih elemenata selektivnih HDAC6 inhibitora – rikolinostata, citarinstata i KA2507 (Slika 38-A).

Primjenom ove strategije su prvobitno dizajnirana tri nova dualna HDAC/ROCK inhibitora (Slika 38-C). Svi dizajnirani inhibitori posjeduju izohinolinski prsten kao *hinge*-vezujući domen, hidroksamsku kiselinu kao farmakoforu odgovornu za vezivanje Zn^{2+} unutar katalitičkog domena HDAC (ZBG), kao i različite alkilne i arilne linkere koji mogu uticati na afinitet i selektivnost molekula ka HDAC

izoformama. Poseban značaj imaju CAP grupa, koja može doprinijeti selektivnosti i inhibitornoj aktivnosti prema HDAC6, i HBM (*hinge-moiety moiety*, *hinge-vezujući domen*) koji je esencijalan za inhibiciju ROCK kinaza. Preklapajući HBM i CAP grupu u *multi-target* inhibitorima se dobijaju inhibitori sa djelimično preklapljenom farmakoforom (*fused pharmacophores*) (Slika 38-C).



Slika 38. **A.** Shematski prikaz produženog farmakofornog modela HDAC inhibitora i struktura selektivnih HDAC6 inhibitora koji su korišćeni u dizajnu dualnih HDAC/ROCK inhibitora. **B.** Identifikacija regije fasudila izložene rastvaraču putem analiza načina vezivanja fasudila sa ROCK1

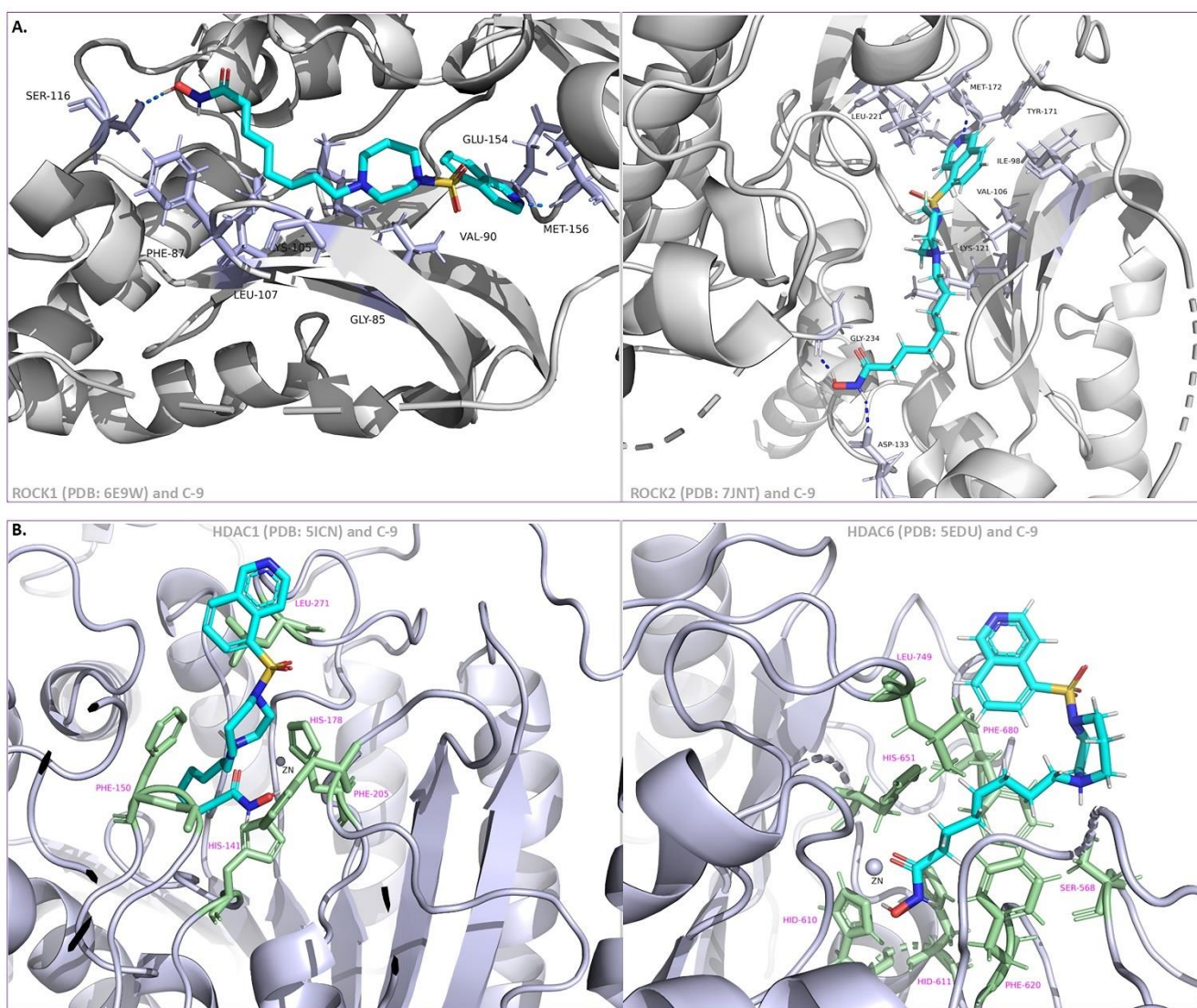
(lijevo) i ROCK2 (desno); *hinge*-vezujući domen je označen ljubičastom bojom, dok je regija izložena rastvaraču označena žutom strelicom. C. Dizajn novih dualnih HDAC/ROCK inhibitora: kombinovanje farmakofora selektivnih HDAC6 inhibitora (KA-2507 i rikolinostat) sa ROCK inhibitorom (fasudil); *hinge*-vezujući domen je označen ljubičastom bojom, cink-vezujuća grupa je istaknuta plavom bojom, dok je CAP grupa dualnih inhibitora (C-8, C-9 i C-10) istaknuta crvenim okvirom.

4.6. Rezultati molekulske doking studije za dualne HDAC/ROCK inhibitore

U cilju potvrde ključnih interakcija je sprovedena molekulska doking studija za novodizajnirane HDAC/ROCK dualne inhibitore, kao i za referentne inhibitore (rikolinostat i fasudil), pri čemu su razmatrani vezivni položaji sa sljedećim ciljnim enzimima; HDAC1, HDAC6, ROCK1 i ROCK2. Ova analiza je omogućila detaljan uvid u načine vezivanja, ključne interakcije unutar aktivnih mjesta enzima, kao i potencijalne strukturne determinante odgovorne za selektivnost i afinitet inhibitora prema pojedinačnim ciljnim mjestima dejstva.

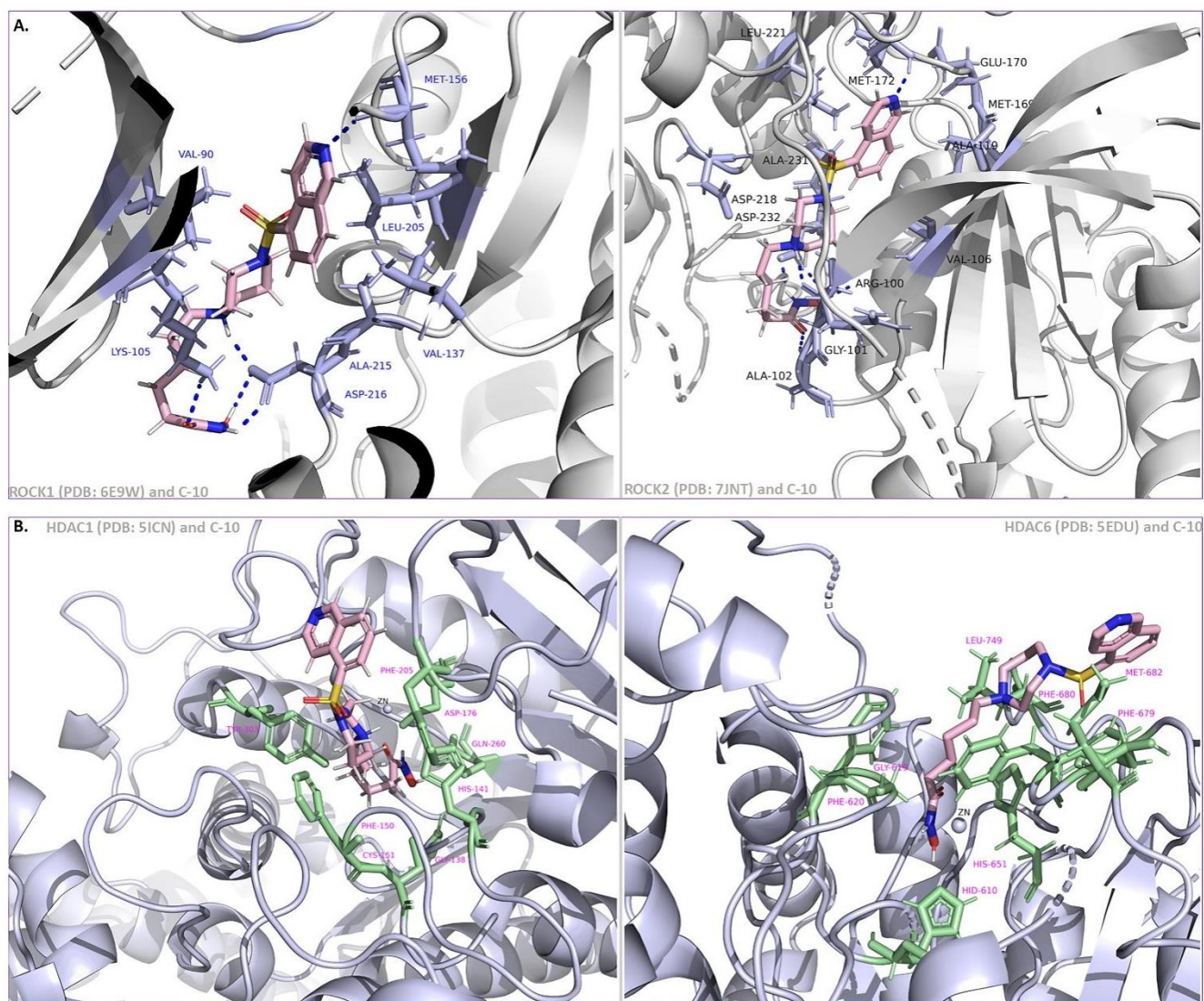
Molekulske doking procedure za HDAC1, HDAC6, ROCK1 i ROCK2 su validirane na osnovu RMSD vrijednosti nižih od 2 Å, čime je omogućena upotreba molekulskog dokinga za detaljnu analizu ključnih interakcija i načina vezivanja dizajniranih dualnih i već poznatih inhibitora, kao i za dalji dizajn novih dualnih HDAC/ROCK inhibitora.

Analiza vezivnih položaja **C-9 (Slika 39-A)** i **C-10 (Slika 40-A)** je pokazala da ovi molekuli ostvaruju ključnu interakciju sa Met156 u *hinge* regiji ROCK1, dok ista interakcija nije uočena između izohinolinskog prstena **C-8** i Met156 (**Slika 41-A**). Odsustvo ove interakcije može rezultirati nižom potentnošću **C-8** prema ROCK1. Kod svih jedinjenja su identifikovane *Van der Waalsove* interakcije između izohinolinskog jezgra, alifatičnih ili aromatičnih linkera i različitih aminokiselinskih ostataka, uključujući Val90, Leu205, Met153 i Leu107 (**Slike 39-A, 40-A i 41-A**). Hidroksamska kiselina svih novodizajniranih dualnih HDAC/ROCK inhibitora je uspostavila vodonične veze sa različitim aminokiselinskim ostacima: Ser116 (**C-9 - Slika 39-A**), Gly218 (**C-8 - Slika 41-A**) i Lys105 i Asp216 (**C-10 - Slika 40-A**). Prethodne studije su pokazale da povećan broj vodoničnih veza može pozitivno korelisati sa aktivnošću ROCK1 inhibitora, što dovodi do zaključka da **C-10** ima veći potencijal za ROCK1 inhibiciju u odnosu na **C-8** i **C-9**. Dalja analiza je pokazala da su načini vezivanja **C-9** i **C-10** za ROCK1 slični načinu vezivanja već poznatog ROCK inhibitora fasudila (**Slika 42**).



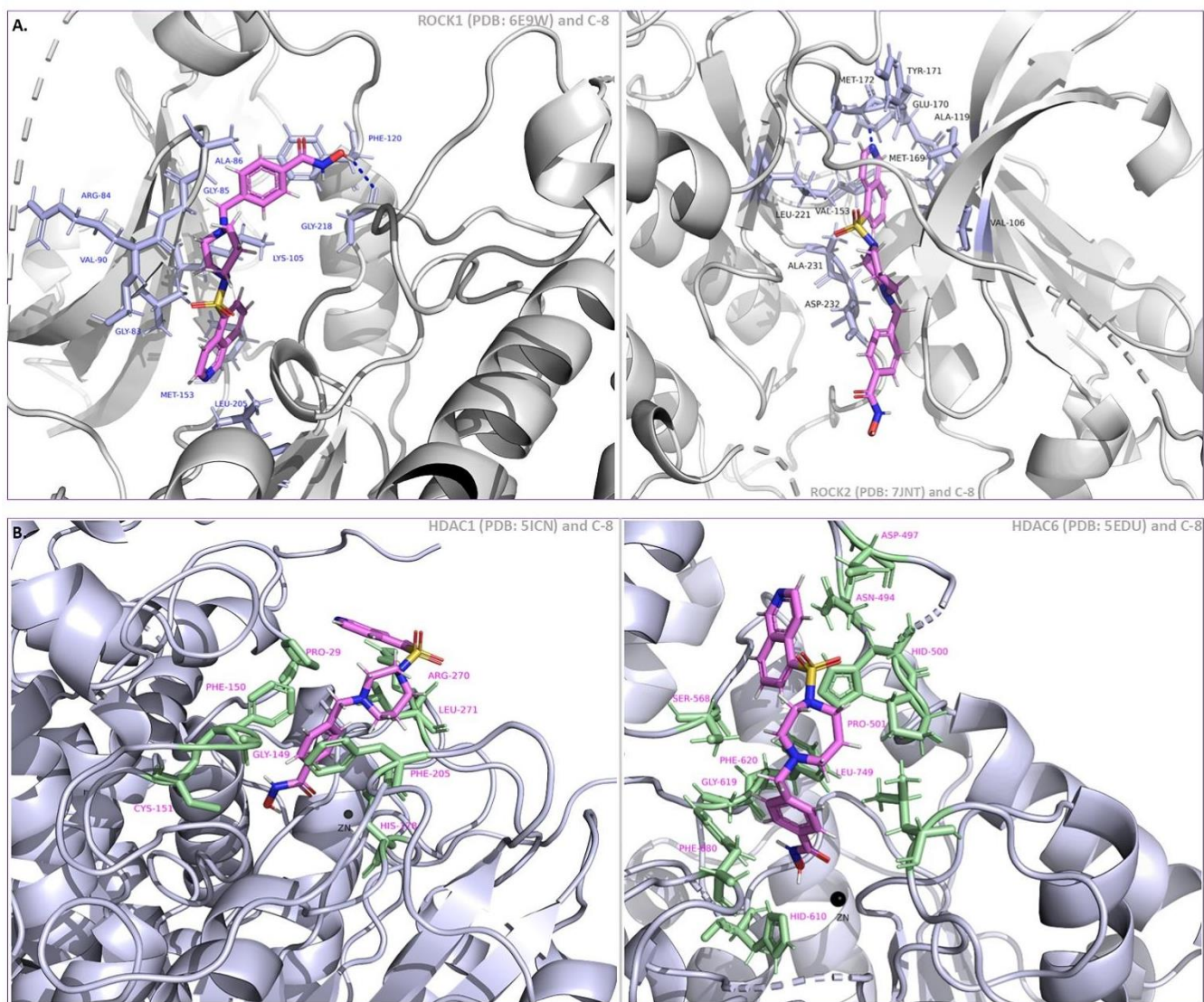
Slika 39. A. Predviđeni načini vezivanja C-9 za ROCK1 (PDB: 6E9W) i ROCK2 (PDB: 7JNT). **B.** Predviđeni načini vezivanja C-9 za HDAC1 (PDB: 5ICN) i katalitički domen 2 HDAC6 (PDB: 5EDU). Aminokiselinski ostaci koji ostvaruju interakcije su istaknuti ljubičastim (ROCK1, ROCK2) i zelenim štapićima (HDAC1, HDAC6), dok je C-9 označen plavom bojom.

U pogledu interakcija između dizajniranih jedinjenja i ROCK2, primjećeno je da sva analizirana jedinjenja ostvaruju ključnu interakciju sa Met172 u *hinge* regiji ROCK2, što je od suštinskog značaja za njihovu inhibitornu aktivnost (**Slika 39-A, 40-A i 41-A**). Takođe, identifikovane su π -alkil interakcije između izohinolinskog prstena svih derivata i određenih aminokiselinskih ostataka, uključujući Ile98, Leu221, Val106, Ala231 i Ala119. Hidroksamske kiseline **C-9** (**Slika 39-A**) i **C-10** (**Slika 40-A**) su formirale po dvije vodonične veze sa aktivnim mjestom ROCK2, dok takve interakcije nisu uočene kod **C-8** (**Slika 41-A**). Pored toga, uspostavljena je dodatna vodonična veza između azotnog atoma homopiperazinskog prstena **C-10** i Arg100 (**Slika 40-A**). Ove vodonične veze mogu doprinijeti jačem inhibitornom efektu **C-9** i **C-10** u poređenju sa **C-8**. Načini vezivanja svih jedinjenja za ROCK2 su pokazali značajne sličnosti sa referentnim ROCK inhibitorom fasudilom (**Slika 42-B**).



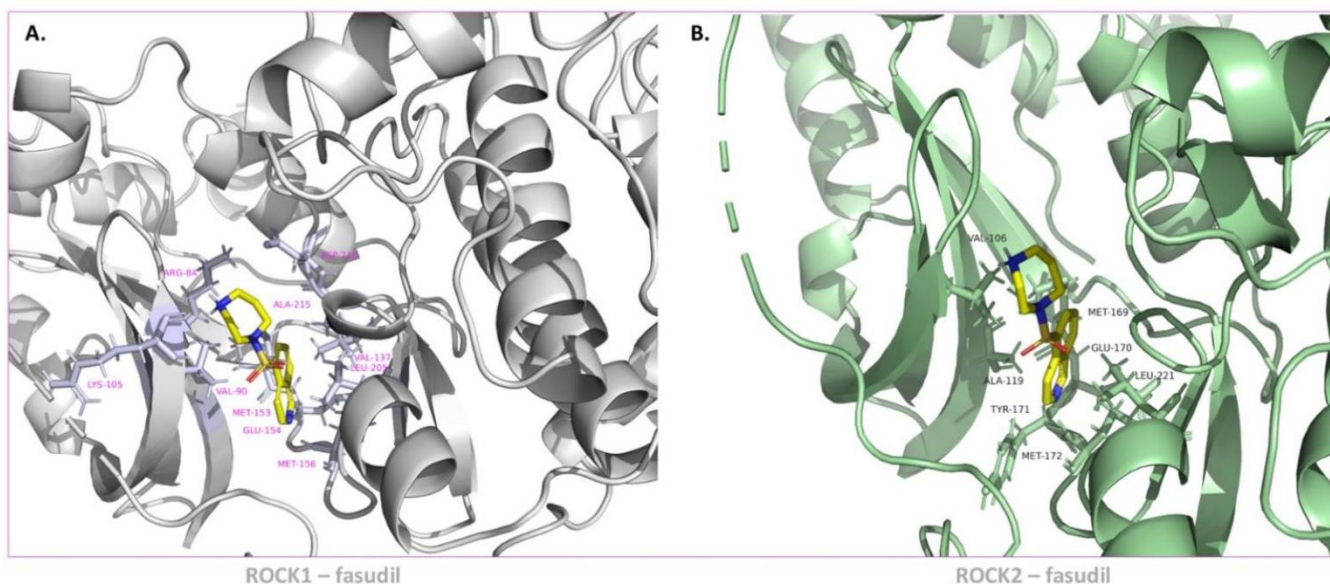
Slika 40. A. Predviđeni načini vezivanja C-10 za ROCK1 (PDB: 6E9W) i ROCK2 (PDB: 7JNT). **B.** Predviđeni načini vezivanja C-10 za HDAC1 (PDB: 5ICN) i katalitički domen 2 HDAC6 (PDB: 5EDU). Aminokiselinski ostaci koji ostvaruju interakcije su istaknuti ljubičastim (ROCK1, ROCK2) i zelenim štapićima (HDAC1, HDAC6), dok je C-10 označen svijetlo rozom bojom.

Analiza interakcija dizajniranih jedinjenja sa HDAC6 je pokazala da su hidroksamske kiseline svih derivata formirale komplekse sa cinkovim jonom unutar katalitičkog domena 2 HDAC6. Ovi kompleksi su dodatno stabilizovani vodoničnim vezama sa His610 (kod sva tri derivata) i Gly619 (kod C-8 i C-10) (Slike 39-B, 40-B i 41-B). Usidravanje molekula u vezujućem džepu HDAC6 je omogućeno i brojnim *Van der Waalsovima* interakcijama između linkera, CAP grupe i različitih aminokiselinskih ostataka, uključujući His500, Phe620, Leu749 i His651 (Slike 39-B, 40-B i 41-B). Ove analize potvrđuju da su dizajnirana jedinjenja adekvatno usidrena u katalitičkom domenu 2 HDAC6, što rezultira obećavajućim potencijalom za ostvarivanje inhibitorne aktivnosti na ovoj HDAC izoformi. Dodatno, vezivanje dizajniranih molekula u aktivnom mjestu HDAC6 je pokazalo značajne sličnosti sa referentnim selektivnim HDAC6 inhibitorom – rikolinostatom.



Slika 41. A. Predviđeni načini vezivanja C-8 za aktivno mjesto ROCK1 (PDB: 6E9W) i ROCK2 (PDB: 7JNT). B. Predviđeni načini vezivanja C-8 za aktivno mjesto HDAC1 (PDB: 5ICN) i katalitički domen 2 HDAC6 (PDB: 5EDU). Aminokiselinski ostaci koji ostvaruju interakcije su istaknuti ljubičastim (ROCK1, ROCK2) i zelenim štapićima (HDAC1, HDAC6), dok je C-8 označen ružičastom bojom.

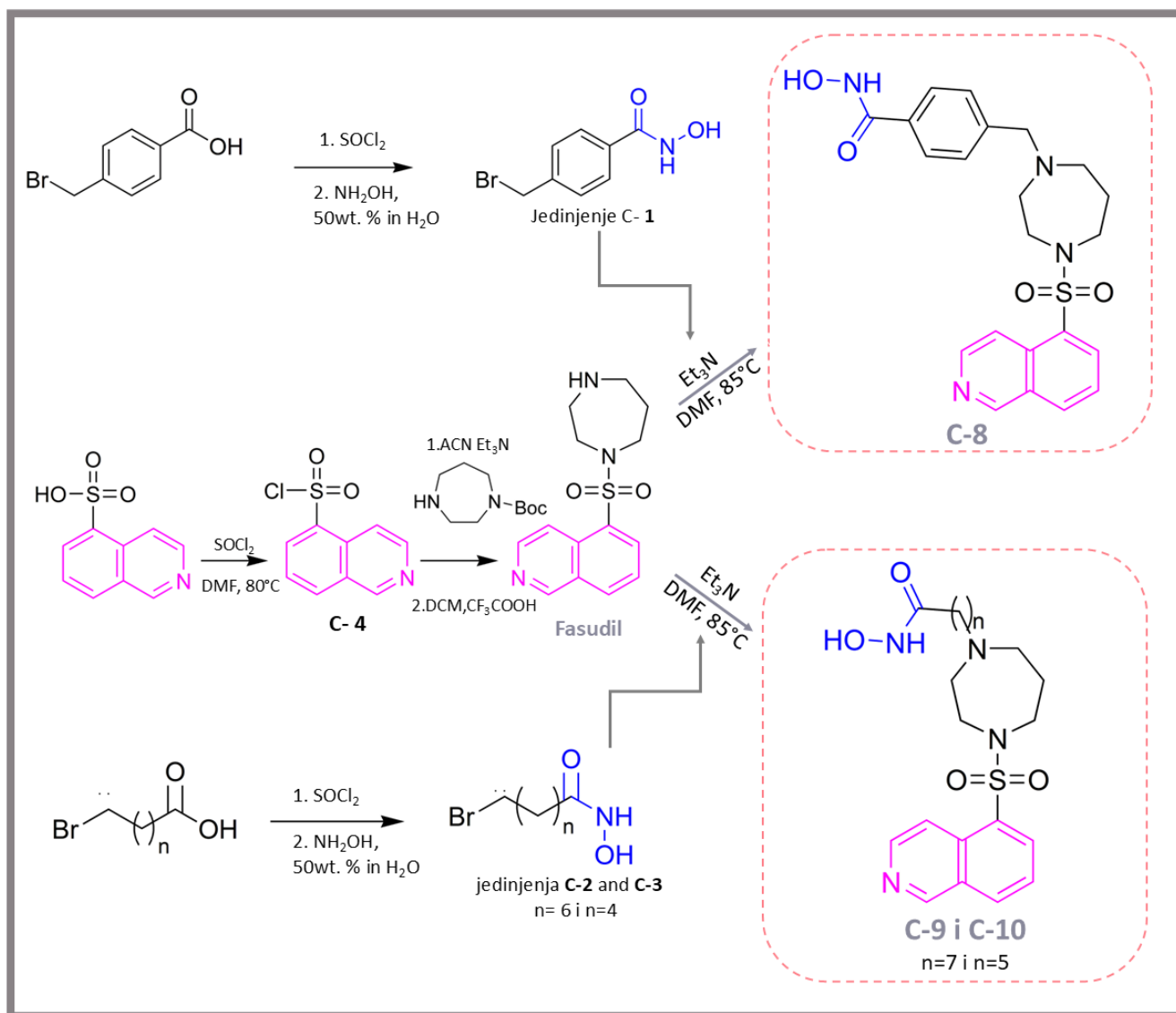
C-8, C-9 i C-10 su formirali komplekse sa cinkovim jonom u vezujućoj šupljini HDAC1. Kompleksi **C-8** i **C-10** sa cinkovim jonom su dodatno stabilizovani vodoničnim vezama sa različitim aminokiselinskim ostacima, uključujući Cys151 i Gly149 (**C-8**, **Slika 41-B**) i Gly138, Asp176 i Gln260 (**C-10**, **Slika 40-B**). *Van der Waalsove* interakcije su prisutne kod svih jedinjenja između linkera, CAP grupe i različitih aminokiselinskih ostataka, uključujući His178, His141, Phe150, Phe205 i Leu271 (**Slike 39-B, 40-B i 41-B**). Ovi rezultati ukazuju na to da su dizajnirani inhibitori sposobni da se efikasno vezuju za HDAC1, pri čemu je njihovo usidranje u aktivnom mjestu ovog enzima dodatno stabilizovano interakcijama karakterističnim za poznate HDAC inhibitore.



Slika 42. **A.** Predviđeni načini vezivanja fasudila za ROCK1 (PDB: 6E9W). **B.** Predviđeni načini vezivanja fasudila za ROCK2 (PDB: 7JNT). Aminokiselinski ostaci koji ostvaruju interakcije su istaknuti ljubičastim (ROCK1) i zelenim štapićima (ROCK2), dok je fasudil označen žutom bojom.

4.7. Sinteza i karakterizacija dualnih HDAC/ROCK inhibitora

Potencijalni dualni HDAC/ROCK inhibitori su sintetisani prema postupcima prikazanim na **Slici 43**. Fasudil je dobijen iz izohinolin-5-sulfonske kiseline i 1-Boc-homopiperazina. Nukleofilna supstitucija derivata bromohidroksamske kiseline (**C-1**, **C-2** i **C-3**) sa fasudilom u DMF-u na 85°C je rezultirala sintezom tri finalna dualna HDAC/ROCK inhibitora **C-8**, **C-9** i **C-10** u umjerenim prinosima (35-40%). Finalna jedinjenja su prečišćena fleš hromatografijom, a njihove strukture su potvrđene NMR i masenom spektroskopijom (**Tabela 8**). ^1H , ^{13}C i maseni spektri dualnih HDAC/ROCK inhibitora su predstavljeni u okviru **Priloga 3**.



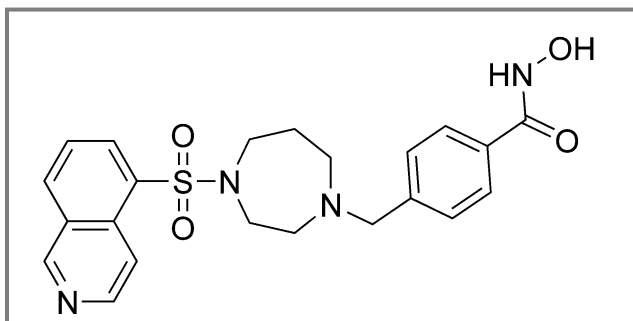
Slika 43. Shematski prikaz sinteze dualnih HDAC/ROCK inhibitora C-8, C-9 i C-10 polazeći od fasudila; n označava broj ugljenikovih atoma u ugljovodoničnom linkeru; ZBG je označena plavom bojom, dok je HBM označen ljubičastom bojom.

Tabela 8. Strukturna karakterizacija potencijalnih dualnih HDAC/ROCK inhibitora

Jedinjenje / procedura

Strukturna karakterizacija

C-8



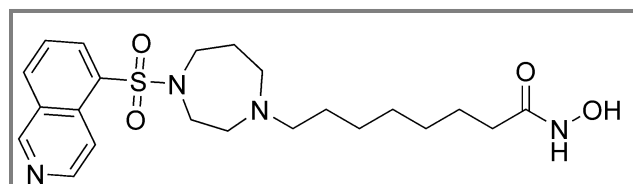
Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m=19 mg, 35 % prinos

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11,15 (s, 0,5H, rotamer a), 9,48 (s, 1H), 8,99 (s, 0,5H, rotamer b), 8,69 (d, J = 6,1 Hz, 1H), 8,45 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 8,36 – 8,31 (m, 1H), 7,83 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,66 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,29 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 3,60 (s, 2H), 3,45 (s, 4H), 2,62-2,56 (m, 4H), 1,73 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164,6, 153,9, 145,3, 142,8, 134,4, 134,1, 132,9, 131,9, 131,8, 131,1, 129,1, 128,7, 127,3, 127,0, 117,6, 60,7, 55,7, 54,8, 54,1, 48,1, 47,7, 46,9, 28,4.

HRMS-ESI (m/z) izračunato za C₂₂H₂₄N₄O₄S [M + H]⁺: 441,15910; izmjereno: 441,15912.

C-9



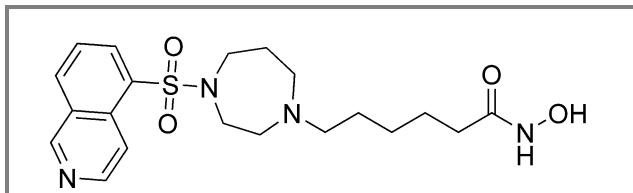
Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m=20 mg, 37,2% prinos

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,31 (s, 1H), 9,48 (s, 1H), 8,69 (d, J = 6,1 Hz, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,45 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 8,34 (dd, J = 14,3, 6,7 Hz, 2H), 7,83 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 3,42 (d, J = 5,7 Hz, 4H), 2,61-2,55 (m, 4H), 2,33 (d, J = 6,2 Hz, 2H), 1,91 (dd, J = 9,4, 5,1 Hz, 2H), 1,71 (s, 2H), 1,49 – 1,40 (m, 2H), 1,30 (s, 2H), 1,19 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169,6, 153,9, 145,3, 134,4, 134,0, 132,9, 131,1, 129,3, 127,0, 117,6, 56,8, 55,6, 55,4, 54,2, 48,1, 46,9, 32,7, 31,1, 29,0, 28,9, 28,2, 27,1, 25,5.

HRMS-ESI (m/z) izračunato za C₂₂H₃₂N₄O₄S [M + H]⁺: 449,22170; izmjereno: 449,22145.

C-10



Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m=19,4 mg, 36,7% prinos

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,31 (s, 1H), 9,48 (s, 1H), 8,69 (d, J = 6,1 Hz, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,45 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 8,34 (dd, J = 14,4, 6,6 Hz, 2H), 7,83 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 3,42 (t, J = 5,8 Hz, 4H), 2,62-2,56 (m, 4H), 2,33 (d, J = 6,7 Hz, 2H), 1,90 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 1,71 (s, 2H), 1,44 (dt, J = 14,9, 7,4 Hz, 2H), 1,30 (d, J = 6,8 Hz, 2H), 1,20 – 1,11 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169,5, 153,9, 145,3, 134,5, 134,0, 132,9, 131,1, 129,3, 127,0,

117,9, 56,7, 55,6, 54,2, 48,0, 46,9, 32,9, 28,2, 26,9, 26,8, 25,5.

HRMS-ESI (m/z) izračunato za C₂₀H₂₈N₄O₄S [M + H]⁺: 421,19040; izmjereno: 421,18995.

4.8. Rezultati *in vitro* enzimske evaluacije HDAC/ROCK dualnih inhibitora

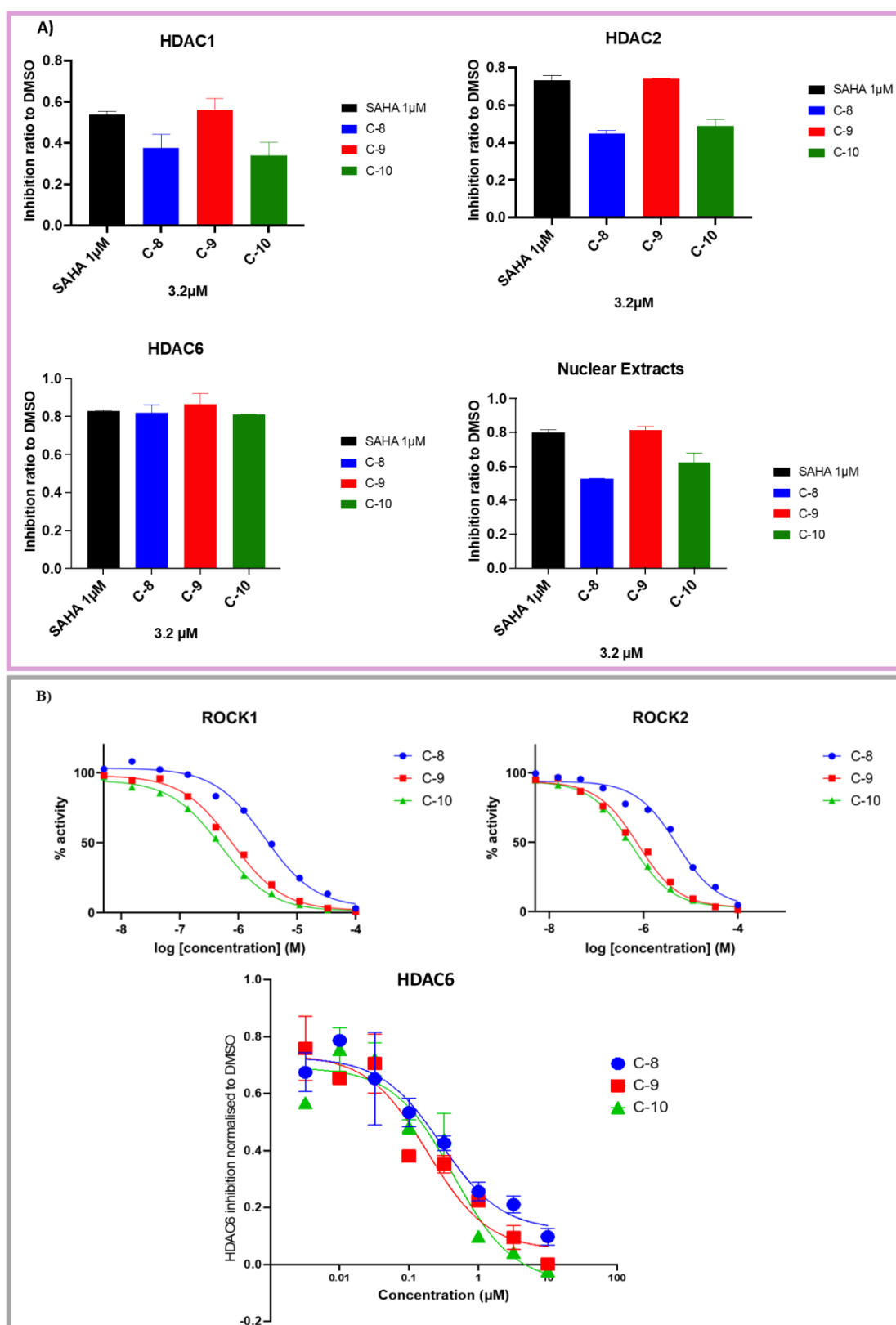
Aktivnost dizajniranih i sintetisanih dualnih HDAC/ROCK inhibitora je prvobitno evaluirana primjenom ROCK1 i ROCK2 komercijalnih *in vitro* biohemijskih testova. Inicijalno je sproveden skrining pri istoj koncentraciji svih dizajniranih jedinjenja od 10 µM. Sva ispitivana jedinjenja (**C-8**, **C-9** i **C-10**) su ispoljila inhibitorni efekat veći od 50% na oba enzima. Najbolju aktivnost je pokazalo jedinjenje **C-10**, sa stepenom inhibicije od 93,91% za ROCK1 i 82,05% za ROCK2, dok je jedinjenje **C-9** ostvarilo neznatno nižu potentnost sa procentima inhibicije od 93,34% za ROCK1, odnosno 80,37% za ROCK2 (**Tabela 9**). Potom su određene IC₅₀ vrijednosti za sva ispitivana jedinjenja za ROCK1 i ROCK2 kinazu (**Tabela 9**). Najpotentniju aktivnost je pokazalo jedinjenje **C-10** čije IC₅₀ vrijednosti iznose 468 nM za ROCK1 i 448 nM za ROCK2. Eksperimentalno dobijene doza-odgovor IC₅₀ krive za ROCK enzime su prikazane na Slici **44-B**.

Inhibitorna aktivnost jedinjenja prema HDAC enzimima je ispitivana pri koncentraciji od 3,2 µM, korišćenjem nuklearnog ekstrakta i enzima HDAC1, HDAC2 i HDAC6 (**Slika 44-A**). Sva jedinjenja su pokazala najizraženiju aktivnost prema HDAC6, što je poslužilo kao osnova za dalje određivanje IC₅₀ vrijednosti. Najpotentniji inhibitor je **C-9** sa IC₅₀ vrijednošću od 185 nM, dok su jedinjenja **C-8** i **C-10** pokazala niži inhibitorni potencijal prema HDAC6 sa IC₅₀ vrijednostima od 289 nM i 436 nM. Doza-odgovor IC₅₀ krive za HDAC6 su prikazane na **Slici 44-B**.

Tabela 9. Rezultati ROCK i HDAC *in vitro* enzimske evaluacije potencijalnih HDAC/ROCK inhibitora

Jedinjenje	% inhibicije (3.2 µM)				% inhibicije (10 µM)		IC ₅₀ (µM)		
	HDAC1	HDAC2	HDAC6	NE ^[a]	ROCK1	ROCK2	HDAC6	ROCK1	ROCK2
C-8	38	45	85	53	72	55	0.29±0.14	3±0.01	5±0.09
C-9	56	74	86	82	93	80	0.18±0.09	0.8±0.1	0.7±0.02
C-10	34	49	81	62	94	82	0.44±0.03	0.5±0.3	0.4±0.4

[a] nuklearni ekstrakt



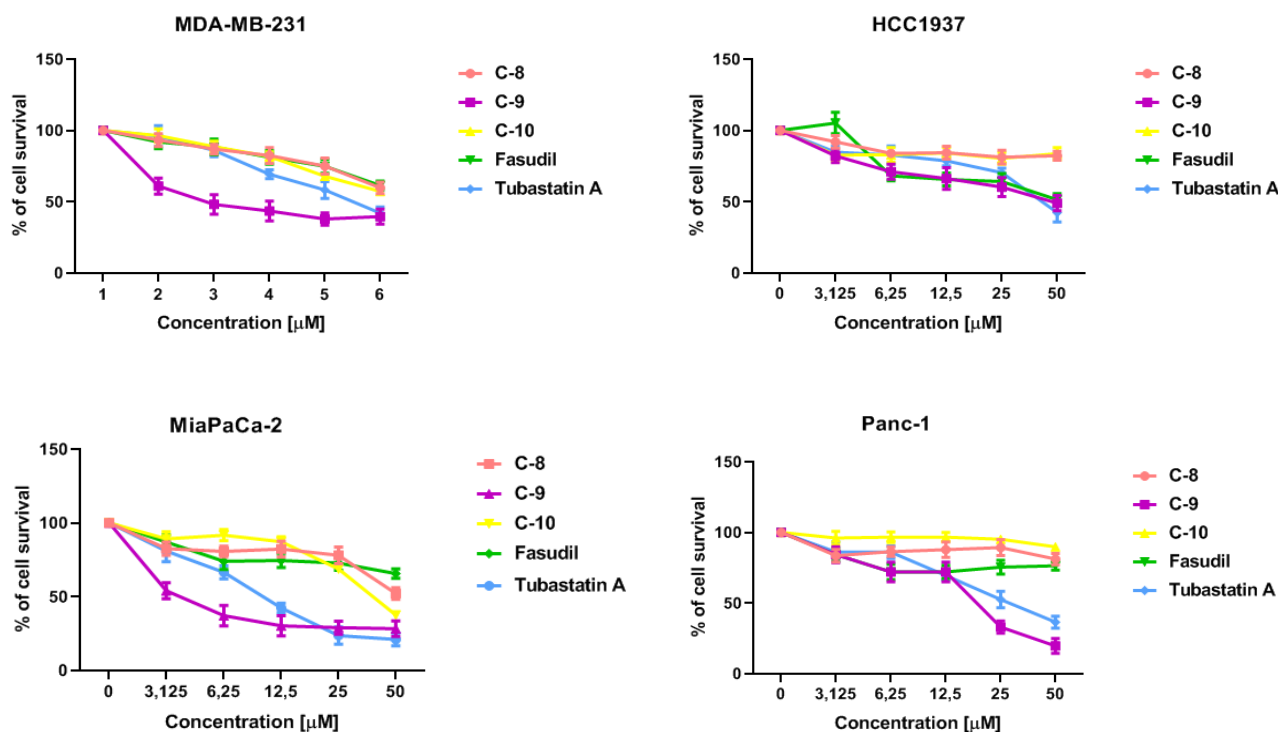
Slika 44. A) Dijagramski prikaz rezultata skrininga C-8, C-9 i C-10 za procjenu HDAC aktivnosti korišćenjem HDAC1, HDAC2, HDAC6 i nuklearnog ekstrakta pri istoj koncentraciji ispitivanih jedinjenja od 3.2 μM u poređenju sa SAHA. B) Prikaz dijagrama odnosa doze i ROCK1, ROCK2 ili

HDAC6 inhibicije najaktivnijih dualnih HDAC/ROCK inhibitora. % *activity* - % aktivnosti, *concentration* – koncentracija; *HDAC6 inhibition normalized to DMSO* – Inhibicija HDAC6 normalizovana u odnosu na DMSO.

4.9. Rezultati *in vitro* ćelijske evaluacije dualnih HDAC/ROCK inhibitora

4.9.1. Evaluacija citotoksičnosti dualnih HDAC/ROCK inhibitora

Ispitivan je uticaj dualnih HDAC/ROCK inhibitora (**C-8**, **C-9** i **C-10**) na vijabilnost tumorskih ćelija korišćenjem ćelijskih linija karcinoma dojke (MDA-MB-231 i HCC1937) i pankreasa (MiaPaCa-2 i Panc-1) nakon 72 sata tretiranja (**Slika 45**). Kao pozitivne kontrole u testovima citotoksičnosti su korišćeni selektivni HDAC6 inhibitor tubastatin A i ROCK inhibitor fasudil, čija je efikasnost u inhibiciji ovih enzima prethodno potvrđena u literaturi.



Slika 45. Uticaj C-8, C-9, C-10, fasudila i tubastatina A na preživljavanje MDA-MB-231, HCC1937, MiaPaCa-2 i Panc-1 ćelija u poređenju sa kontrolnim netretiranim ćelijama. % *of cell survival* - % preživljavanja ćelija; *concentration* – koncentracija.

Među ispitivanim jedinjenjima, **C-9** je pokazalo najizraženiji citotoksični efekat na ćelijske linije MDA-MB-231, MiaPaCa-2 i Panc-1, sa IC_{50} vrijednostima od 5,81 μ M, 3,87 μ M i 19,57 μ M (**Tabela 10**). Nasuprot tome, jedinjenja **C-8** i **C-10** su pokazala znatno slabiju citotoksičnost sa procijenjenim IC_{50} vrijednostima iznad 50 μ M za sve testirane ćelijske linije, osim **C-10** koje je imalo nešto nižu IC_{50} vrijednost za MiaPaCa-2 ćelije (40 μ M). Fasudil nije pokazao značajnu citotoksičnost ($IC_{50} > 50$ μ M za sve ćelijske linije), dok je selektivni HDAC6 inhibitor tubastatin A ispoljio umjerenu citotoksičnost, što je u skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale njegovu efikasnost u inhibiciji rasta određenih tumorskih linija, posebno onih sa visokom ekspresijom HDAC6.

Tabela 10. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti na MDA-MB-231, HCC1937, MiaPaCa-2, i Panc-1 tumorskim ćelijskim linijama

Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)				
	MDA-MB-231	HCC1937	MiaPaCa-2	Panc-1	MRC-5
C-8	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
C-9	5,81 ± 0,65 (8,1)	47,94 ± 3,25	3,87 ± 0,43 (12,1)	19,57 ± 1,56 (2,4)	46,89 ± 2,33
C-10	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Fasudil	> 50	> 50	> 50	> 50	92,02 ± 3,67
Tubastatin A	37,71 ± 2,34 (2,5)	43,28 ± 4,33 (2,1)	10,53 ± 1,19 (8,8)	29,06 ± 2,03 (3,2)	93,20 ± 4,5

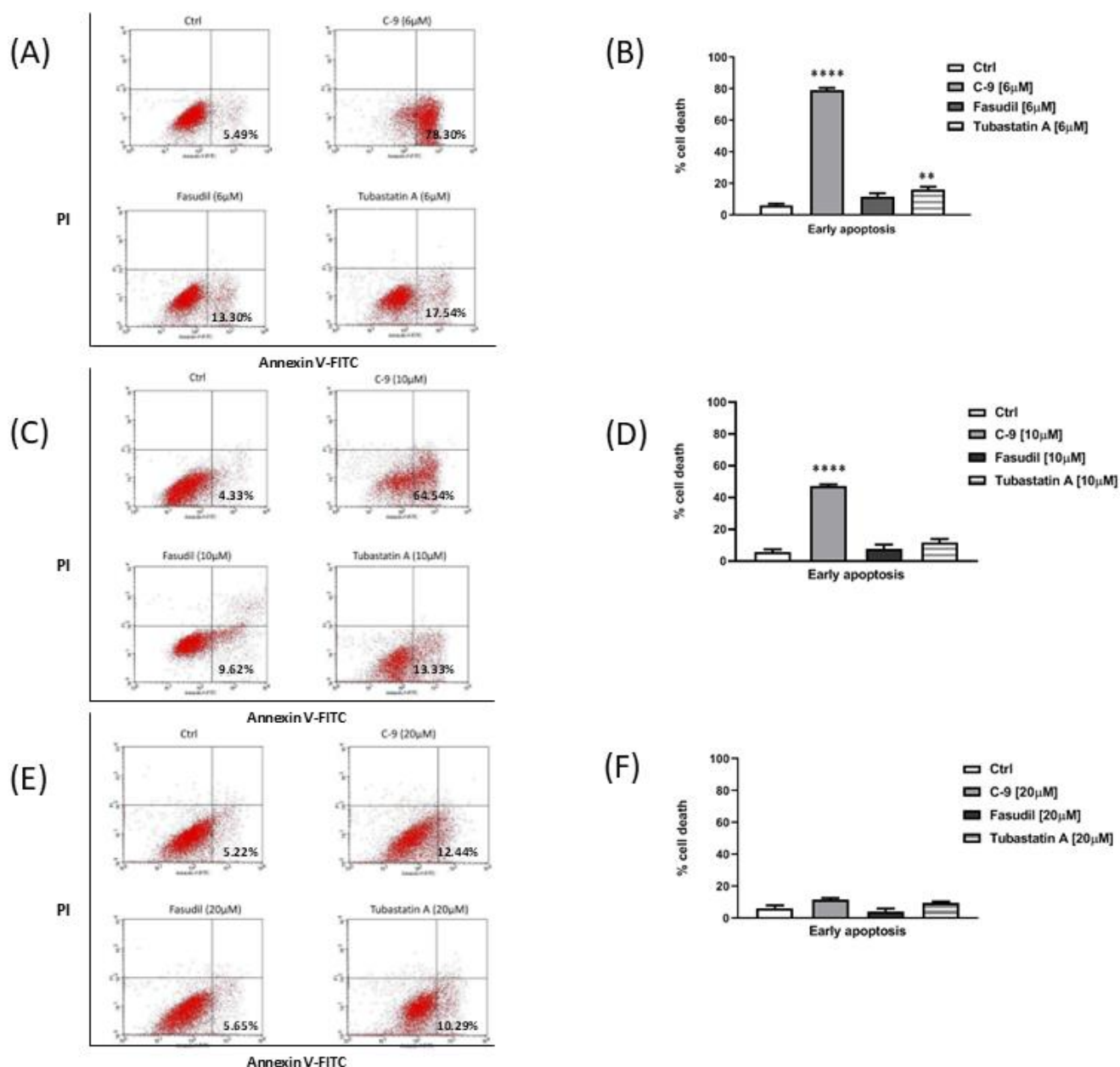
Dodatno je ispitana toksičnost svih jedinjenja na humanoj ćelijskoj liniji porijeklom iz fibroblasta pluća, **MRC-5**, kako bi se odredio indeks selektivnosti (Si), što je ključno za procjenu toksičnosti i terapijske širine ovih molekula. Jedinjenje **C-9** je pokazalo visoku selektivnost prema ćelijskim linijama MDA-MB-231 i MiaPaCa-2, sa Si vrijednostima od 8,1 i 12,1, dok je prema Panc-1 ćelijama ispoljilo umjerenu selektivnost (**Tabela 10**). Nasuprot tome, tubastatin A je pokazao visoku selektivnost prema MiaPaCa-2 ćelijama i umjerenu selektivnost prema ćelijskim linijama MDA-MB-231, HCC1937 i Panc-1 (**Tabela 10**).

S obzirom da je jedinjenje **C-9** pokazalo značajan citotoksični efekat, dodatno su sprovedena testiranja njegovog uticaja na apoptozu i ćelijski ciklus kako bi se razjasnili potencijalni molekularni mehanizmi putem kojih **C-9** indukuje ćelijsku smrt u ćelijama karcinoma dojke (MDA-MB-231) i pankreasa (MiaPaCa-2 i Panc-1). Ova ispitivanja su ključna za razumijevanje terapijskog potencijala dualnih HDAC/ROCK inhibitora.

4.9.2. Ispitivanje uticaja C-9 na translokaciju fosfatidilserina na ćelijskoj membrani u MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 ćelijama

Sposobnost HDAC/ROCK dualnog inhibitora **C-9** i pozitivnih kontrola (fasudil i tubastatin A) da indukuju programiranu ćelijsku smrt u ćelijskim linijama MDA-MB-231, MiaPaCa-2 i Panc-1 je ispitana nakon 48 sati tretmana pri ekvimolarnim koncentracijama. Analiza je sprovedena metodom protočne citometrije, nakon bojenja tretiranih ćelija Annexin V-FITC/PI.

Rezultati su pokazali da je tretiranje inhibitorom **C-9** dovelo do značajnog povećanja procenta rane apoptoze u ćelijama MDA-MB-231, pri čemu je približno 80% ćelija postalo apoptotično pri koncentraciji koja odgovara IC₅₀ vrijednosti od 6 μM (**Slike 46-A i 46-B**). U ćelijama MiaPaCa-2 je zabilježen umjeren efekat sa indukcijom rane apoptoze u približno 45% ćelijske populacije (**Slike 46-C i 46-D**). Nasuprot tome, **C-9** nije pokazao statistički značajan efekat na indukciju rane apoptoze u ćelijama Panc-1 (**Slike 46-E i 46-F**).



Slika 46. Uticaj dualnog HDAC/ROCK inhibitora C-9, tubastatina A i fasudila na udio ranih apoptotičnih ćelija MDA-MB-231 (A i B), MiaPaCa-2 (C i D) i Panc-1 (E i F) nakon 48 sati tretiranja. Razlike između tretiranih grupa i netretiranih kontrolnih grupa su procijenjene t-testom i smatrane su statistički značajnim za $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,0001$. Stubičasti dijagrami prikazuju rezultate izražene kao srednja vrijednost $\pm$ SEM tri nezavisna eksperimenta. Reprezentativni *dot-plot* dijagrami Annexin V/PI bojenih ćelija su dobijeni protočnom citometrijom nakon 48 sati tretmana MDA-MB-231 (A), MiaPaCa-2 (C) i Panc-1 (E) ćelija ispitivanim jedinjenjima. Rana apoptoza je prikazana kao procenat Annexin V+ PI- ćelija, dok kasna apoptoza odgovara procentu Annexin V+ PI+ ćelija. % cell death - % ćelijske smrti; early apoptosis – rana apoptoza.

Ispitivanje indukcije apoptoze u ćelijama MiaPaCa-2 je inicijalno sprovedeno pri koncentraciji koja odgovara IC_{50} vrijednosti jedinjenja **C-9** (4 μ M). S obzirom na to da je procenat apoptotičnih ćelija u ovom slučaju iznosio približno 20%, dalja analiza je uključivala testiranje svih jedinjenja pri koncentraciji od 10 μ M u ovoj ćelijskoj liniji.

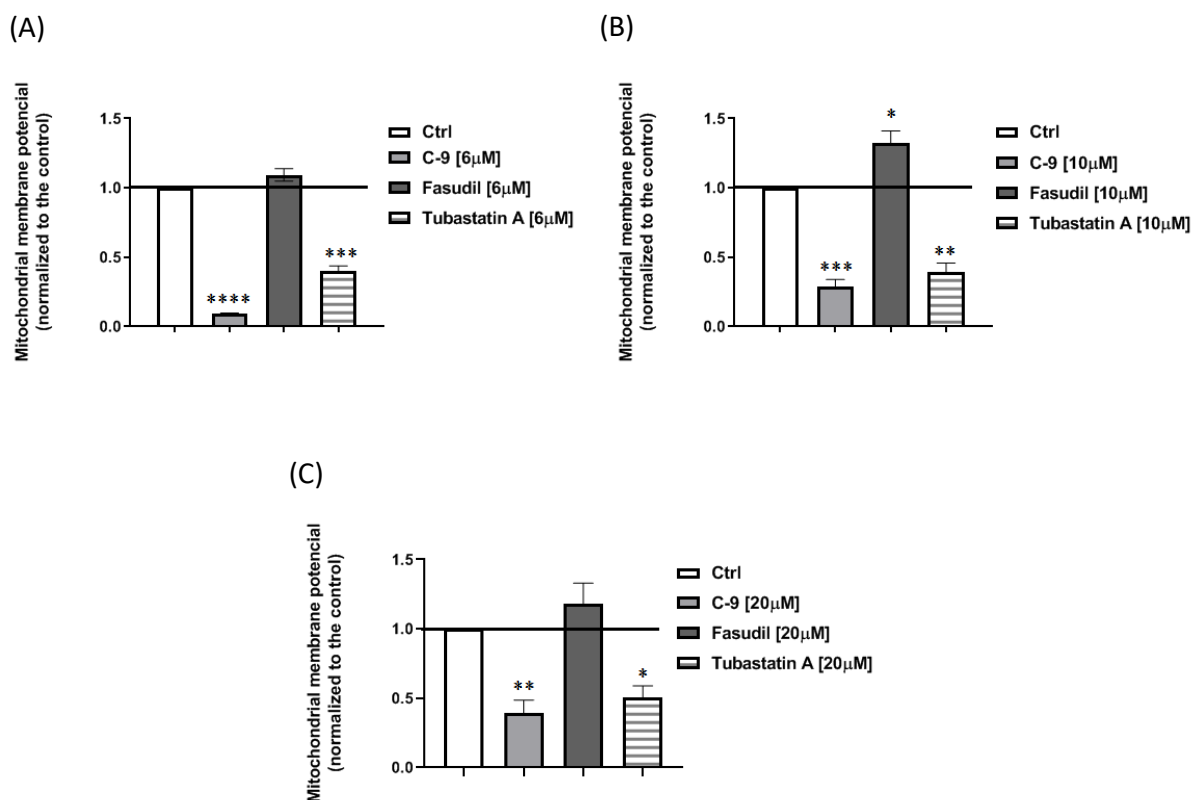
Analiza pozitivnih kontrola je pokazala da tubastatin A značajno povećava procenat ćelija MDA-MB-231 u ranoj apoptози (**Slike 46-A i 46-B**), dok fasudil nije ispoljio značajan efekat na indukciju apoptoze ni u jednoj ispitivanoj ćelijskoj liniji (**Slika 46**).

4.9.3. Ispitivanje uticaja C-9 na promjene mitohondrijskog membranskog potencijala

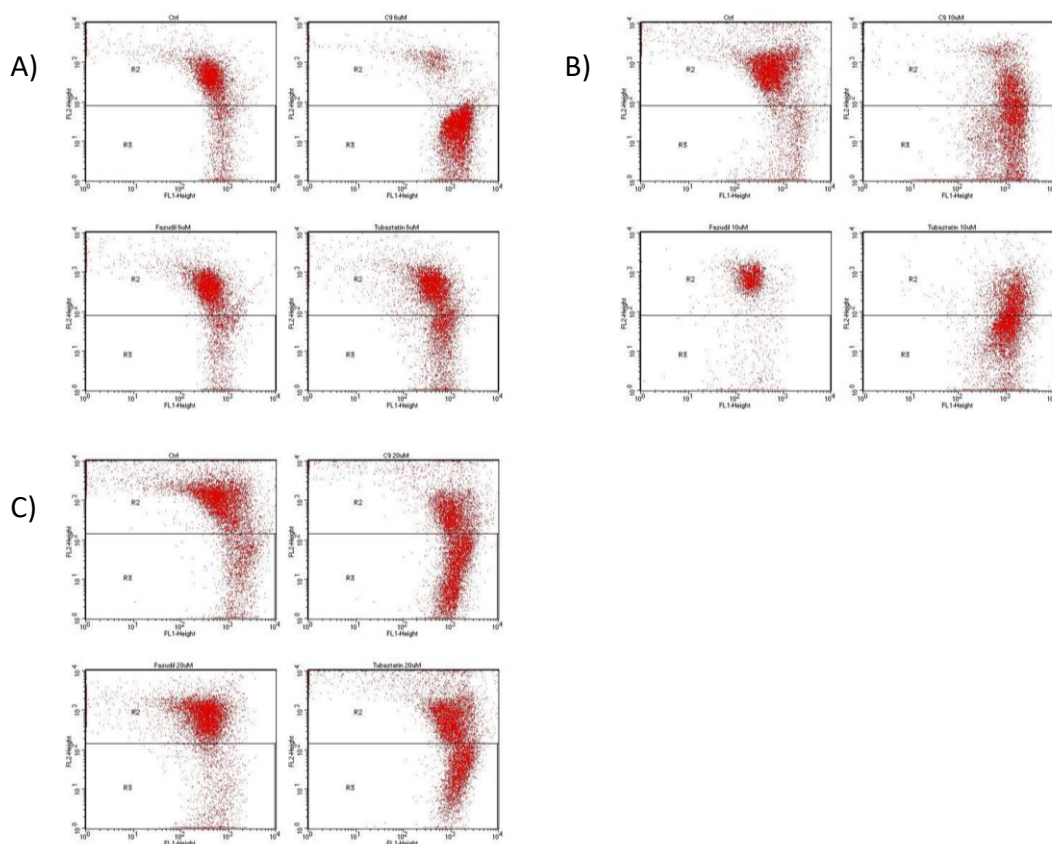
S obzirom da je aktivacija unutrašnjeg apoptotskog puta okarakterisana promjenama u mitohondrijskom membranskom potencijalu (MMP), u ovom istraživanju je ispitivan efekat **C-9**, fasudila i tubastatina A na MMP. Procjena MMP je izvršena metodom protočne citometrije korišćenjem JC-1 fluorescentne boje. Sposobnost ispitivanih jedinjenja da indukuju promjene u MMP je analizirana pri ekvimolarnim koncentracijama.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da su **C-9** i tubastatin A u ćelijama MDA-MB-231 doveli do statistički značajnog smanjenja MMP u odnosu na kontrolnu grupu (**Slike 47-A i 48-A**). U ćelijama MiaPaCa-2, tretman ovim jedinjenjima je takođe rezultirao značajnim smanjenjem MMP, dok je fasudil izazvao povećanje membranskog potencijala (**Slike 47-B i 48-B**). U ćelijama Panc-1, tretmani **C-9** i tubastatinom A su doveli do značajnog smanjenja MMP (**Slike 47-C i 48-C**), dok tretman fasudilom nije imao statistički značajan efekat.

Finalno, izraženo smanjenje mitohondrijskog membranskog potencijala (**Slike 47 i 48**) ukazuje na aktivaciju mitohondrijskog apoptotskog puta u ćelijskim linijama MDA-MB-231, MiaPaCa-2 i Panc-1, čak i nakon 24 sata tretmana **C-9 inhibitorom**.



Slika 47. Promjene mitohondrijskog membranskog potencijala su procijenjene metodom protočne citometrije korišćenjem JC-1 boje nakon 24 sata tretmana ćelija MDA-MB-231 (**A**), MiaPaCa-2 (**B**) i Panc-1 (**C**) ekvimolarnim koncentracijama C-9, fasudila i tubastatina A, u poređenju sa netretiranom kontrolom. Stubičasti dijagrami prikazuju rezultate izražene kao srednja vrijednost $\pm$ SEM tri nezavisna eksperimenta. Razlike između tretiranih grupa i netretiranih kontrola su analizirane t-testom i smatrane statistički značajnim za $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$. *Mitochondrial membrane potential (normalized to control)* – mitohondrijski membranski potencijal (normalizovan u odnosu na kontrolu).

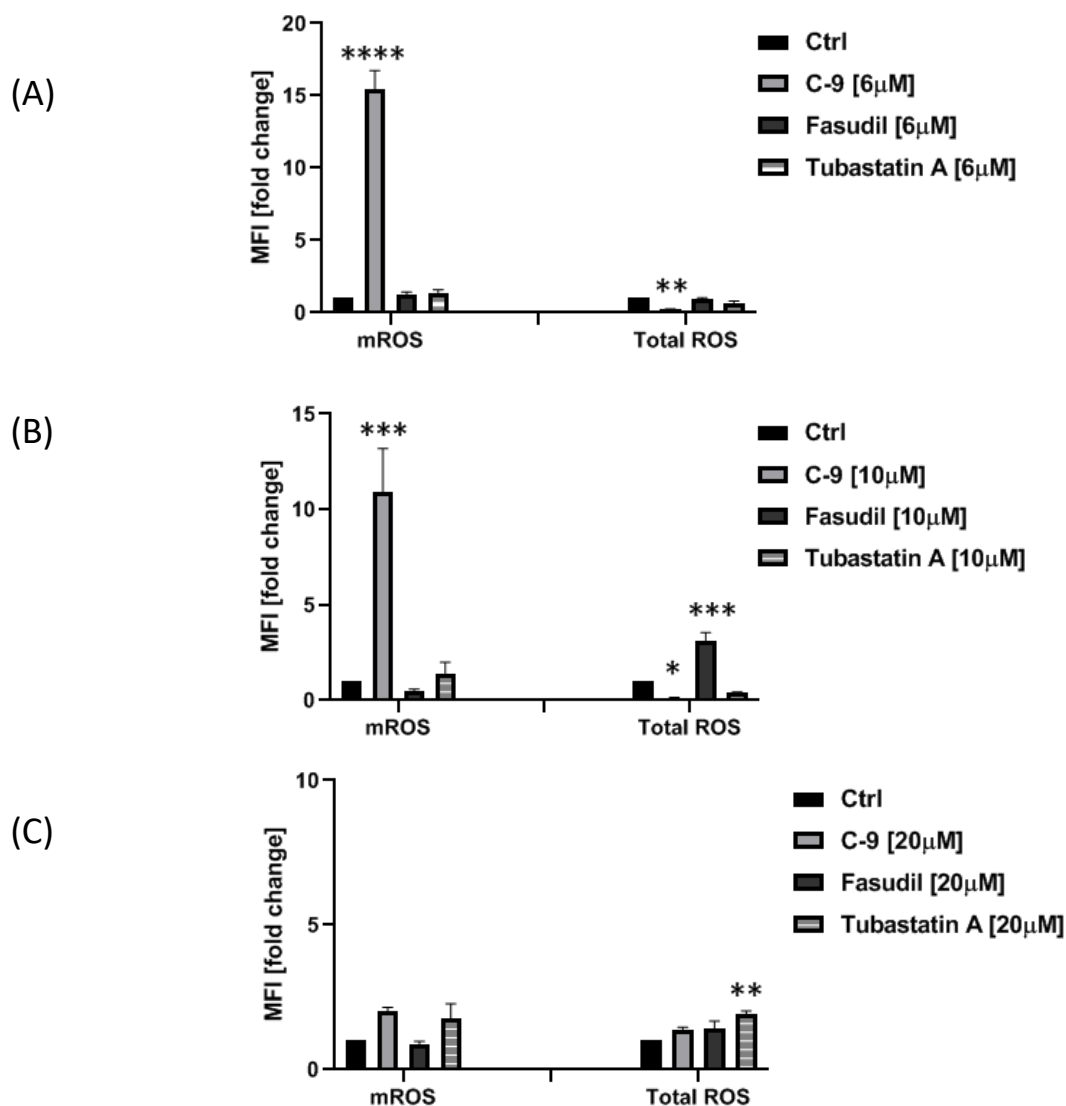


Slika 48. Promjene mitohondrijskog membranskog potencijala su procijenjene metodom protočne citometrije korišćenjem JC-1 boje nakon 24-časovnog tretmana ćelija MDA-MB-231 (**A**), MiaPaCa-2 (**B**) i Panc-1 (**C**) ekvimolarnim koncentracijama C-9, fasudila i tubastatina A, u poređenju sa netretiranom kontrolom. Prikazani su reprezentativni *dot-plot* dijagrami JC-1 bojenih ćelija dobijeni protočnom citometrijom nakon 24-časovnog tretmana ispitivanim jedinjenjima.

4.9.4. Ispitivanje uticaja C-9 na produkciju mitohondrijskih i ukupnih reaktivnih oblika kiseonika (ROS)

Nivoi mitohondrijskih i ukupnih ROS su određeni mjerenjem promjene u srednjem intenzitetu fluorescencije (MFI) nakon 24 sata tretiranja MDA-MB-231, MiaPaCa-2 i Panc-1 ćelija jedinjenjem **C-9**, u poređenju sa kontrolnim uzorcima (**Slika 49**). Kao pozitivne kontrole su korišćeni tubastatin A i fasudil.

Tretman jedinjenjem **C-9** je doveo do statistički značajnog povećanja proizvodnje mitohondrijskih ROS, uz istovremeno smanjenje ukupnih ROS, što sugerše ranu apoptotsku aktivnost ovog jedinjenja u MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 ćelijama (**Slike 49-A i 49-B**). Nasuprot tome, tretman fasudilom je doveo do značajnog porasta ukupnih ROS u MiaPaCa-2 ćelijama (**Slika 49-B**), dok je tubastatin A izazvao povećanje ukupnih ROS u Panc-1 ćelijama (**Slika 49-C**).



Slika 49. Promjena nivoa mitohondrijskih i ukupnih ROS u odnosu na kontrolu nakon 24-časovnog tretmana ćelija MDA-MB-231 (A), MiaPaCa-2 (B) i Panc-1 (C) jedinjenjima C-9, fasudilom i tubastatinom A u ekvimolarnoj koncentraciji. Stubičasti dijagrami prikazuju rezultate izražene kao srednja vrijednost $\pm$ SEM iz tri nezavisna eksperimenta. Razlika između tretiranih i netretiranih kontrolnih uzoraka je procijenjena t-testom i smatrana statistički značajnom za * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. *Fold change* – promjena u odnosu na kontrolu.

C-9 specifično djeluje na mitohondrije, remeti njihovu funkciju i dovodi do povećane proizvodnje ROS unutar ovih organela. Akumulacija mitohondrijskih ROS-a može rezultirati aktivacijom unutrašnjeg puta apoptoze u MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 ćelijama. Istovremeno, C-9 može indukovati adaptivne ćelijske odgovore kroz aktivaciju antioksidativnih mehanizama, uključujući glutation i superoksid dismutazu, kao odgovor na oksidativni stres izazvan lijekom.

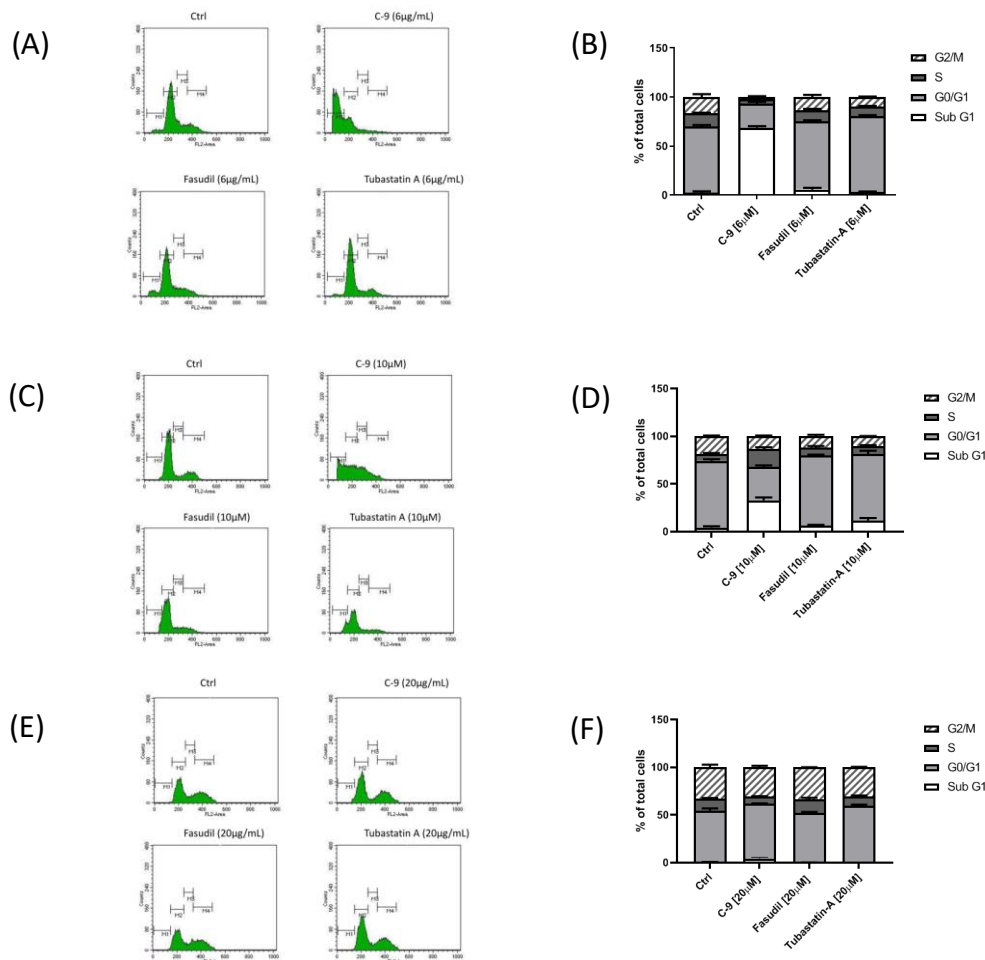
Poznato je da povećana ekspresija histon deacetilaza negativno korelira sa aktivnošću puta Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), koji je ključni regulator ćelijskog antioksidativnog odgovora [302]. Nrf2 kontroliše ekspresiju širokog spektra antioksidativnih gena, uključujući one odgovorne za sintezu glutationa i aktivnost superoksid dismutaze. Inhibicija HDACs može rezultirati aktivacijom Nrf2 i

njegovom translokacijom u jedro, što dovodi do pojačane transkripcije gena uključenih u antioksidativnu odbranu. Posljedično, ćelijski antioksidativni sistemi postaju efikasniji, povećavajući eliminaciju ukupnih nivoa ROS-a u ćelijama karcinoma. Pored toga, **C-9** može inhibirati i alternativne izvore ROS-a, poput NADPH oksidaze, enzima koji ima ključnu ulogu u generisanju citoplazmatskih ROS-a [303].

Kombinacija ovih efekata može rezultirati ukupnim smanjenjem intracelularnih nivoa ROS-a, dok se istovremeno održava selektivno povišeni oksidativni stres unutar mitohondrija. Iako ukupni nivoi ROS-a mogu biti smanjeni, lokalizovano povećanje mitohondrijskih ROS-a može biti dovoljno da inicira unutrašnji put apoptoze. Mitohondrijski ROS predstavljaju ključne aktivatore apoptotskih signalnih puteva, uključujući oslobađanje citohroma C, što dovodi do programirane ćelijske smrti. S obzirom na to da tumorske ćelije karakteriše viši nivo oksidativnog stresa u poređenju sa normalnim ćelijama, selektivna povećanje mitohondrijskih ROS-a, uz očuvanje ukupnog nivoa ROS, može omogućiti ciljano dejstvo na maligne ćelije uz očuvanje vitalnosti zdravih tkiva.

4.9.5. Ispitivanje uticaja C-9 na promjene ćelijskog ciklusa kod MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 tumorskih ćelija

Kako bismo ispitali potencijalni antiproliferativni efekat sintetisanog inhibitora **C-9**, sprovedena je analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa pri IC_{50} koncentraciji primjenom protočne citometrije. Tretman jedinjenjem **C-9** je doveo do povećanja procenta MDA-MB-231 ćelija u subG1 fazi (**Slike 50-A i 50-B**), što je bilo praćeno smanjenjem zastupljenosti ćelija u svim ostalim fazama ćelijskog ciklusa. U MiaPaCa-2 ćelijama, tretman **C-9** je uzrokovao povećanje procenta ćelija u subG1 i S fazi (**Slike 50-C i 50-D**), dok u ćelijama Panc-1 (**Slike 50-E i 50-F**) nije zabilježena značajna promjena u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana u poređenju sa netretiranom kontrolom. Pored toga, tretman tubastatinom A je izazvao povećanje procenta ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa u MiaPaCa-2 ćelijama (**Slike 50-C i 50-D**).



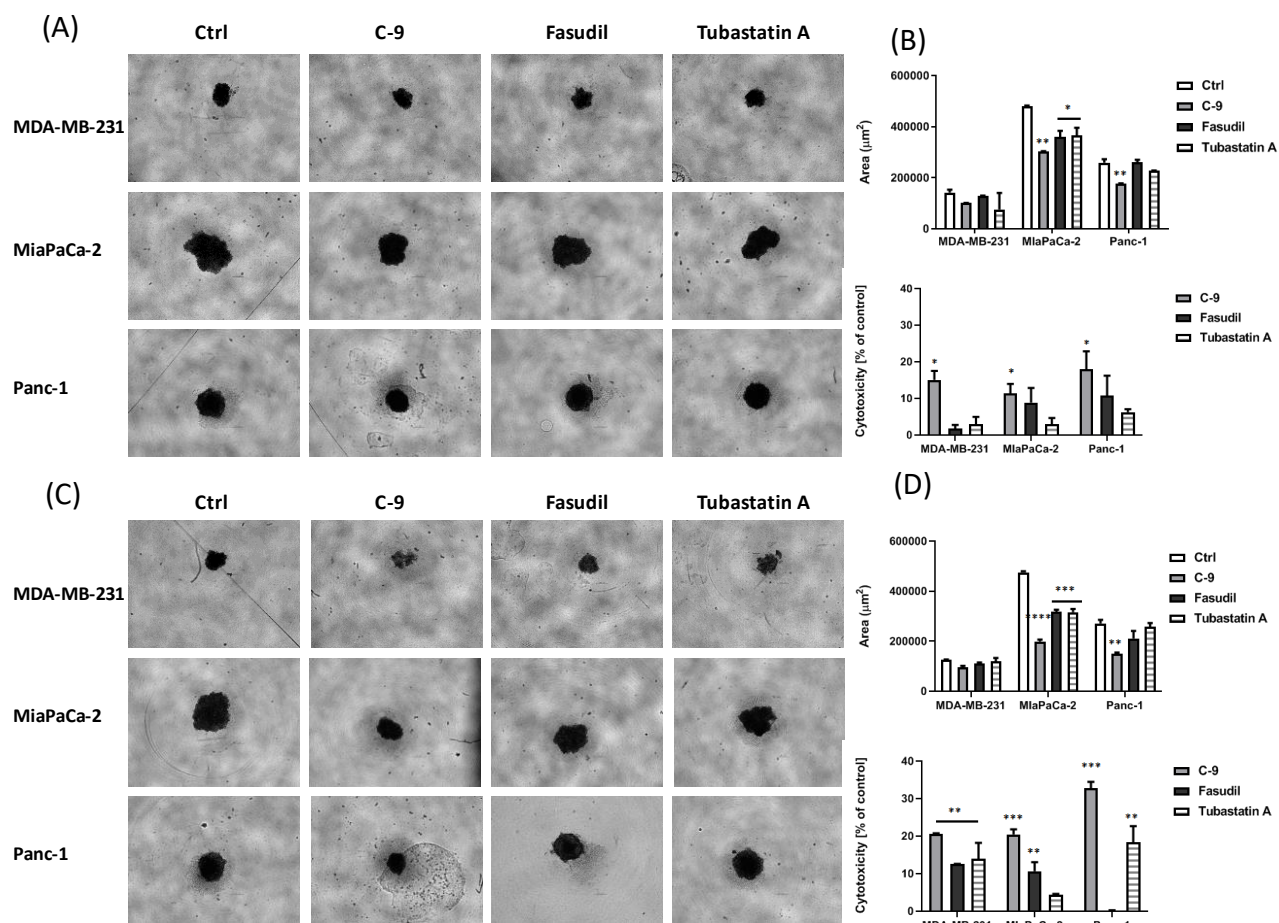
Slika 50. Promjene u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa MDA-MB-231 (A i B), MiaPaCa-2 (C i D) i Panc-1 (E i F) ćelija nakon 48 sati tretiranja ekvimolarnim koncentracijama jedinjenja C-9, tubastatina A i fasudila. Reprezentativni histogrami protočne citometrije prikazuju distribuciju ćelijskog ciklusa ćelija obojenih propidijum-jodidom (PI) nakon 48 sati tretiranja MDA-MB-231 (A), MiaPaCa-2 (C) i Panc-1 (E) ćelija ekvimolarnim koncentracijama jedinjenja C-9, fasudila i tubastatina A. M1 – apoptotske ćelije sa sadržajem DNK koji odgovara sub-G1 frakciji; M2 – ćelije sa sadržajem DNK koji odgovara G0/G1 fazama; M3 – ćelije sa sadržajem DNK koji odgovara S fazi; M4 – ćelije sa sadržajem DNK koji odgovara G2/M fazama; % of total cells - % ukupnih ćelija.

4.9.6. Ispitivanje efikasnosti C-9 pomoću 3D tumorskih modela

U ovoj studiji, tumorski sferoidi MDA-MB-231, MiaPaCa-2 i Panc-1 ćelijskih linija su korišćeni za ispitivanje efekata C-9 dualnog HDAC/ROCK inhibitora na vijabilnost, rast i formiranje sferoida tumorskih ćelija. Eksperimenti su izvedeni pri ekvimolarnim koncentracijama koje su prethodno korišćene u 2D modelu tokom 72 časa, a dobijeni rezultati su upoređeni sa efektima tubastatina A i fasudila.

Analiza veličine tumorskih sferoida je pokazala da tretman jedinjenjem **C-9** nije doveo do značajnog smanjenja veličine tumorskih sferoida MDA-MB-231 ćelijskih linija u poređenju sa netretiranom kontrolom (**Slike 51-A i 51-B**). Međutim, pri koncentraciji od 6 μM , koja je korišćena u 2D modelu, zabilježen je statistički značajan pad vijabilnosti ovih sferoida. S druge strane, tretman MiaPaCa-2 i Panc-1 tumorskih sferoida jedinjenjem **C-9** je rezultirao značajnim smanjenjem i veličine i vijabilnosti sferoida tokom vremena, pri koncentracijama od 10 μM i 20 μM (**Slike 51-A i 51-B**). Za razliku od **C-9**, fasudil i tubastatin A su doveli do samo blagih promjena u veličini MiaPaCa-2 tumorskih sferoida pri koncentraciji od 10 μM , dok nisu pokazali značajne citotoksične efekte (**Slike 51-A i 51-B**).

Dodatno je ispitivana sposobnost ovih jedinjenja da inhibiraju formiranje tumorskih sferoida. Ćelijske linije MDA-MB-231, MiaPaCa-2 i Panc-1 su ko-kultivisane sa ispitivanim jedinjenjima (pri ekvimolarnim koncentracijama) u uslovima koji su korišćeni za formiranje tumorskih sferoida tokom četiri dana (**Slike 51-C i 51-D**). Nakon ovog perioda je primjećeno formiranje tumorskih sferoida sa karakterističnom zbijenom morfologijom u netretiranim kontrolnim uzorcima (**Slika 51-C**). U MDA-MB-231 ćelijama tretman jedinjenjem **C-9**, fasudilom i tubastatinom A (6 μM) tokom četiri dana je doveo do smanjenja vijabilnosti sferoida, ali nije imao značajan uticaj na njihovo formiranje (**Slike 51-C i 51-D**). Nasuprot tome, tretman jedinjenjem **C-9**, fasudilom i tubastatinom A pri ekvimolarnim koncentracijama korišćenim u 2D modelu (10 μM) je rezultirao značajnom inhibicijom formiranja i vijabilnosti MiaPaCa-2 tumorskih sferoida (**Slike 51-C i 51-D**). U ćelijama Panc-1, jedinjenje **C-9**, slično tubastatinu A, je pokazalo izražen citotoksični efekat pri koncentraciji od 20 μM , pri čemu je **C-9** dodatno inhibirao i samo formiranje tumorskih sferoida (**Slike 51-C i 51-D**). Fasudil nije pokazao značajan efekat na Panc-1 tumorke sferoide (**Slike 51-C i 51-D**).



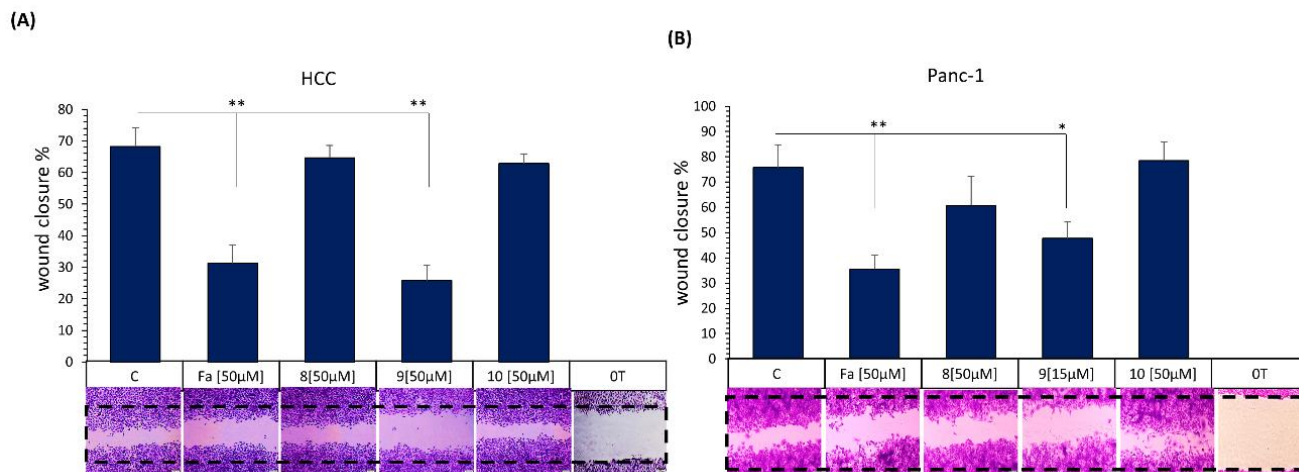
Slika 51. MDA-MB-231, MiaPaCa-2 i Panc-1 sferoidi su korišćeni za ispitivanje efekata C-9 na vijabilnost, rast i formiranje tumorskih sferoida pri ekvimolarnim koncentracijama korišćenim u 2D modelu tokom 72 časa. Tubastatin A i fasudil su korišćeni kao pozitivne kontrole. Formiranje i rast tumorskih sferoida su analizirani i snimljeni mikroskopom Olympus CKX53, korišćenjem objektiva 4×/0.13, skala: 200 µM. **(A)** Tumorski sferoidi ćelijskih linija MDA-MB-231, MiaPaCa-2 i Panc-1 posmatrani u svijetlom polju. **(B)** Citotoksičnost ispitivanih jedinjenja na tumorske sferoide MDA-MB-231 ćelija je analizirana MTT testom. Dodatno je ispitivana sposobnost jedinjenja da inhibiraju formiranje sferoida. Ćelije MDA-MB-231, MiaPaCa-2 i Panc-1 su ko-kultivisane sa ispitivanim jedinjenjima (pri ekvimolarnim koncentracijama) od početka eksperimenta u uslovima neophodnim za formiranje tumorskih sferoida tokom četiri dana **(C i D)**. **(C)** Formiranje i rast tumorskih sferoida su analizirani i snimljeni mikroskopom Olympus CKX53, koristeći objektiv 4×/0.4, skala: 200 µM. **(D)** Citotoksičnost jedinjenja u tumorskim sferoidima MDA-MB-231, MiaPaCa-2 i Panc-1 je analizirana MTT testom. Površina tumorskih sferoida je izmjerena korišćenjem softverskih alata ImageJ; *Citotoxicity* – citotoksičnost, *Area* – površina.

4.9.7. Ispitivanje uticaja C-9 na migraciju i invaziju tumorskih ćelija u *in vitro* uslovima

Hemijski slični izohinolinski HDAC/ROCK inhibitori **C-8**, **C-9** i **C-10** su korišćeni za ispitivanje njihovog potencijalnog inhibitornog efekta na migraciju i invaziju ćelija karcinoma dojke i pankreasa *in vitro*. Ove dvije biološke funkcije su od suštinskog značaja za progresiju tumora, metastaziranje i lošu prognozu kod pacijenata, te njihova inhibicija predstavlja ključnu strategiju u razvoju novih terapijskih agenasa.

Za procjenu efekata ispitivanih jedinjenja na ćelijsku migraciju korišćen je test zarastanja rana (*wound-healing assay*) koji omogućava proučavanje kolektivne migracije ćelija *in vitro* [282]. U ovom eksperimentu su korišćene epitelne ćelijske linije HCC1937 i Panc-1 koje u standardnim uslovima kultivisanja konzistentno zatvaraju ogrebotine, što ih čini pogodnim modelima za ovu vrstu ispitivanja. Svi tretmani su sprovedeni u roku od 24 časa od dodavanja različitih jedinjenja u koncentracijama koje odgovaraju IC₅₀ vrijednostima definisanim u **Tabeli 10**, kako bi se minimizirali potencijalni efekti na ćelijsku vijabilnost tokom perioda ispitivanja (podaci nisu prikazani).

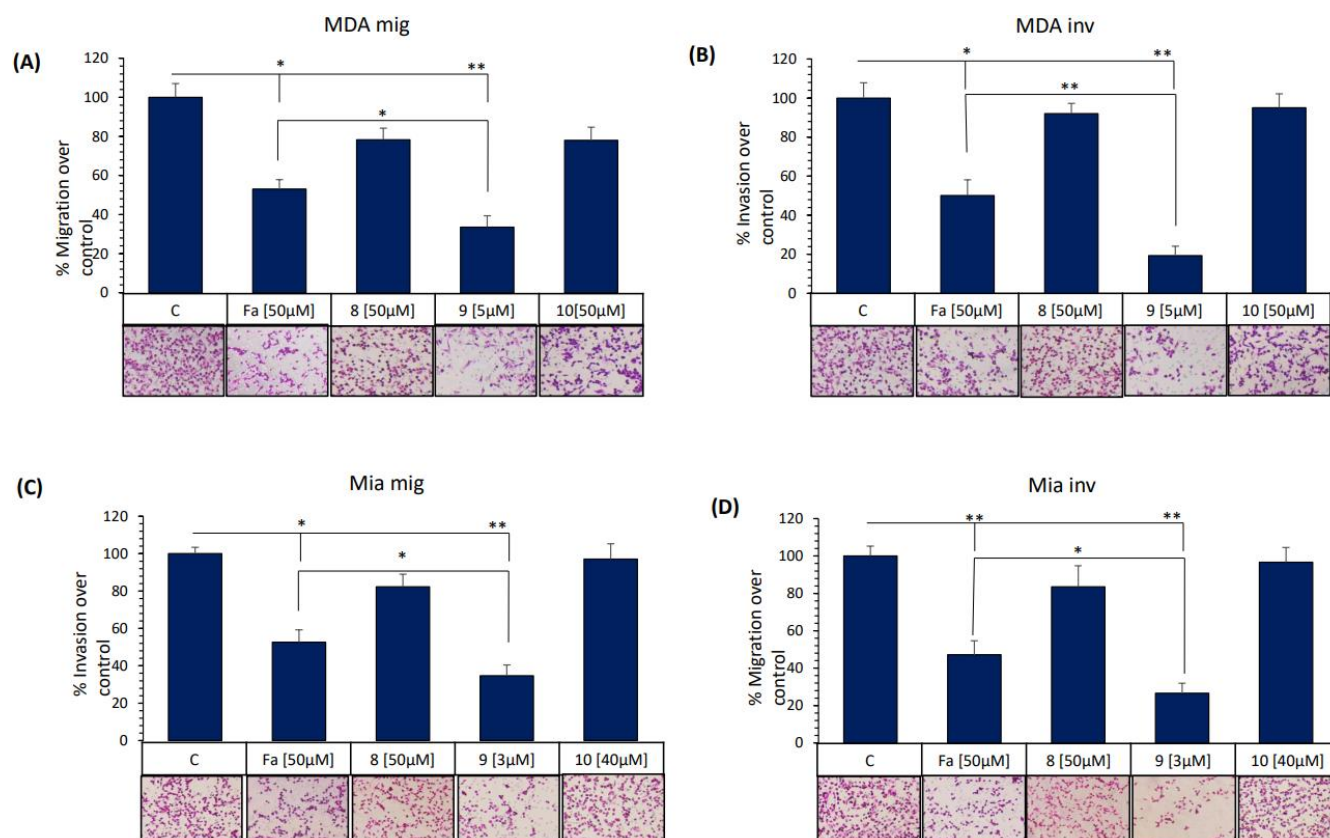
Rezultati prikazani na **Slikama 52-A** i **52-B** pokazuju da jedino jedinjenje **C-9** značajno inhibira zatvaranje rane, pri čemu je njegov efekat bio uporediv sa djelovanjem poznatog ROCK inhibitora, fasudila (Fa). Ovi rezultati ukazuju na potencijal jedinjenja **C-9** da ometa ćelijsku migraciju, što je ključno za spriječavanje metastaziranja.



Slika 52. Antimigraciona aktivnost novih HDAC/ROCK dualnih inhibitora (C-8, C-9 i C-10) i fasudila (Fa) na HCC ćelijama (A) i Panc-1 ćelijama (B). T0 – početno vrijeme; C- kontrola, *Wound closure* – zarastanje rana.

Pored analize kolektivne migracije, ispitivana je i individualna migracija i invazija ćelija korišćenjem *Transwell* testa, koji simulira trodimenzionalnu pokretljivost ćelija i njihovu sposobnost da savladaju fizičke barijere [284]. U ovom eksperimentu su analizirane mezenhimski ćelijske linije MDA-MB-231 i pleomorfne MiaPaCa-2 ćelije, koje posjeduju visok invazivni potencijal. Ćelije su morale da pređu kroz membranu sa porama prečnika 8 μm, dok su u testu invazije membrane bile prekrivene Matrigelom, koji oponaša ekstracelularni matriks (ECM) tumorskog mikrookruženja. Ovaj sistem omogućava diferencijaciju između čiste migracije i invazije, pri čemu ćelije u invazivnom testu moraju najprije da razgrade ECM prije nego što pređu na suprotnu stranu membrane.

Kako je prikazano na **Slikama 53-A i 53-C**, jedino je jedinjenje **C-9** značajno smanjilo migraciju ćelija. U prisustvu **C-9** je došlo do ispoljavanja anti-migracionih osobina, pri čemu je redukovana migracija 64,5% MDA-MB-231 i 65,3% MiaPaCa-2 ćelija u poređenju sa kontrolnim uslovima. Sličan efekat je uočen i u testu invazije (**Slike 53-B i 53-D**), gdje je **C-9** smanjio invazivni potencijal MDA-MB-231 ćelija za 80,7%, dok je kod MiaPaCa-2 ćelija redukcija invazivnih svojstava 93,4% u poređenju sa kontrolnim ćelijama.



Slika 53. Antimigraciona i antiinvazivna aktivnost dualnih HDAC/ROCK inhibitora (C-8, C-9 i C-10) i fasudila (Fa) na MDA-MB-231 ćelijama (**A i B**) i MiaPaCa-2 ćelijama (**C i D**). C – kontrola. % invasion over control - % invazije u odnosu na kontrolu; % migration over control - % migracije u odnosu na kontrolu.

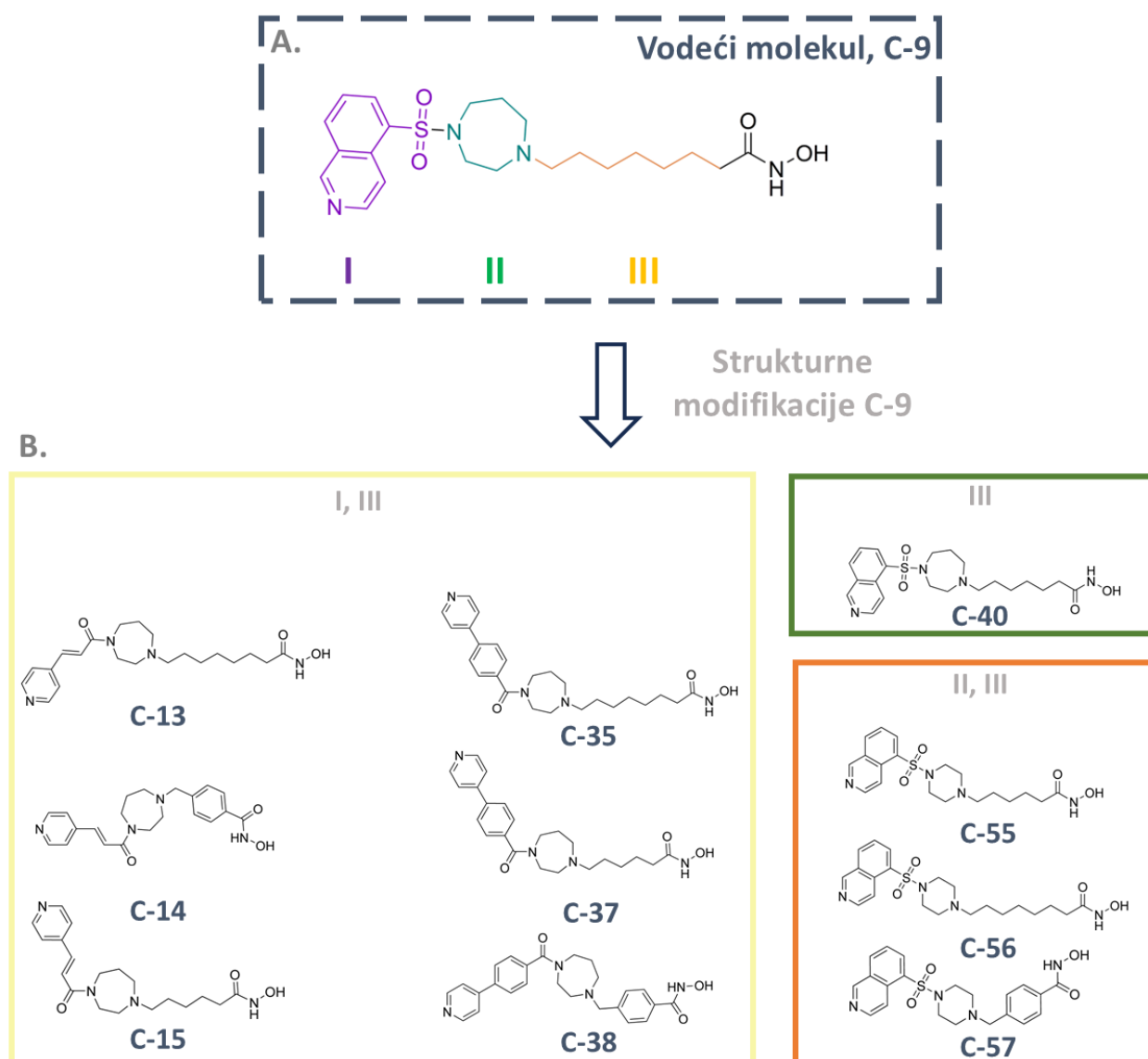
Ovi podaci jasno ukazuju na sposobnost jedinjenja **C-9** da značajno inhibira migraciju i invaziju ispitivanih ćelijskih linija što ga čini potencijalnim kandidatom za dalje prekliničke studije usmjerene ka metastatskim oblicima karcinoma. Takođe, **C-9** je pokazao superiornu inhibiciju migracije i invazije u poređenju sa fasudilom, koji je smanjio ćelijsku pokretljivost za približno 50%. Nasuprot tome, jedinjenja **C-8** i **C-10** nisu značajno uticala na migraciju i invaziju MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 ćelija.

S obzirom na to da je disregulacija HDAC i ROCK signalnih puteva povezana sa epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (EMT), ćelijskom plastičnošću i povećanom sposobnošću metastaziranja, dobijeni rezultati dodatno podržavaju hipotezu da dualna inhibicija ovih enzima može predstavljati obećavajući terapijski pristup u tretmanu invazivnih i metastatskih oblika karcinoma dojke i pankreasa.

4.10. Dizajn i virutelni skrining novih HDAC/ROCK inhibitora zasnovan na korišćenju strukture prethodno identifikovanog *lead* molekula C-9

Na osnovu rezultata prethodno sprovedenih enzimskih i ćelijskih studija identifikovan je vodeći molekul (*lead*) **C-9**, koji je ispoljio snažne citotoksične, antiproliferativne, antiinvazivne i antimigratorne efekte kako u dvodimenzionalnim, tako i u 3D sferoidima tumorskih ćelija. **Dalje modifikacije strukture C-9 su iskorišćene za dizajn novih HDAC/ROCK inhibitora.**

Korišćenjem strukture **C-9** kao *lead* molekula, dizajnirani su novi *multitarget* HDAC/ROCK inhibitori. Modifikacije **C-9** su bile usmjerene ka dvije ključne regije: CAP grupi/*hinge* vezujućem domenu i linkeru, dok je cink-vezujuća grupa ostala nepromijenjena u svim novodizajniranim jedinjenjima (**Slika 54-A**). Ukupno je dizajnirano deset novih jedinjenja, koja su potom evaluirana primjenom savremenih *in silico* metoda, uključujući molekulski doking i proračune slobodne energije vezivanja MM-GBSA pristupom (**Slika 54-B**). Ove metode su omogućile detaljnu procjenu potencijala dizajniranih molekula kao *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora.

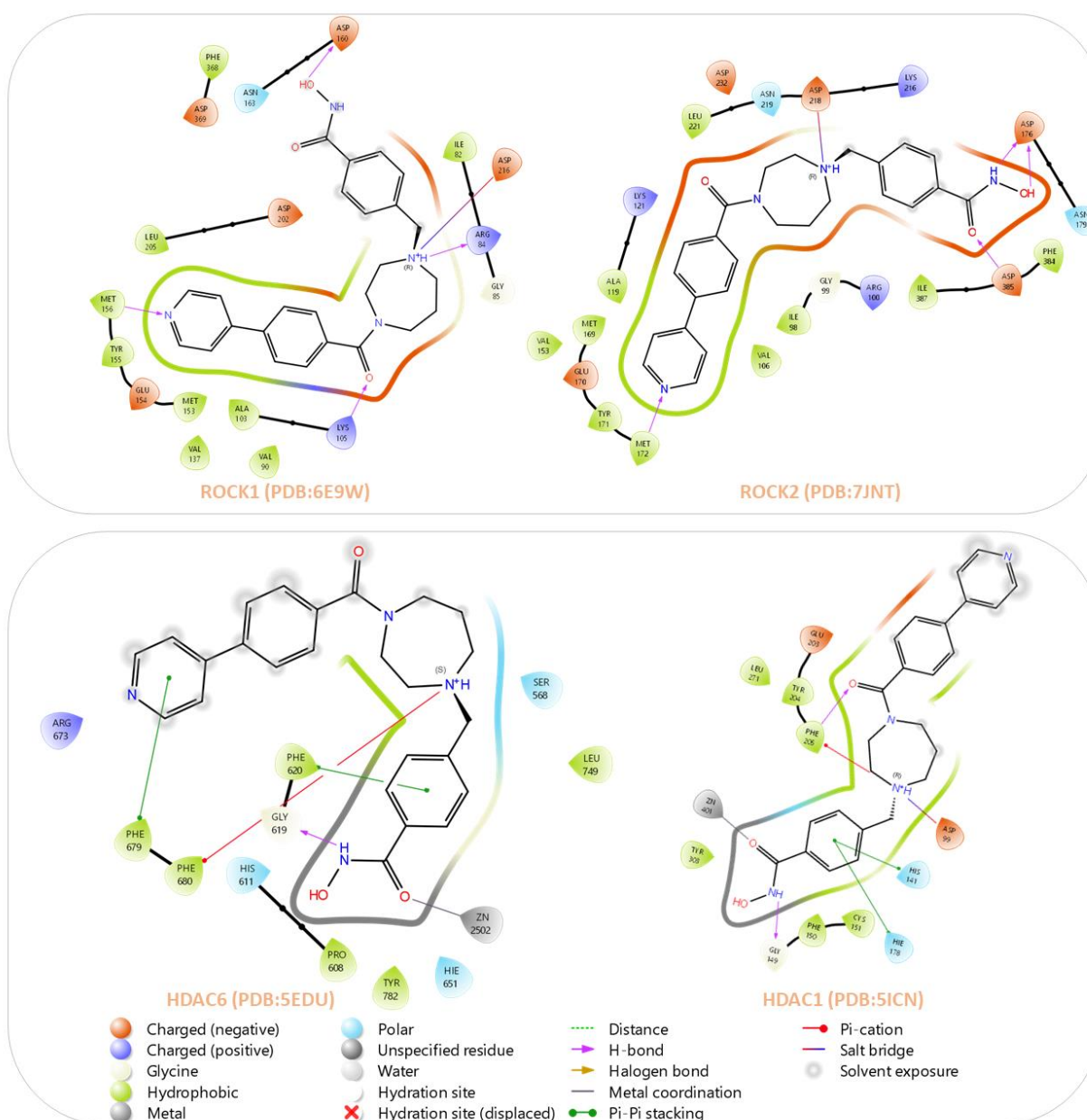


Slika 54. A. Hemijska struktura vodećeg jedinjenja **C-9**, sa označenim farmakofornim regionima: CAP grupa/*hinge-binding* region, linker i cink-vezujuća grupa (hidroksamska kiselina). Obilježeni su položaji koji su strukturno modifikovani u cilju optimizacije afiniteta prema HDAC i ROCK izoformama. **B.** Hemijske strukture dizajniranih analoga **C-9**.

4.10.1. Molekulski doking i MM-GBSA računanja slobodne energije vezivanja novodizajniranih *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora

Sva novodizajnirana jedinjenja su pokazala povoljne rezultate molekulskog dokinga, uključujući niske vrijednosti energije vezivanja, visoku efikasnost liganda (*ligand efficiency*, LE), kao i povoljne *GlideScore* i *DockingScore* vrijednosti, što ukazuje na potencijalnu sposobnost stabilnog vezivanja u aktivnim mjestima ciljanih enzima (**Tabela P3.1.**).

U poređenju sa **C-9** (**Slika 39**), dva jedinjenja **C-57** i **C-38** su pokazala superiornije rezultate doking evaluacije. Konkretno, **C-57** je ispoljio poboljšane *DockingScore* i *GlideScore* vrijednosti, naročito u odnosu na ROCK2 i HDAC6. Sa druge strane, **C-38** je pokazao bolje doking vrijednosti na sve tri ispitivane izoforme - ROCK1, ROCK2 i HDAC6, čime je demonstrirao potencijal za uravnoteženo *multitarget* djelovanje. Ovi rezultati su u potpunosti u skladu sa predviđenim pozama vezivanja za **C-38** i **C-57** (**Slika 55**), pri čemu su ključne interakcije kao što su vodonične veze sa *hinge* regionom ROCK enzima i koordinacija cinkovog jona u katalitičkom domenu 2 HDAC6 jasno uočene kod oba jedinjenja.



Slika 55. Ključne interakcije **C-38** sa aktivnim mjestima ROCK1, ROCK2, HDAC6 i HDAC1.

Među preostalim dizajniranim molekulima, većina je pokazala poboljšane afinitete prema ROCK2 u poređenju sa **C-9**. Međutim, doking vrijednosti za HDAC6 su bile u većini slučajeva inferiornije u odnosu na **C-9**. Izuzetak predstavlja jedinjenje **C-37** čija je doking vrijednost za HDAC6 uporediva sa **C-9**. (Tabela P.3.1).

Na osnovu proračuna slobodne energije vezivanja metodom MM-GBSA (*Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area*), kao i procjene efikasnosti vezivanja (izražene kroz parametre poput *binding efficiency* i *ligand efficiency*), identifikovano je više potencijalnih inhibitora. Posebno su se istakla jedinjenja **C-14**, **C-15** i **C-38**, koja su pokazala povoljnije vrijednosti slobodne energije vezivanja u odnosu na **C-9**, i to prema svim analiziranim enzimima – HDAC6, ROCK1 i ROCK2 (Tabela P.3.2.).

Jedinjenje **C-38**, koje je i u prethodnim analizama molekuskog dokinga pokazalo izuzetne rezultate, je dodatno potvrdilo svoj potencijal kroz konzistentno niske MM-GBSA vrijednosti, što ga čini jednim od najperspektivnijih višestrukih inhibitora u okviru ove serije.

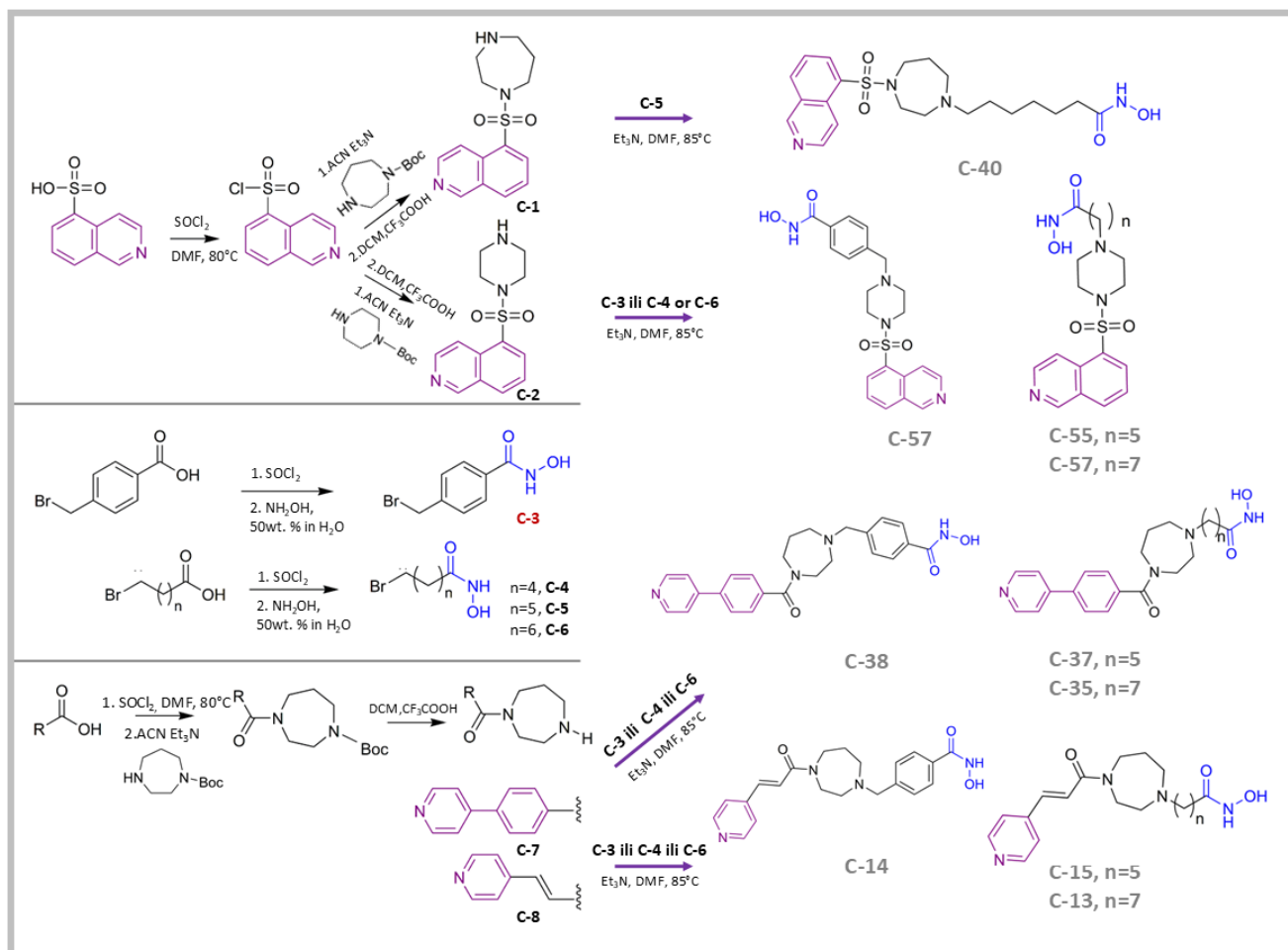
Pored toga, jedinjenja **C-35**, **C-37** i **C-55** su pokazala povoljnije MM-GBSA vrijednosti za HDAC6 u poređenju sa **C-9**, ukazujući na njihov potencijalno poboljšani afinitet prema ovoj izoformi histon deacetilaze. U odnosu na ROCK1, jedinjenja **C-13**, **C-37**, **C-40** i **C-57** su pokazala niže slobodne energije vezivanja, što ukazuje na povoljniju prostornu i elektrostatičku komplementarnost u interakcijama sa ovom izoformom serin/treonin kinaze. Finalno, u kontekstu ROCK2 inhibicije, jedinjenja **C-35** i **C-57** su pokazala povoljnije MM-GBSA vrednosti u poređenju sa **C-9**, što opravdava njihovo uključivanje u dalju eksperimentalnu validaciju.

Ova zapažanja kolektivno ukazuju na to da pojedina dizajnirana jedinjenja ne samo da održavaju *multitarget* aktivnost, već i potencijalno prevazilaze performanse vodećeg jedinjenja u pogledu stabilnosti kompleksa i afiniteta prema svim ključnim enzimima.

Na osnovu integrisane analize rezultata molekuskog dokinga, proračuna slobodne energije vezivanja putem MM-GBSA metode i procjene efikasnosti liganda, svi novodizajnirani molekuli su pokazali potencijal za poboljšani afinitet u poređenju sa vodećim molekulom **C-9**, i to ka ROCK1 i/ili ROCK2 i/ili HDAC6 enzimima, što opravdava njihovu dalju sintezu i detaljnu biološku evaluaciju.

4.11. Sinteza i karakterizacija novodizajniranih HDAC/ROCK inhibitora

Potencijalni HDAC/ROCK inhibitori su sintetisani prema sintetskim putevima prikazanim na **Slici 56**. U prvoj fazi sinteze, derivati sekundarnih amina su dobijeni korišćenjem izohinolin-5-sulfonske kiseline, 4-piridin-4-il-benzojeve kiseline ili 4-piridinakrilne kiseline u kombinaciji sa 1-Boc-homopiperazinom ili 1-Boc-piperazinom. Nakon uklanjanja Boc zaštitne grupe, u narednom koraku su izvedene reakcije nukleofilne supstitucije između derivata bromohidroksamske kiseline (**C3–C6**) i odgovarajućih sekundarnih amina. Reakcija je izvođena u prisustvu baze Et₃N u DMF-u pri temperaturi od 85°C, a na ovaj način je dobijeno deset potencijalnih HDAC/ROCK inhibitora u umjerenom prinosu (35–40%). Finalna jedinjenja su prečišćena primjenom fleš hromatografije (DCM:metanol, 9:1), dok su njihove strukture potvrđene metodama nuklearne magnetne rezonance (NMR) i masene spektrometrije (MS) (**Tabela 11**).

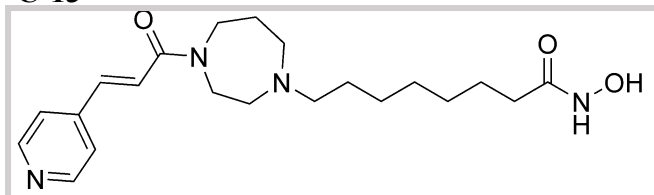


Slika 56. Shematski prikaz puteva za sintezu novodizajniranih HDAC/ROCK inhibitora; n označava broj ugljenikovih atoma u ugljovodoničnom linkeru; ZBG je označena plavom bojom, dok je HBM označen ljubičastom bojom.

Tabela 11. Strukturna karakterizacija novodizajniranih HDAC/ROCK *multitarget* inhibitora

Jedinjenje

C-13

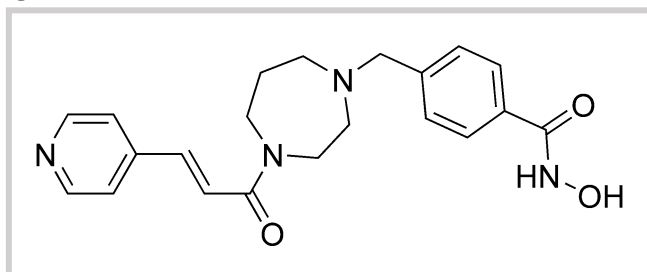


Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; $m = 15$ mg, 29,76 % prinos

Karakterizacija novodizajniranih HDAC/ROCK *multitarget* inhibitora

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,33 (s, 0,8H, rotamer a), 9,80 – 9,64 (m, 0,2H, rotamer b), 8,59–8,58 (m, 3H), 7,68–7,66 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H), 7,42 (s, 2H), 3,72–3,70 (m, 2H), 3,57–3,55 (m, 2H), 2,75–2,73 (m, 0,25H), 2,66 (s, 1,75H), 2,54 (s, 2H), 2,41 (s, 1,75H), 2,34 – 2,28 (m, 0,25H), 1,91 (d, $J = 6,2$ Hz, 2H), 1,77 (s, 2H), 1,41 (d, $J = 22,2$ Hz, 4H), 1,22 (s, 6H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169,6, 165,2, 165,1, 150,6, 142,8, 138,9, 138,8, 124,0, 122,5, 57,3, 57,0, 56,6, 54,8, 54,3, 54,1, 49,0, 47,5, 46,6,

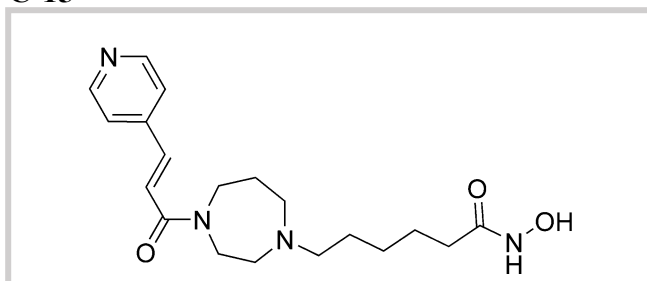
C-14

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m= 17,5 mg, 35,5 % prinos

45,8, 45,1, 32,7, 29,1, 29,0, 28,6, 27,2, 27,1, 26,9, 25,5.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11,15 (bs, 1H), 8,98 (bs, 1H), 8,59 (s, 2H), 7,70-7,66 (m, 4H), 7,43-7,36 (m, 4H), 3,77-3,74 (m, 2H), 3,65 (d, *J* = 3,5 Hz, 2H), 3,61-3,58 (m, 2H), 2,66-2,64 (m, 4H), 1,82-1,76 (m, 2H).

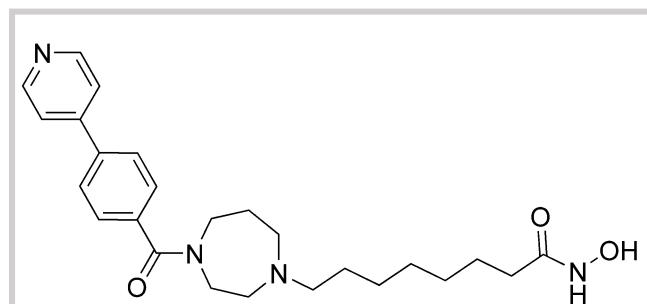
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 164,7, 163,0, 150,1, 150,1, 144,3, 141,3, 139,7, 132,0, 129,1, 129,1, 127,0, 127,0, 126,4, 120,7, 120,7, 59,4, 52,4, 50,6, 46,9, 44,9, 28,6.

C-15

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m=12,5 mg, 26,73 % prinos

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,32 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,59 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 7,67 (d, *J* = 5,7 Hz, 2H), 7,42 (s, 2H), 3,70 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,55 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,63 (s, 2H), 2,53 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,38 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,91 (dd, *J* = 12,5, 7,1 Hz, 2H), 1,76 (s, 2H), 1,46 (d, *J* = 5,9 Hz, 2H), 1,37 (s, 2H), 1,21 (d, *J* = 9,5 Hz, 2H).

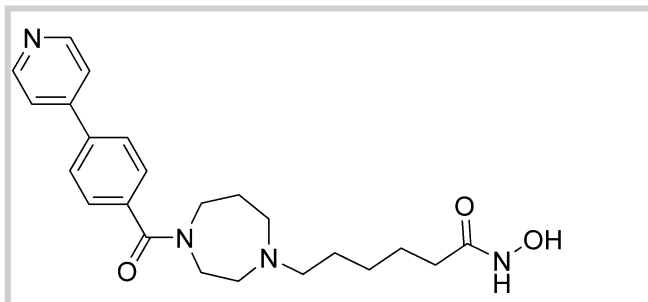
¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169,5, 165,2, 165,1, 150,6, 142,8, 138,9, 138,8, 124,0, 122,5, 57,2, 56,9, 56,7, 54,9, 54,3, 54,2, 47,8, 46,6, 46,0, 45,1, 32,7, 28,8, 27,2, 27,1, 26,8, 25,5.

C-35

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m=16 mg, 36,66 % prinos

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8,52 (s, 2H), 7,78 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,67 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H), 7,54 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 3,95 – 3,31 (m, 5H), 3,17 – 2,57 (m, 5H), 2,12 – 1,81 (m, 4H), 1,60-1,42 (m, 4H), 1,36 – 1,11 (m, 6H).

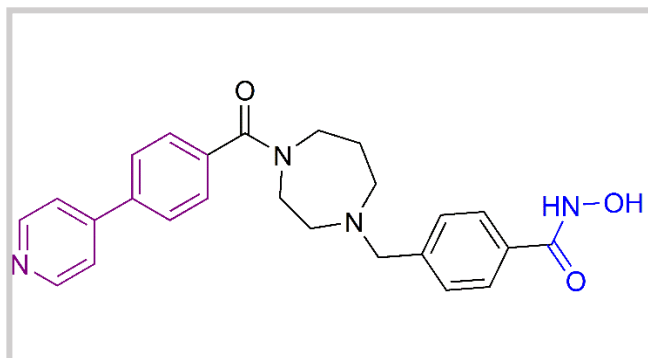
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 171,8, 149,4, 148,2, 139,1, 136,6, 127,6, 127,5, 127,1, 127,0, 121,8, 61,5, 57,5, 57,3, 55,2, 55,0, 53,9, 53,3, 44,5, 42,5, 32,2, 32,2, 29,3, 28,8, 28,7, 28,4, 26,5, 26,4, 25,8, 25,4, 25,2, 25,0.

C-37

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m=11,8 mg, 27,89 % prinos

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8,52 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 7,77 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,66 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 7,50-7,47 (m, 2H), 3,68 (dd, J = 11,3, 5,8 Hz, 2H), 3,46 – 3,40 (m, 2H), 2,81 – 2,74 (m, 1,5H), 2,61 (dd, J = 17,0, 11,4 Hz, 2H), 2,48 – 2,36 (m, 1,5H), 2,03 – 1,89 (m, 3H), 1,73 (s, 1H), 1,57 – 1,38 (m, 4H), 1,30 – 1,17 (m, 3H).

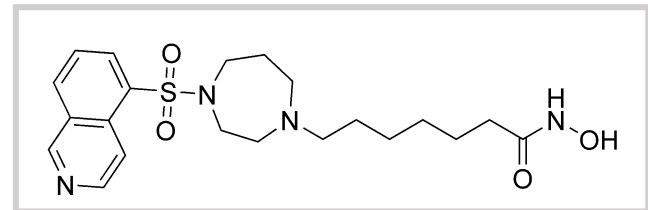
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 171,8, 171,7, 149,4, 148,3, 138,7, 137,3, 127,4, 127,2, 127,0, 121,8, 61,3, 57,4, 57,1, 55,4, 55,3, 53,9, 53,8, 49,2, 45,2, 44,8, 31,9, 29,3, 27,8, 26,6, 26,6, 26,3, 26,2, 25,3, 25,0.

C-38

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m=17,8 mg, 42,13 % prinos

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8,61 (d, J = 4,6 Hz, 2H), 7,85 (dd, J = 10,9, 8,3 Hz, 2H), 7,75 (s, 3H), 7,69 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,56 (t, J = 8,7 Hz, 2H), 7,46 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 3,78 (d, J = 4,9 Hz, 2H), 3,71 (d, J = 20,8 Hz, 2H), 3,52 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 2,83 (s, 1H), 2,74 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 2,66 (s, 2H), 1,96 (s, 1H), 1,81 (s, 1H).

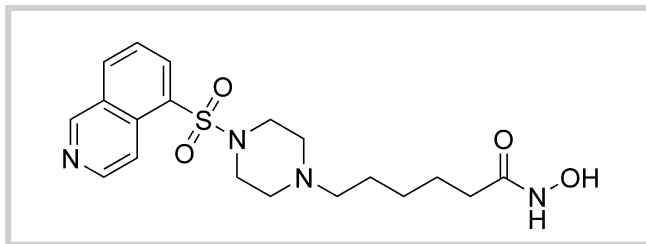
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 171,8, 171,7, 149,4, 148,2, 142,4, 138,7, 137,3, 131,4, 128,8, 128,7, 127,4, 127,2, 127,0, 126,7, 121,8, 61,4, 61,3, 55,4, 55,3, 54,0, 53,7, 49,6, 45,7, 45,1, 28,3, 26,6.

C-40

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m=16,5 mg, 39,51 % prinos

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10,35 (s, 1H), 9,49 (s, 1H), 8,69 (d, J = 6,1 Hz, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,46 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 8,39 – 8,25 (m, 2H), 7,84 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 3,70 – 3,41 (m, 4H), 3,15 (d, J = 4,2 Hz, 2H), 2,74 (s, 2H), 2,34 – 2,13 (m, 2H), 1,93-1,82 (m, 5H), 1,65 – 1,04 (m, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 169,6, 154,0, 145,4, 134,2, 134,0, 133,0, 131,1, 129,3, 127,0,

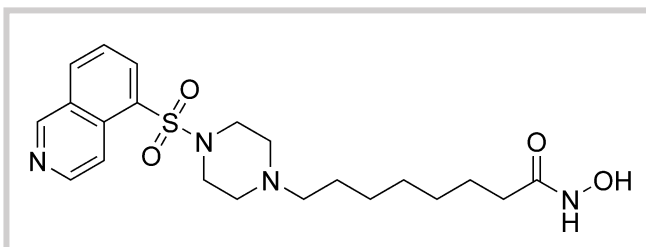
C-55

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m=13,5 mg, 36,84 % prinos

117,5, 117,1, 116,3, 57,0, 55,4, 54,1, 49,0, 46,7, 32,6, 28,8, 26,7, 25,4.

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9,41 (s, 1H), 8,63 (s, 2H), 8,46 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,87 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 3,55 (t, J = 6,5 Hz, 1,5H), 3,25 – 3,09 (m, 4H), 2,99 – 2,79 (m, 2H), 2,48 (s, 2H), 2,33 – 2,28 (m, 0,5H), 2,07 (dt, J = 23,1, 7,4 Hz, 2H), 1,69 – 1,51 (m, 4H), 1,41 (dd, J = 15,2, 7,1 Hz, 2H).

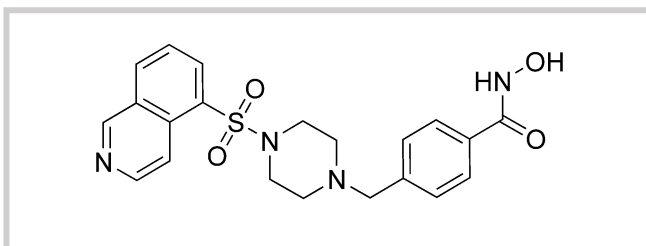
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 171,5, 153,0, 143,6, 143,6, 134,8, 134,8, 134,2, 132,0, 131,8, 129,31, 126,4, 118,1, 118,1, 61,3, 57,5, 52,0, 45,5, 45,2, 44,4, 32,3, 32,2, 31,8, 26,4, 25,6, 25,2, 25,0.

C-56

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m=17,3 mg, 44,16 % prinos

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9,30 (s, 1H), 8,52 (s, 2H), 8,35 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,77 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 3,43 (t, J = 6,6 Hz, 3,2H), 3,08 (bs, 4H), 2,77 (d, J = 7,6 Hz, 0,8H), 2,43 (d, J = 5,1 Hz, 0,5H), 2,24 – 2,19 (m, 1,5H), 1,97 (dd, J = 15,0, 7,4 Hz, 4H), 1,58 – 1,41 (m, 8H).

¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 171,6, 171,5, 153,0, 143,6, 134,8, 134,2, 132,0, 131,8, 129,3, 126,4, 118,1, 61,5, 57,7, 52,0, 45,1, 32,3, 32,3, 32,2, 28,8, 28,7, 28,6, 26,8, 25,8, 25,4, 25,3, 25,2.

C-57

Bijela, amorfna supstanca sintetisana prema opštoj proceduri E; m=14.5 mg, 37.71 % prinos

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9,29 (s, 1H), 8,50 (s, 2H), 8,33 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,75 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 8,2 Hz, 1,6H), 7,35 (d, J = 8,1 Hz, 0,4H), 7,22 (d, J = 8,2 Hz, 1,8H), 7,16 (s, 0,2H), 3,51 (s, 0,2H), 3,42 (s, 1,8H), 3,08 (s, 4H), 2,43 – 2,32 (m, 4H).

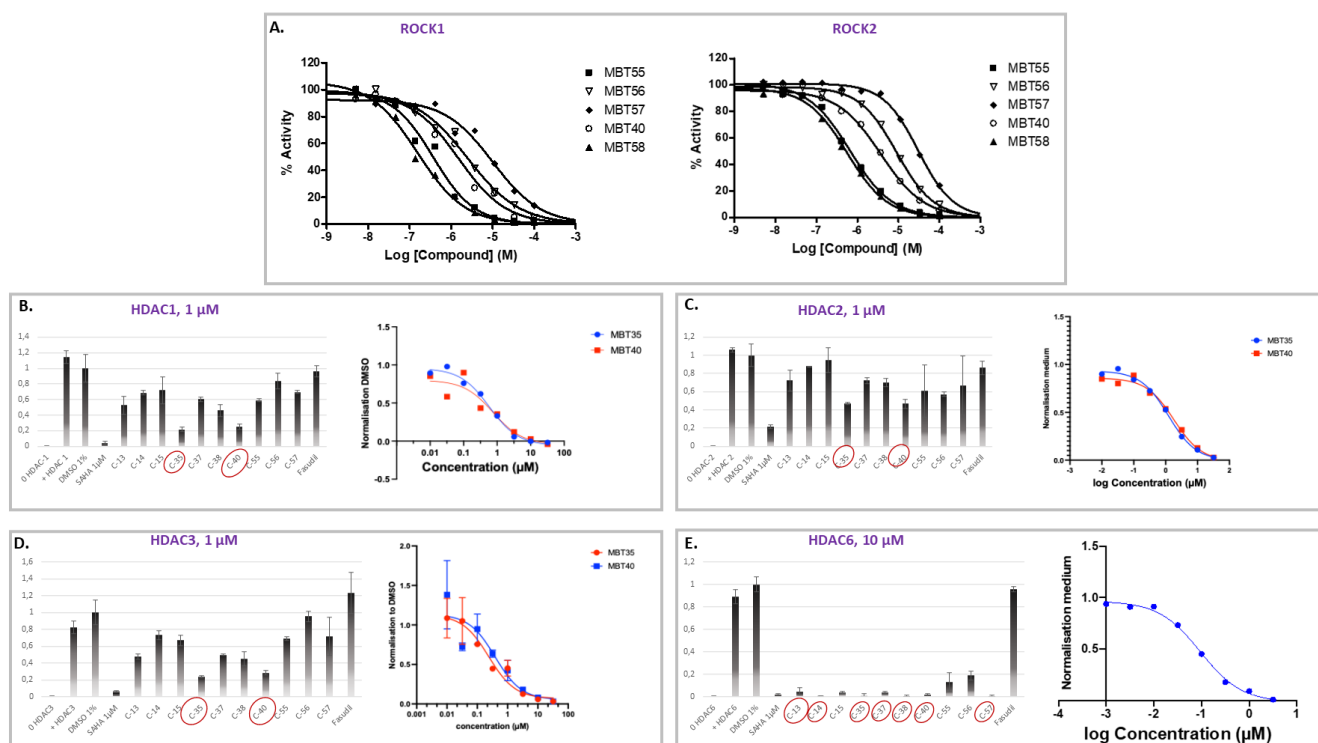
¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 166,5, 153,0, 143,6, 141,3, 134,7, 134,2, 132,0, 131,9, 131,1, 129,3, 128,9, 126,7, 126,3, 118,1, 61,4, 51,8, 45,4.

4.12. Rezultati *in vitro* enzimske evaluacije novodizajniranih HDAC/ROCK inhibitora

Svi sintetisani HDAC/ROCK inhibitori su podvrgnuti inicijalnom skriningu na ROCK2 enzim pri koncentraciji od 10 μM . Jedinjenja koja su pokazala inhibitornu aktivnost veću od 30% su dalje evaluirana i na ROCK1 pri istoj koncentraciji. Za najaktivnije inhibitore na obje izoforme su dalje određene njihove IC_{50} vrijednosti (**Tabela 12**). Doza-odgovor IC_{50} krive su prikazane na **Slici 57-A**.

Tabela 12. Rezultati enzimske evaluacije na ROCK1 i ROCK2 enzimima

	% of ROCK inhibicije (10 μM)		IC_{50} (μM)	
	ROCK1	ROCK2	ROCK1	ROCK2
C-13	/	-3,74		
C-14	/	2,32		
C-15	/	7,03		
C-35	/	9,12		
C-37	/	13,71		
C-38	32,60	21,32	35,90	46,70
C-40	78,48	73,57	1,51	3,70
C-55	93,26	92,06	0,37	0,65
C-56	68,94	57,26	2,47	8,99
C-57	41,16	24,28	10,05	30,40



Slika 57. **A.** Prikaz dijagrama odnosa doze i ROCK1 ili ROCK2 inhibicije najaktivnijih jedinjenja; **B.** Prikaz rezultata skrininga na HDAC1 i dijagrama odnosa doze i HDAC1 inhibicije najaktivnijih jedinjenja; **C.** Prikaz rezultata skrininga na HDAC2 i dijagrama odnosa doze i HDAC2 inhibicije najaktivnijih jedinjenja; **D.** Prikaz rezultata skrininga na HDAC3 i dijagrama odnosa doze i HDAC3 inhibicije najaktivnijih jedinjenja; **E.** Prikaz rezultata skrininga na HDAC6 i dijagrama odnosa doze i HDAC6 inhibicije najaktivnijih jedinjenja. *Normalisation medium/DMSO* – normalizacija u odnosu na medijum/DMSO, *activity* – aktivnost, *compound* – jedinjenje, *concentration* – koncentracija.

U pogledu HDAC aktivnosti, svi sintetisani inhibitori su najprije testirani pri koncentraciji od 10 μ M korišćenjem nuklearnog ekstrakta (**Prilog 4**) i HDAC6 izoforme (**Slika 57-E**). Na osnovu zapažene inhibitorne aktivnosti na nuklearnom ekstraktu (**Prilog 4**), dalja ispitivanja su obuhvatila skrining svih jedinjenja na enzimima HDAC1, HDAC2 i HDAC3 pri koncentraciji od 1 μ M (**Slika 57-B, 57-C, 57-D**). Za jedinjenja koja su pokazala procenat inhibicije veći od 50% na bilo kojoj od ispitivanih HDAC izoformi su dalje eksperimentalno određene IC₅₀ vrijednosti koje su prikazane u **Tabeli 13** i na **Slikama 57-B, 57-C, 57-D, 57-E**.

Tabela 13. Rezultati enzimske evaluacije novodizajniranih HDAC/ROCK inhibitora na HDAC

	% of HDAC inhibicije					IC ₅₀ (μ M)			
	HDAC1 (1 μ M)	HDAC2 (1 μ M)	HDAC3 (1 μ M)	HDAC6 (10 μ M)	NE (10 μ M)	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC6
C-13	47	28	52	55	91	/	/	/	0,399
C-14	31	12	27	77	85	/	/	/	0,242
C-15	28	5	33	45	90	/	/	/	/
C-35	79	53	77	70	89	0,590	1,225	0,2389	0,304
C-37	40	28	50	49	89	/	/	/	/
C-38	54	30	55	92	98	/	/	/	0,095
C-40	75	53	72	90	99	0,752	1,804	0,3889	0,242
C-55	40	39	31	87	66	3,715	/	/	0,294
C-56	16	43	4	81	42	/	/	/	0,905
C-57	30	33	29	95	74	3,099	/	/	0,092

Jedinjenje **C-55** je pokazalo najizraženiju inhibiciju ROCK kinaza, sa IC₅₀ vrijednostima od 370 nM za ROCK1 i 650 nM za ROCK2. Međutim, njegova aktivnost prema HDAC6 je bila niža (IC₅₀= 294 nM), dok je pri koncentraciji od 1 μ M inhibicija ostalih HDAC izoformi bila ispod 50%. Najpotentniji HDAC inhibitori identifikovani u enzimskim testovima su bili **C-38** i **C-57** sa IC₅₀ vrijednostima od 94,71 nM i 92,49 nM. Ova jedinjenja su pokazala visoku selektivnost prema citoplazmatskoj izoformi HDAC6, dok je njihova aktivnost prema nuklearnim izoformama HDAC1, HDAC2 i HDAC3 bila ograničena, pri čemu su procenti inhibicije ovih izoformi bili oko 50% ili manji od 50% pri koncentraciji od 1 μ M (**Tabela 13**). Dodatno, jedinjenja **C-38** i **C-57** su pokazala nisku aktivnost na ROCK kinazama pri koncentraciji od 10 μ M (**Tabela 12**). Jedinjenja **C-35** i **C-40** su ispoljila uravnoteženu inhibiciju citoplazmatskih i nuklearnih HDAC izoformi (**Tabela 13**). Među njima, **C-35** je pokazalo minimalnu inhibiciju ROCK enzima pri koncentraciji od 10 μ M, dok je **C-40** ispoljilo izraženiju inhibitornu aktivnost na ROCK1 i ROCK2 u poređenju sa **C-35**, sa IC₅₀ vrijednostima od 1,51 μ M i 3,70 μ M.

U skladu sa rezultatima enzimskih testova, za dalju ćelijsku evaluaciju su izabrana jedinjenja **C-35**, **C-38**, **C-40**, **C-55** i **C-57**.

4.13. Rezultati *in vitro* ćelijske evaluacije novodizajniranih HDAC/ROCK inhibitora

4.13.1. Ispitivanje citotoksičnosti novodizajniranih jedinjenja

U okviru ove studije, ispitani su citotoksični i antiproliferativni efekti pri 72-časovnoj izloženosti novodizajniranim i sintetisanim HDAC/ROCK inhibitorima (**C-14**, **C-35**, **C-38**, **C-40**, **C-55** i **C-57**) na TNBC ćelijskim linijama MDA-MB-231 i MDA-MB-468 (**Tabela 14** i **Slika 58**).

Za potrebe *in vitro* testiranja su korišćeni standardni referentni inhibitori: tubastatin A, selektivni HDAC6 inhibitor, i fasudil, klinički odobreni inhibitor ROCK kinaza, koji su služili kao pozitivne kontrole. Efikasnost novosintetisanih inhibitora je poređena sa efektima vodećeg jedinjenja **C-9**, koje je prethodno, u početnoj fazi ove doktorske disertacije, identifikovano kao potentan HDAC/ROCK *multitarget* inhibitor [304].

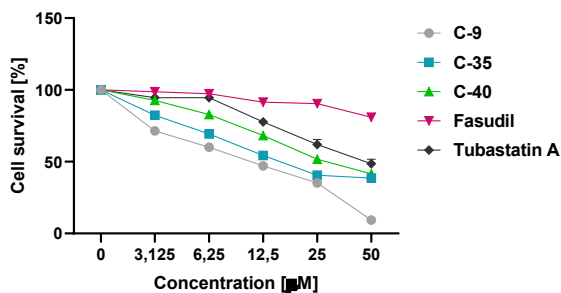
Table 14. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti na MDA-MB-231 i MDA-MB-468 tumorskim ćelijskim linijama i određivanje indeksa selektivnosti.

Jedinjenje	IC ₅₀ (μM)				
	MDA-MB-231	MDA-MB-468	MRC-5	Si ₁ *	Si ₂ *
C-9 (<i>lead</i>)	Poglavlje 4.9.1. **	39,54±2,65	52,55±3,41	Poglavlje 4.9.1. **	1,33
C-14	> 50	> 50	> 50	n.d.	n.d.
C-35	16,86±1,22	35,55±3,01	58,33±3,17	3,46	1,64
C-38	> 50	> 50	> 50	n.d.	n.d.
C-40	27,00±2,11	36,94±2,87	60,94±3,65	2,26	1,65
C-55	> 50	> 50	> 50	n.d.	n.d.
C-57	> 50	> 50	> 50	n.d.	n.d.
Fasudil	> 50 zinc	> 50	95,02±4,22	n.d.	n.d.
Tubastatin A	45,07±4,23	> 50	94,22±3,11	2,09	n.d.

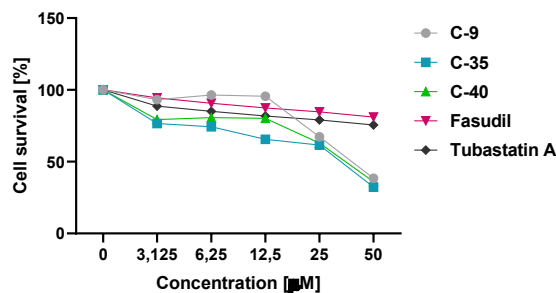
*Indeks selektivnosti (Si) je određen kao odnos između IC₅₀ vrijednosti na normalnoj (MRC-5) i tumorskim ćelijskim linijama: Si₁ = IC₅₀ (MRC-5) / IC₅₀ (MDA-MB-231); Si₂ = IC₅₀ (MRC-5) / IC₅₀ (MDA-MB-468); n.d. = nije određeno. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) iz tri nezavisna eksperimenta. **IC₅₀ za C-9 na MDA-MB-231 ćelijama je prethodno određena u Poglavlju 4.9.1.

Među analiziranim jedinjenjima, samo su **C-35** i **C-40** pokazali umjeren citotoksični efekat na obje ispitivane TNBC ćelijske linije. **C-35** je ispoljilo citotoksičnost prema MDA-MB-231 ćelijama (IC₅₀ = 17 μM) uporedivu sa IC₅₀ vrijednošću za vodeće jedinjenje **C-9**, dok su sva tri jedinjenja (**C-9**, **C-35** i **C-40**) pokazala slične nivoe citotoksičnosti na MDA-MB-468 (IC₅₀ ~ 35 μM). Pozitivne kontrole, fasudil i tubastatin A, nisu pokazali značajnu citotoksičnost prema TNBC ćelijama u analiziranim uslovima (**Tabela 14**), što ističe potencijal testiranih višestrukih inhibitora.

(A)



(B)



Slika 58. Krive zavisnosti doze i citotoksičnog odgovora dobijene MTT testom nakon 72-časovne izloženosti MDA-MB-231 (A) i MDA-MB-468 (B) ćelija različitim koncentracijama novosintetisanih *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora (C-35 i C-40), kao i vodećeg jedinjenja C-9 i referentnih inhibitora fasudila i tubastatina A. % of cell survival – procenat preživljavanja ćelija, concentration – koncentracija.

Radi procjene selektivnosti, ispitana je citotoksičnost jedinjenja i na humanoj ćelijskoj liniji porijeklom iz fibroblasta pluća, **MRC-5**. Na osnovu dobijenih IC_{50} vrijednosti izračunat je indeks selektivnosti (Si) kao odnos između IC_{50} vrijednosti za normalne ćelije i IC_{50} vrijednosti za tumorske ćelije. Rezultati su pokazali da su **C-9** i **C-35** pokazali zadovoljavajući stepen selektivnosti prema MDA-MB-231 ćelijama. Obje supstance su pokazale slabiju selektivnost prema MDA-MB-468 ćelijskoj liniji ($Si = 1,33$ i $1,65$). Tubastatin A je pokazao ograničenu selektivnost prema MDA-MB-231 ćelijama ($Si = 2,09$) i odsustvo selektivnosti prema MDA-MB-468 ćelijama ($Si < 1$) (**Tabela 14**). Ovi rezultati ukazuju da pojedina jedinjenja, naročito **C-35**, imaju povoljan profil selektivnosti, što predstavlja važan preduslov za njihova dalja farmakološka testiranja.

Dodatne analize, uključujući procjenu uticaja novosintetisanih inhibitora na progresiju ćelijskog ciklusa i indukciju apoptoze, su dalje sprovedene kako bi se razjasnili molekularni mehanizmi koji stoje u osnovi smanjenog preživljavanja TNBC ćelija nakon tretmana novosintetisanim *multitarget* HDAC/ROCK inhibitorima.

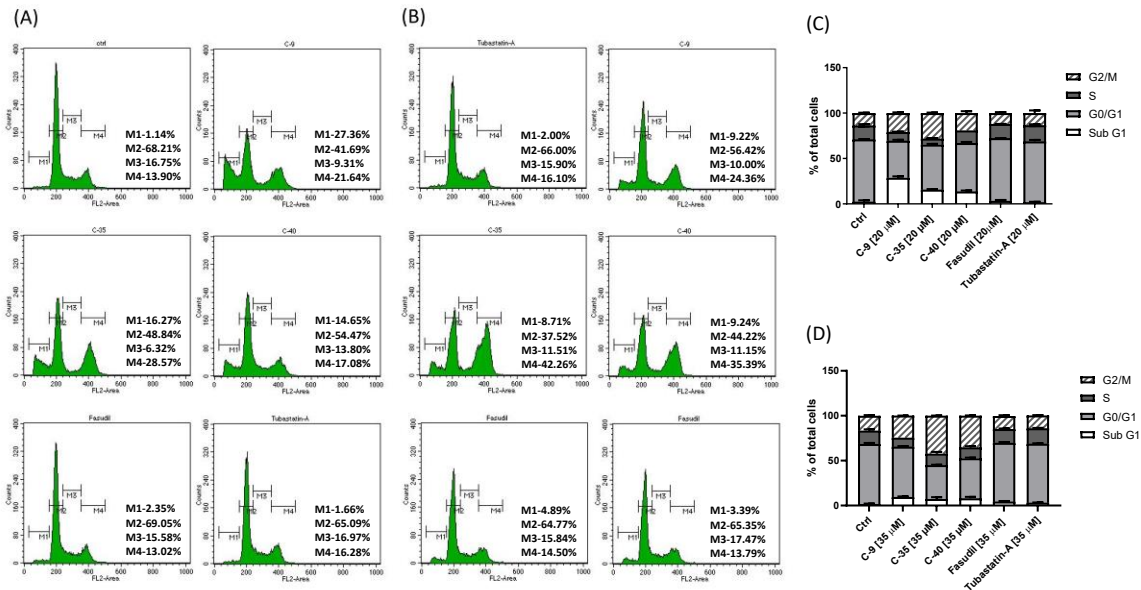
4.13.2. Novosintetisani HDAC/ROCK *multitarget* inhibitori dovode do promjena u ćelijskom ciklusu TNBC ćelijskih linija

U cilju procjene antiproliferativnog potencijala **C-35** i **C-40**, analizirane su promjene u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon 48-časovne izloženosti TNBC ćelija ekvimolarnim koncentracijama sintetisanih inhibitora (20 μ M za MDA-MB-231 i 35 μ M za MDA-MB-468). **C-9**, referentni inhibitori fasudil (ROCK) i tubastatin A (HDAC6) su korišćeni kao pozitivne kontrole (**Slika 59**).

Tretman jedinjenjem **C-9** je doveo do značajnog povećanja procenta MDA-MB-231 ćelija u sub-G1 fazi, uz blago povećanje u G2/M fazi (**Slike 59-A** i **59-C**), što je bilo praćeno smanjenjem broja ćelija u G0/G1 i S fazi u poređenju sa kontrolom. Slično tome, tretman jedinjenjima **C-35** i **C-40** je izazvao umjereno povećanje procenta ćelija u sub-G1 i G2/M fazama u odnosu na netretiranu kontrolu (**Slike 59-A** i **59-C**). Kod ćelijske linije MDA-MB-468, tretman jedinjenjima **C-9**, **C-35** i **C-40** je doveo do izraženog povećanja broja ćelija u G2/M fazi, uz istovremeno smanjenje u G0/G1 fazi (**Slike 59-B** i **59-D**).

Nasuprot tome, tretman fasudilom i tubastatinom A nije izazvao značajne promjene u raspodjeli ćelija po fazama ćelijskog ciklusa kod ispitivanih TNBC ćelijskih linija (**Slika 59**).

Ovi rezultati ukazuju da jedinjenja **C-9**, **C-35** i **C-40** mogu doprinijeti indukciji ćelijske smrti, vjerovatno putem ometanja regulacije ćelijskog ciklusa, što predstavlja potencijalni mehanizam njihovog antiproliferativnog djelovanja.

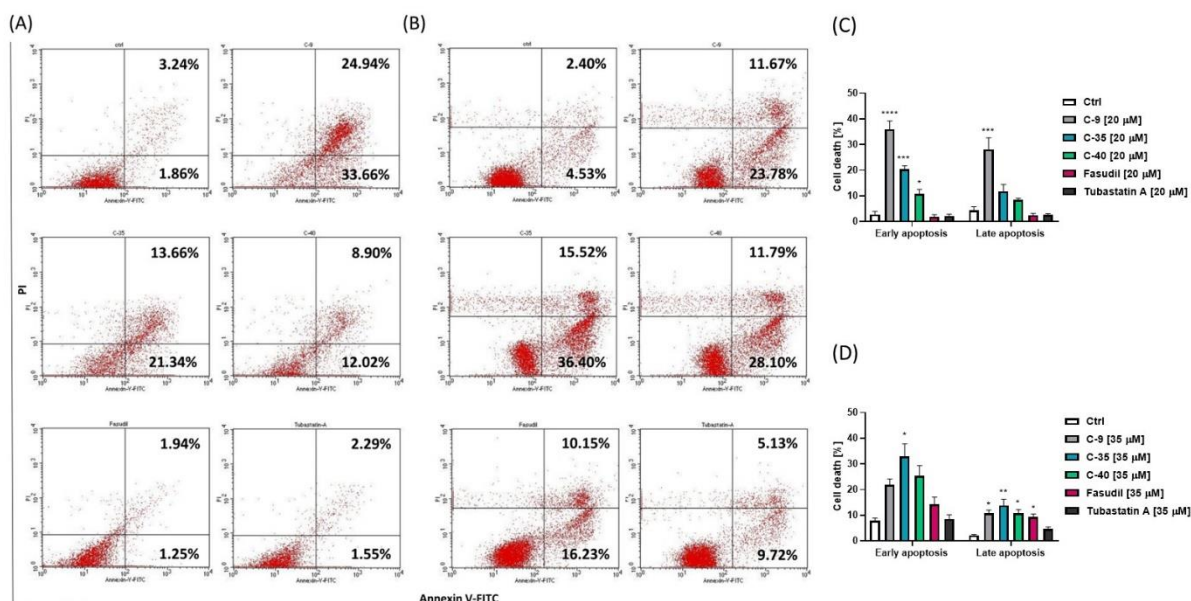


Slika 59. Promene u raspodjeli ćelija po fazama ćelijskog ciklusa ćelijskih linija MDA-MB-231 (**A** i **C**) i MDA-MB-468 (**B** i **D**) nakon 48-časovne izloženosti ekvimolarnim koncentracijama ispitivanih jedinjenja (20 μM za MDA-MB-231 i 35 μM za MDA-MB-468). Prikazani su reprezentativni histogrami iz tri nezavisna eksperimenta nakon 48h tretmana TNBC ćelija (**A**, **B**). M1 – apoptozne ćelije sa sadržajem DNK koji odgovara sub-G1 frakciji; M2 – ćelije u fazama G0/G1; M3 – ćelije u S fazi; M4 – ćelije u G2/M fazi. Stubičasti grafik prikazuje rezultate izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD) iz tri nezavisna eksperimenta. Statistička analiza razlika između tretiranih grupa i kontrole je izvedena metodom jednofaktorske analize varijanse (*one-way ANOVA*), pri čemu su razlike smatrane statistički značajnim za vrijednosti: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

4.13.3. Novosintetisani HDAC/ROCK inhibitori indukuju apoptozu TNBC ćelijskih linija

Pro-apoptotski potencijal **C-35** i **C-40**, kao i pozitivnih kontrola –**C-9**, fasudila i tubastatina A je ispitan na TNBC ćelijskim linijama (MDA-MB-231 i MDA-MB-468) nakon 48-časovne inkubacije sa ekvimolarnim koncentracijama inhibitora (20 μM za MDA-MB-231 i 35 μM za MDA-MB-468). **C-35** je značajno indukovao ranu apoptozu u obje ćelijske linije, dok je **C-40** izazvao blago povećanje kasne apoptoze isključivo u MDA-MB-468 ćelijama (**Slike 60-B** i **60-D**). Od pozitivnih kontrola, fasudil je izazvao blago povećanje kasne apoptoze samo u MDA-MB-468 ćelijama, dok tubastatin A nije pokazao značajan efekat na indukciju apoptoze u bilo kojoj od ispitivanih ćelijskih linija (**Slika 60**). Vodeće jedinjenje **C-9** je izazvalo značajno povećanje procenta ćelija u ranoj i kasnoj fazi apoptoze u MDA-MB-

231 (Slike 60-A i 60-C), kao i povećanje rane apoptoze u MDA-MB-468 ćelijama (oko 20%; Slike 60-B i 60-D).



Slika 60. Efekat 48-časovne izloženosti novosintetisanim inhibitorima **C-35** i **C-40**, vodećem jedinjenju C-9, tubastatinu A i fasudilu na procenat ćelija u ranoj i kasnoj fazi apoptoze u TNBC linijama: MDA-MB-231 (A i C) i MDA-MB-468 (B i D). Dijagrami tačaka (A, B) prikazuju reprezentativne rezultate dobijene protočnom citometrijom nakon bojenja ćelija Annexin V-FITC i propidijum-jodidom (PI), dok su histogrami (C, D) prikaz ukupnih rezultata izraženih kao srednja vrijednost $\pm$ standardna greška sredine (SEM) na osnovu tri nezavisna eksperimenta. Rana apoptoza definisana je kao procenat Annexin V⁺/PI⁻ ćelija, dok je kasna apoptoza određena kao procenat Annexin V⁺/PI⁺ ćelija. Statistička analiza razlika između tretiranih grupa i kontrolne grupe bez tretmana je izvršena korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (*one-way ANOVA*), pri čemu su razlike smatrane statistički značajnim za * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ i **** $p \leq 0,0001$.

4.13.4. Uticaj HDAC/ROCK inhibitora na ekspresiju antigena značajnih za imunski odgovor

Mikrookruženje tumora (*tumor microenvironment*, TME) obuhvata različite imune ćelije koje infiltriraju tumor, uključujući T i B limfocite, prirodne ćelije ubice (NK) i dendritske ćelije koje učestvuju u antitumorskom imunskom odgovoru, kao i imunosupresivne subpopulacije poput mijeloidnih supresorskih ćelija (MDSC) i makrofaga povezanih sa tumorom (TAM) [305]. Između tumorskih ćelija i komponenti TME-a postoji dinamična i recipročna interakcija. Imune ćelije putem lučenja citokina, hemokina, enzima i metabolita doprinose hroničnoj inflamaciji, koja je prepoznata kao važan pokretač progresije tumora. Pored toga, fizičke interakcije između receptora na imunskim ćelijama i liganda na tumorskim ćelijama predstavljaju ključni mehanizam u regulaciji antitumorskog imunskog odgovora [306,307].

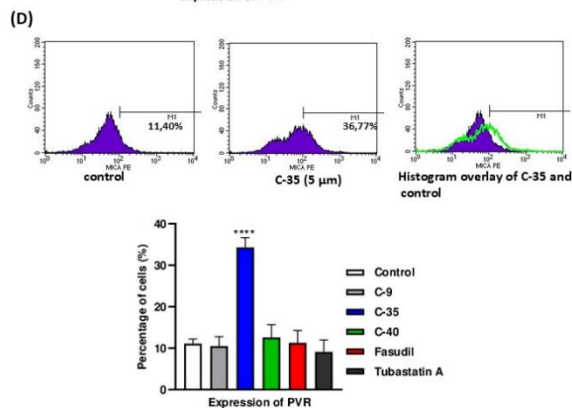
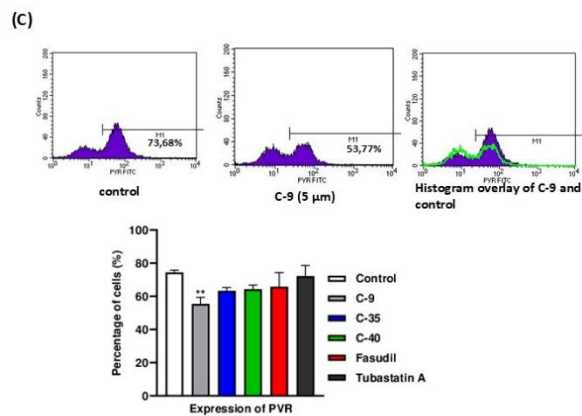
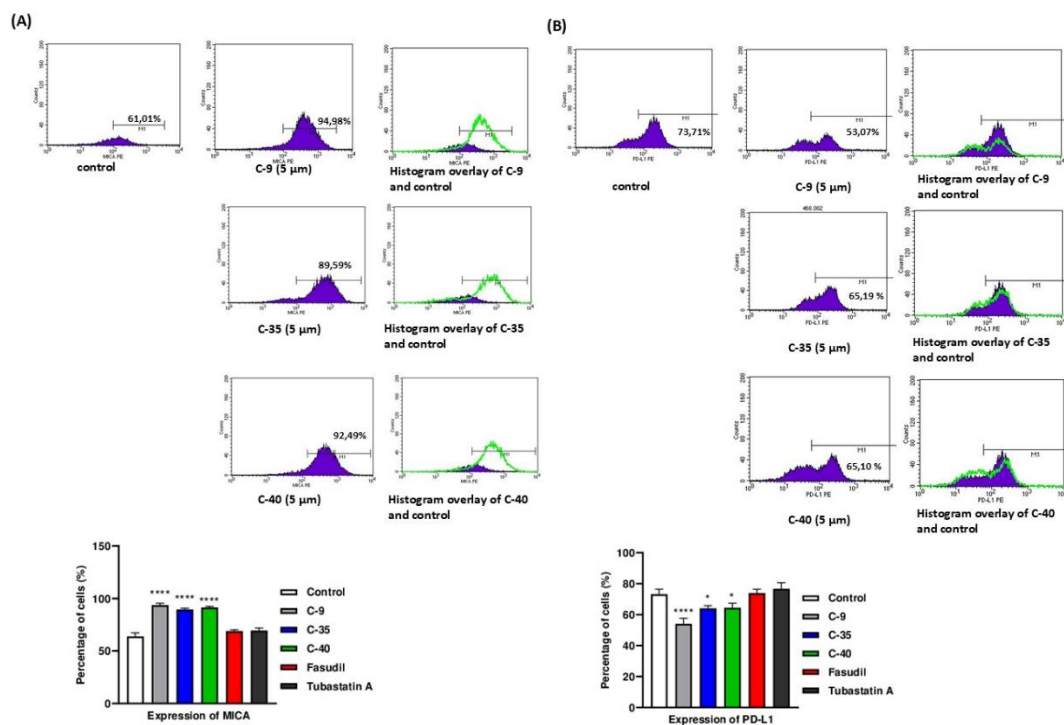
Jedna od najupečatljivijih histoloških karakteristika TNBC jeste visoka zastupljenost tumorskih infiltrirajućih limfocita (TIL), pretežno T i B limfocita u stromi, kao i izražena ekspresija gena uključenih u imunske odgovore, uključujući i gene za receptore imunskih kontrolnih tačaka (*immune checkpoint*,

IC), čija je ekspresija često povišena kao rezultat imunološke stimulacije [308]. Imajući u vidu specifičnosti TME-a u TNBC-u, u okviru ove studije je ispitivan uticaj *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora na ekspresiju ključnih liganada uključenih u interakcije između tumorskih i imunskih ćelija u MDA-MB-231 i MDA-MB-468. Ovi ligandi imaju važnu ulogu u modulaciji imunološki posredovane eliminacije tumorskih ćelija putem aktivacije imunskog sistema. Radi procjene imunogenosti tretiranih TNBC ćelija, analizirana je površinska ekspresija antigena HLA-A, -B, -C, PD-L1, PVR i MICA.

Molekuli glavnog histokompatibilnog kompleksa klase I (MHC-I), tj. HLA-A, -B i -C, omogućavaju prepoznavanje tumorskih antigena na ćelijskoj površini od strane CD8⁺ T limfocita i njihovu dalju citotoksičnu aktivnost prema tumorskim ćelijama. Međutim, tumorski mehanizmi izbjegavanja imunskog odgovora uključuju smanjenje ekspresije MHC-I molekula i pojačanu ekspresiju liganada koji inhibiraju aktivaciju imunskih ćelija. Jedan od takvih je ligand programirane smrti 1 (PD-L1), koji interaguje sa IC receptorom PD-1 na T i NK ćelijama, inhibirajući njihovu proliferaciju i funkcionalnu aktivnost, čime doprinosi imunosupresiji [309]. Pored toga, PD-L1 učestvuje i u onkogenim procesima gdje dokazano promoviše proliferaciju i invazivnost tumorskih ćelija [310]. Kao odgovor na ove mehanizme izbjegavanja imunskog odgovora, razvijena su brojna monoklonska antitijela čiji je mehanizam djelovanja usmjeren ka PD-1/PD-L1. PVR ligand može imati dualnu ulogu u imunskom odgovoru u zavisnosti od receptora sa kojima stupa u interakciju. Povezivanje sa receptorima CD96 i TIGIT dovodi do imunosupresije, dok interakcija sa CD226 (DNAM-1) receptorom može indukovati citotoksičnost, oslobađanje citokina i imunski odgovor [311]. Oštećenja DNK i nakupljanje oštećenih proteina u ćeliji može indukovati povećanu ekspresiju MHC-I polipeptidu srodnog proteina A (MICA), koji, vezujući se za aktivacioni receptor NKG2D na NK i citotoksičnim T ćelijama, inicira antitumorsku imunsku aktivnost [307,312].

Dobijeni rezultati su pokazali da ćelijske linije MDA-MB-231 i MDA-MB-468 pokazuju visoke nivoe ekspresije HLA-A, -B i -C molekula, čiji nivo nije značajno promijenjen ni nakon jednog od primjenjenih tretmana. MDA-MB-231 ćelije su nakon tretmana jedinjenjima **C-9**, **C-35** i **C-40** pokazale povišenu ekspresiju MICA u poređenju sa kontrolnim tretmanom (**Slika 61-A**), dok promjene u ekspresiji PD-L1 i PVR nisu zabilježene. Nasuprot tome, u liniji MDA-MB-468 je uočen pad ekspresije PD-L1 nakon tretmana sa jedinjenjem **C-9**, dok je isti trend, iako u manjoj meri, zabilježen i nakon tretmana sa jedinjenjima **C-35** i **C-40** (**Slika 61-B**). Tretman **C-9** je, pored toga, rezultirao smanjenjem ekspresije PVR antigena (**Slika 61-C**), dok je **C-35** povećao ekspresiju MICA molekula u MDA-MB-468 ćelijama (**Slika 61-D**). Ovo smanjenje ekspresije PD-L1 i PVR, kao i porast ekspresije MICA, može doprinijeti smanjenju imunosupresivnih signala u tumorskom mikrokruženju i povećanju imunološke prepoznatljivosti tumorskih ćelija.

Uočene razlike u ekspresiji površinskih antigena između ispitivanih TNBC ćelijskih linija se mogu pripisati njihovim fenotipskim i molekulskim karakteristikama. Ćelijsku liniju MDA-MB-468 karakteriše epitelni fenotip sa izraženom ekspresijom keratina 5 i 14, što ukazuje na diferenciraniju epitelnu prirodu. Nasuprot tome, MDA-MB-231 pripada bazalnoj B podvrsti i ispoljava izražen mezenhimski fenotip, koji se ogleda u visokom nivou ekspresije vimentina i povećanoj migracionoj i invazivnoj sposobnosti. Ove fenotipske razlike utiču na signalne puteve, transkripcione profile i imunološki status ćelija, što može doprinijeti različitim odgovorima na tretman testiranim *multitarget* HDAC/ROCK inhibitorima [313].



Slika 61. Histogrami dobijeni protočnom citometrijom nakon 48-časovne inkubacije:

A) MDA-MB-231 ćelije pokazuju povećanu ekspresiju MICA nakon tretmana jedinjenjima C-9, C-35 i C-40 u koncentraciji od 5 μ M, u poređenju sa kontrolnim tretmanom ćelijskim medijumom (CM); prikazano je preklapanje histograma tretiranih i kontrolnih uzoraka;

MDA-MB-468 ćelije pokazuju sljedeće promjene u ekspresiji antigena:

B) Smanjenu ekspresiju PD-L1 nakon tretmana C-9, C-35 i C-40 (5 μ M), u poređenju sa kontrolnim tretmanom; prikazano je preklapanje histograma tretiranih i kontrolnih uzoraka;

C) Smanjenu ekspresiju PVR nakon tretmana jedinjenjem C-35 (5 μ M) u odnosu na kontrolni tretman; prikazano je preklapanje histograma tretiranih i kontrolnih uzoraka;

D) Povećanu ekspresiju MICA nakon tretmana C-9 (5 μ M) u odnosu na kontrolu; prikazano je preklapanje histograma tretiranih i kontrolnih uzoraka.

Stubičasti dijagram prikazuje rezultate izražene kao srednje vrednosti intenziteta fluorescencije (MFI) $\pm$ standardna greška sredine (SEM) iz tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost razlika između tretmana i kontrolnog uzorka procenjena je jednostrukom analizom varijanse (one-way ANOVA), pri čemu su razlike smatrane značajnim za * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,0001$.

4.14. 2D-QSAR modeli zasnovani na mašinskom učenju – efikasna platforma za budući razvoj *multitarget* inhibitora

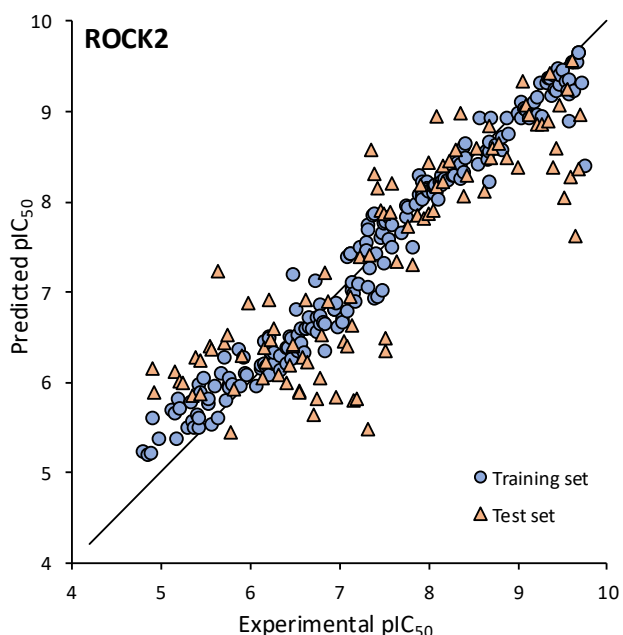
4.14.1. 2D-QSAR (ROCK2) model – parametri interne i eksterne validacije i domen primjenljivosti

Uspostavljena korelacija između ROCK2 inhibitora i njihovih IC₅₀ vrijednosti ukazuje na značajan prediktivni potencijal razvijenog QSAR modela, zasnovanog na *Random Forest* (RF) regresionom algoritmu. Dobijeni model je pokazao visoku internu prediktivnost sa sljedećim parametrima validacije: koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,96, što ukazuje na odličnu korelaciju između predviđenih i eksperimentalnih vrijednosti; OOB greška iznosi 0,72, dok je RMSE 0,07 na uzorku od 206 molekula i uz korišćenje tri najrelevantnija 2D molekulska deskriptora. Ovi rezultati ukazuju na visoku internu konzistentnost modela i njegovu sposobnost da precizno predvidi biološku aktivnost na osnovu strukturnih karakteristika molekula.

Parametri eksterne validacije, koji procjenjuju robusnost i primjenljivost modela na podacima koji nisu korišćeni za njegovo formiranje, dodatno potvrđuju pouzdanost formiranog 2D-QSAR modela. Na nezavisnom test setu jedinjenja ($N = 102$ molekula), model je pokazao sljedeće vrijednosti parametara $R^2_{\text{test}} = 0,73$ i MSE od 0,48. Ovi rezultati potvrđuju da model zadržava zadovoljavajuću prediktivnu moć i van inicijalno korišćenog skupa podataka, što je ključno za njegovu potencijalnu primjenu u dizajnu i virtuelnom skriningu novih *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora.

Model je razvijen na osnovu kvantitativne analize teorijskih dvodimenzionalnih molekulskih deskriptora, koji kvantifikuju osobine poput elektronske distribucije, hidrofobnosti, topologije i strukturne složenosti molekula. Tri 2D deskriptora koja su korišćena u finalnom 2D-QSAR (ROCK2) modelu su identifikovana i selektovana analizom značaja varijabli (*feature importance analysis*).

Korelacija između predviđenih i eksperimentalnih vrijednosti aktivnosti ROCK2 inhibitora je prikazana na **Slici 62**, jasno ilustrujući usklađenost datih vrijednosti.



Slika 61. Scatter plot eksperimentalno određenih u odnosu na predviđene pIC₅₀ vrijednosti dobijene Random Forest regresionim algoritmom za ROCK2 inhibitore.

Analiza raspona molekulskih deskriptora je korišćena za procjenu domena primjenljivosti (*applicability domain*) (**Tabela 15**). Prilikom validacije test seta je uočen samo jedan slučaj u kome je minimalna vrijednost određenog deskriptora izašla iz opsega vrijednosti koji je uspostavlje u setu za obučavanje modela (trening set). Riječ je o molekulskom deskriptoru *LabuteASA* za jedinjenje 143 čija je vrijednost bila ispod donje granične vrijednosti tog deskriptora u okviru trening seta (**Tabela 15**). Ovo jedinjenje pokazuje i najnižu vrijednost za deskriptor *Kappa3*, koja je vrlo bliska minimalnoj vrijednosti istog deskriptora u trening setu.

Jedinjenje 143 predstavlja poznati ROCK2 inhibitor Y-39983, a predikcija modela za njegovu pIC₅₀ vrijednost odstupa za -0.14768 u odnosu na eksperimentalnu. Ovo jedinjenje je dio eksperimentalnog testa ChEMBL3240142 sa izraženom strukturnom razlikom u odnosu na ostale testirane derivate iz iste serije.

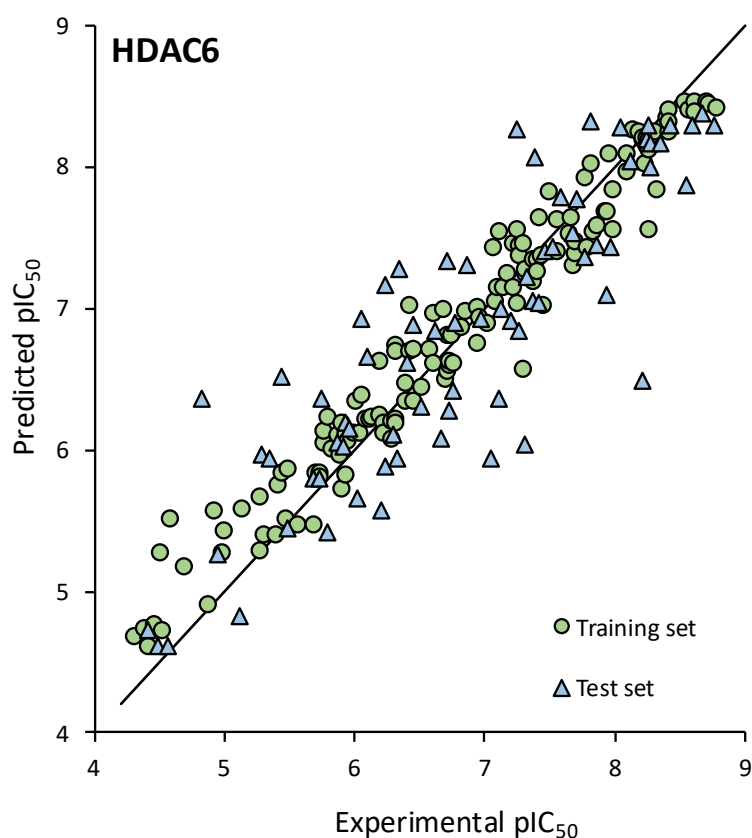
Tabela 15. Analiza raspona molekulskih deskriptora – 2D-QSAR (ROCK2)

Trening set			
	Kappa3	LabuteASA	VSA_EState2
Min	2,53	153,54	-2,79
Max	8,01	327,33	46,60
Test set			
Min	2,64	144,46	-2,62

Max	7,77	307,68	45,71
Set za slijepu validaciju			
Min	2,42	137,66	0,30
Max	6,46	239,99	31,42

4.14.2. 2D-QSAR (HDAC6) model – parametri interne i eksterne validacije i domen primjenljivosti

Korelacija između struktura HDAC6 inhibitora i njihove biološke aktivnosti je potvrdila prediktivnu sposobnost razvijenog *Random Forest* (RF) QSAR modela za HDAC6 enzim (**Slika 62**). RF regresioni algoritam je generisao model sa snažnim internim parametrima validacije ($R^2 = 0,95$; OOB = 0,60; MSE = 0,07; $N = 145$; $n = 4$), što ukazuje na visok stepen usklađenosti između eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti u trening setu. Evaluacija modela korišćenjem test seta ($N = 72$) je dala sljedeće rezultate: $R^2_{\text{test}} = 0,76$ i MSE = 0,30, čime je potvrđena pouzdanost i primjenljivost modela na podacima koji nisu korišćeni pri njegovom formiranju. Prediktivna efikasnost modela je postignuta korišćenjem četiri teorijska dvodimenzionalna molekulska deskriptora, selektovana na osnovu analize značaja varijabli.



Slika 62. Scatter plot eksperimentalno određenih u odnosu na predviđene pIC₅₀ vrijednosti dobijene *Random Forest* regresionim algoritmom za HDAC6 inhibitore.

Analiza domena primjenljivosti modela za HDAC6 inhibitore je sprovedena korišćenjem metode raspona molekulskih deskriptora, čime je procijenjena pouzdanost predikcija modela unutar definisanog hemijskog prostora. Ova analiza je ključna za ocjenu validnosti QSAR modela, jer omogućava identifikaciju molekula za koje model može dati pouzdane predikcije, kao i onih za koje su predikcije manje pouzdane zbog strukturnih razlika u odnosu na trening set.

U okviru validacije test seta kod jedinjenja 11 je došlo do ekstrapolacije vrijednosti deskriptora AvgIpc van opsega vrijednosti datog deskriptora u trening setu (**Tabela 16**). Ova ekstrapolacija ukazuje na to da jedinjenje 11 poseduje strukturne karakteristike koje nisu adekvatno reprezentovane u trening setu, što može uticati na pouzdanost predikcije za ovo jedinjenje.

Važno je napomenuti da definisanje domena primjenljivosti QSAR modela, uključujući identifikaciju molekula koji se nalaze izvan definisanog hemijskog prostora, omogućava istraživačima da procjene pouzdanost predikcija i identifikuju potencijalne *outlier-e*. Pozicija jedinjenja 11 izvan domena primjenljivosti sugerise potrebu za dodatnim eksperimentalnim validacijama ili proširenjem trening seta kako bi se obuhvatile slične strukturne karakteristike, čime bi se poboljšala generalizacija i tačnost QSAR modela.

Tabela 16. Analiza raspona molekulskih deskriptora – 2D-QSAR (HDAC6)

Trening set				
	MinEStateIndex	BCUT2D_MRHI	AvgIpc	VSA_EState2
Min	-6,15	5,74	0,68	4,13
Max	-3,12	9,10	3,83	72,90
Test set				
Min	-6,09	5,74	2,82	11,97
Max	-3,55	9,10	3,86	63,69
Set za slijepu validaciju				
Min	-6,80	5,91	2,99	12,07
Max	-4,58	7,89	3,48	28,25

4.14.3. Eksterna slijepa validacija 2D-QSAR modela

U cilju procjene robusnosti i prediktivne sposobnosti razvijenih 2D-QSAR modela za HDAC6 i ROCK2 inhibitore, sprovedena je eksterna slijepa validacija korišćenjem svih sintetisanih jedinjenja sa eksperimentalno utvrđenom biološkom aktivnošću u okviru ove doktorske disertacije (**Slike 38-C, 54-B**). Među njima, pet jedinjenja je uspešno testirano sa oba QSAR modela što ukazuje na visoku prediktivnost i primjenljivost razvijenih modela za budući razvoj *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora (**Tabela 17**).

Jedinjenje **C-38** je pokazalo izuzetnu potentnost kao ROCK2 inhibitor, sa predviđenom vrijednošću koja premašuje 4 logaritamske jedinice u odnosu na eksperimentalnu vrijednost. Svi relevantni molekulski deskriptori ovog jedinjenja se nalaze unutar statistički validiranih granica utvrđenih tokom razvoja modela, što potvrđuje njegovu uključenost u domen primjenljivosti. Međutim, **C-38** posjeduje jedinstvenu strukturnu karakteristiku u poređenju sa ostalim jedinjenjima iz seta za slijepu validaciju.

Konkretno, **C-38** sadrži 4-(4-piridil)-fenil ostatak povezan sa homopiperazinom preko karbonilne grupe, za razliku od ostalih jedinjenja koja koriste sulfonilnu grupu kao povezujući element.

Jedinjenja **C-56** i **C-57**, koja poseduju izohinolin-piperazin farmakoforu, pokazuju umjerenu aktivnost prema ROCK2. Ova jedinjenja dijele visok stepen strukturne sličnosti sa jedinjenjem **C-55**, koje pokazuje dobru ROCK2 inhibitornu aktivnost. Glavna razlika između ovih jedinjenja je dužina alkil lanca: **C-56** ima osam atoma ugljenika, dok **C-55** ima šest. U **C-57** je alkil lanac zamijenjen aril lancem. Ovakva korelacija strukture i aktivnosti je takođe primjećena i kod sljedećih jedinjenja **C-8**, **C-9** i **C-10**. **C-10** sa alkil lancem od 6-ugljenikovih atoma pokazuje najbolju ROCK2 inhibitornu aktivnost, dok su **C-8** (aril lanac) i **C-9** (alkil lanac sa 8 ugljenikovih atoma) manje aktivni. Ovi rezultati sugerisu da dužina alkil lanca i prisustvo planarnog aromatičnog prstena utiču na ROCK2 inhibitornu aktivnost, vjerovatno kroz modulaciju hidrofobnih interakcija i sternih efekata unutar vezivnog mjesta enzima.

U kontekstu predikcije inhibitorne aktivnosti prema HDAC6, jedinjenja u eksternom slijepom setu za validaciju nisu pokazala značajne razlike između eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti (razlike su bile manje od 1 logaritamske jedinice) što ukazuje na visoku pouzdanost modela. Kod jedinjenje **C-9** vrijednost MinEStateIndex deskriptora izlazi van opsega trening seta za ovaj deskriptor, sa razlikom u predviđanju od 0,38. Takođe, vrijednost MinEStateIndex deskriptora od -6,33 za jedinjenje **C-57** je van opsega za ovaj deskriptor za trening set. Jedinjenje **C-38**, koje je pokazalo visoku aktivnost, ima vrijednosti BCUT2D_MRHI i VSA_EState2 bliže minimumu, što je povoljno za HDAC6 inhibitornu aktivnost.

Naši razvijeni QSAR modeli su takođe precizno predviđjeli inhibitorne aktivnosti HDAC6 i ROCK2 za novi *multitarget* HDAC/ROCK inhibitor koji su nedavno objavili Mao et al., koji je uključen kao dio eksterne slijepe validacije u ovoj studiji (**Tabela P3.4**) [145]. Ova uspješna predikcija dodatno potvrđuje robusnost i primjenljivost razvijenih QSAR modela u identifikaciji potencijalnih *multitarget* inhibitora.

Tabela 17. 2D-QSAR predikcije aktivnosti *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora

Jedinjenje	pIC ₅₀ exp	HDAC6pred	Razlika	Jedinjenje	pIC ₅₀ exp	ROCK2pred	Razlika
C-8	6,54	6,36	0,18	C-8	5,29	5,83	-0,54
C-9	6,74	6,36	0,38	C-9	6,14	6,1	0,04
C-10	6,36	6,36	0,00	C-10	6,35	6,41	-0,06
C-38	7,02	7,46	-0,44	C-38	4,33	8,36	-4,03
C-55	6,53	6,35	0,18	C-55	6,18	6,35	-0,17
C-56	6,04	6,36	-0,32	C-56	5,05	6,2	-1,15
C-57	7,03	6,43	0,60	C-57	4,52	5,91	-1,39
C-40	6,62	6,37	0,25	C-40	5,43	6,22	-0,79

Za 2D-QSAR (HDAC6) model je izvršena dodatna evaluacija korišćenjem IC₅₀ vrijednosti inhibitora **C-13**, **C-14** i **C-35** (**Tabela 18**). Predikcije QSAR modela za ova jedinjenja su pokazale dobru usklađenost sa eksperimentalno utvrđenim aktivnostima, čime je dodatno potvrđena prediktivna snaga 2D-QSAR (HDAC6) modela. Takođe, izvršena je dodatna procjena 2D-QSAR (ROCK2) modela pomoću jedinjenja **C-19** - ROCK inhibitor čiji je dizajn, sinteza, enzimaska i ćelijska evaluacija prethodno predstavljena u okviru poglavlja **4.1**, **4.2**, **4.3** i **4.4**. Njegova ROCK2 potentnost je potvrđena eksperimentalnim podacima koji su bili u skladu sa predviđenim vrijednostima 2D-QSAR (ROCK2) modela (**Tabela 18**).

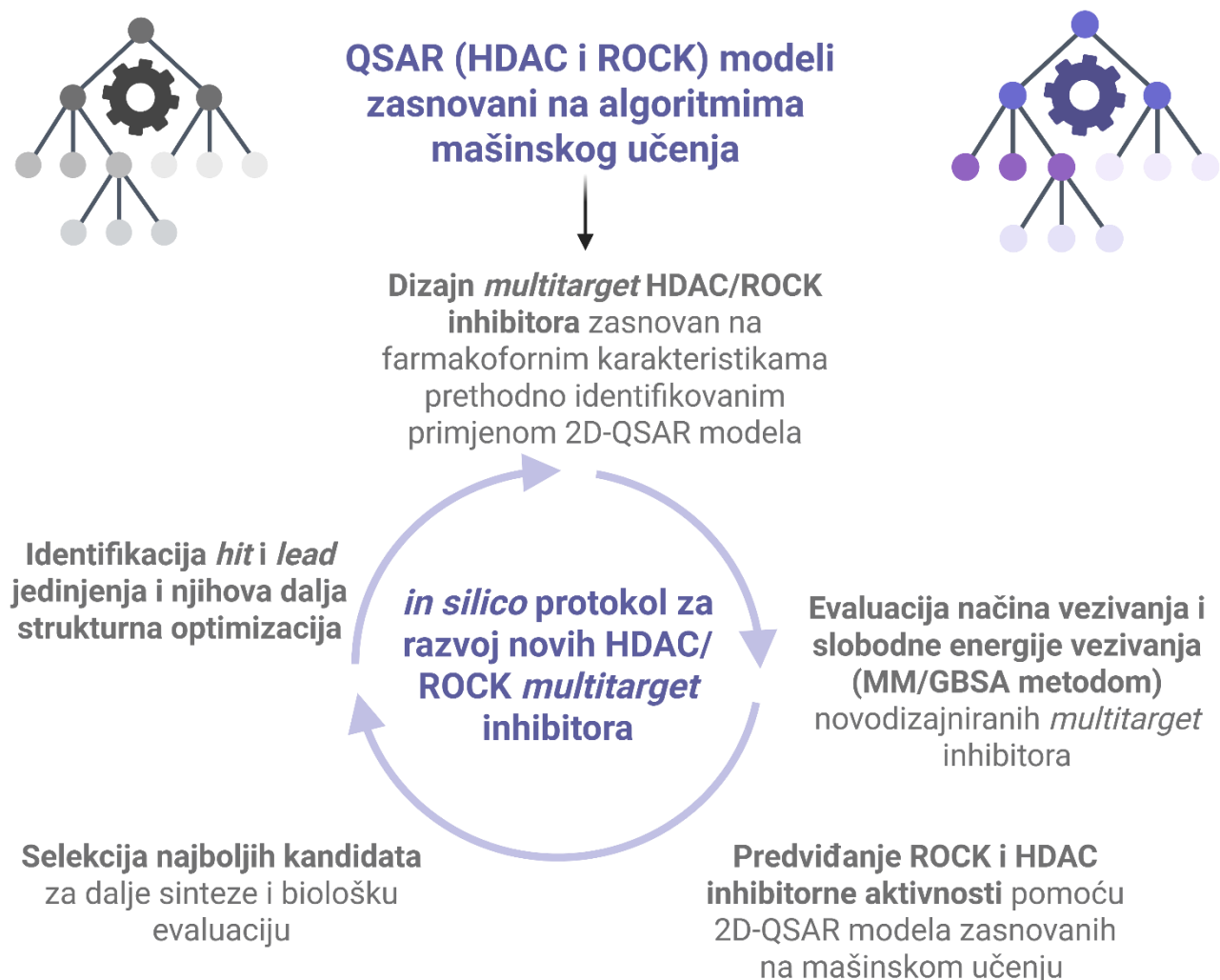
Pored toga, 2D-QSAR (ROCK2) model je testiran i na nekoliko poznatih ROCK2 inhibitora koji su opisani u literaturi, uključujući klinički odobrene lijekove: **fasudil**, **ripasudil**, **belumosudil** i **netarsudil**. U testiranje modela su uključena i četiri nedavno objavljena ROCK2 inhibitora, čime je dodatno proširen spektar testiranih molekula [145,314–317] (**Tabela P3.4**). Svi testirani ROCK2 inhibitori su pokazali prediktivne vrijednosti koje su u skladu sa eksperimentalnim rezultatima, bez značajnih odstupanja ili indikacija van domena primjenljivosti, što potvrđuje robusnost i konzistentnost razvijenog 2D-QSAR (ROCK2) modela.

Tabela 18. 2D-QSAR predikcije aktivnosti HDAC ili ROCK inhibitora

Jedinjenje	pIC ₅₀ exp	HDAC6pred	Razlika	Jedinjenje	pIC ₅₀ exp	ROCK2pred	Razlika
C-14	6,62	7,21	-0,59	Fasudil	6,8	7,23	-0,43
C-13	6,40	6,87	-0,47	C-19	5,21	5,47	-0,26
C-35	6,52	7,18	-0,66	Ripasudil	7,72	7,24	0,48
				Belumosudil	6,98	7,38	-0,4
				Netarsudil	7,96	8,71	-0,75
				Y-27632	6,66	6,77	-0,11

4.14.4. Dizajn novih HDAC/ROCK multitarget inhibitora baziran na formiranim ML-QSAR modelima

U okviru ove doktorske disertacije je finalno razvijen sveobuhvatan, detaljan i racionalan protokol za dizajn novih višestrukih HDAC/ROCK inhibitora. Predloženi protokol integriše savremene pristupe *computer-aided drug desing* (CADD), uključujući SBDD i LBDD metode kao što su molekulski doking, analiza slobodne energije vezivanja MM-GBSA metodom, kao i QSAR zasnovan na primjeni algoritma mašinskog učenja *Random Forest*. Implementacijom ovog integrisanog CADD protokola (**Slika 63**), omogućena je sistematska identifikacija i evaluacija novih potencijalnih HDAC/ROCK *multitarget* inhibitora kroz sveobuhvatan *in silico* protokol (**Tabela 19**).



Slika 63. CADD tok rada u cilju racionalnog dizajna novih HDAC/ROCK *multitarget* inhibitora. *Created in <https://BioRender.com>*

4.14.4.1. Analiza molekularnih determinanti ROCK2 inhibitora

U cilju dubljeg razumevanja strukturnih determinant značajnih za ROCK2 inhibitoru aktivnost, izvršena je analiza deskriptora identifikovanih 2D-QSAR (ROCK2) modelom. Rezultati ukazuju na nekoliko ključnih farmakofornih elemenata koji doprinose visokom afinitetu vezivanja.

Najznačajniji deskriptor je VSA_EState2 koji objedinjuje informacije o dostupnoj *Van der Waals* površini i elektronskom topološkom stanju molekula. Ovaj deskriptor ukazuje na važnost pravilne raspodjele elektronske gustine duž površine molekula u kontekstu ostvarivanja optimalnih interakcija u vezivnom mjestu enzima [318,319]. Njegova snažna korelacija sa biološkom aktivnošću ROCK2 inhibitora je dodatno potvrđena analizom farmakofora sintetisanih inhibitora među kojima dominiraju izohinolinski i piridil-fenil fragmenti koji su povezani putem fleksibilnih alkil lanaca sa hidroksamskom kiselinom, poznatom ZBG neophodnom za inhibiciju HDAC izoformi. Pored toga, prisustvo funkcionalnih grupa koje simultano povećavaju površinu molekula i elektronsku gustinu, naročito u

regijama sa mogućnošću formiranja vodoničnih veza, značajno doprinosi potentijem vezivanju molekula unutar aktivnog mjesta ROCK2. Heterociklični prstenovi sa dva heteroatoma (npr. indazol, pirazol) omogućavaju kombinaciju π - π interakcija, više vodoničnih veza i hidrofobnih kontakata unutar *hinge* regiona ROCK2 što rezultira povoljnim profilom vezivanja. Ova svojstva su dodatno podržana visokom značajnošću deskriptora Kappa3, koji reflektuje ciklizaciju i kompleksnost molekula kao faktore koji doprinose strukturnoj rigidnosti, prostornoj komplementarnosti i smanjenju entropijskog gubitka prilikom vezivanja [320].

Finalno, dokazana je važnost dužine i fleksibilnosti alifatičnih lanaca. Optimalni linearni alkil lanci (najčešće u opsegu od 6–8 atoma ugljenika) omogućavaju maksimalnu ispunjenost hidrofobnog poddžepa ROCK2 enzima. Deskriptor LabuteASA (*Labute's Approximate Surface Area*), koji kvantifikuje površinu dostupnu rastvaraču, takođe pokazuje pozitivnu korelaciju sa ROCK2 inhibitorima [321]. Ovo ističe važnost balansa u strukturi molekula kako bi se istovremeno uspostavile značajne interakcije u aktivnom mjestu ROCK enzima, a zadržala adekvatna rastvorljivost molekula i povoljne farmakokinetičke osobine.

Kumulativno, odabrani molekularni deskriptori razjašnjavaju ključne elemente odnosa strukture i aktivnosti (SAR) koji su od presudnog značaja za racionalni dizajn ROCK2 inhibitora nove generacije. Efikasni inhibitori se odlikuju precizno izbalansiranom kombinacijom rigidnih, visoko interaktivnih heterocikličnih jezgara, fleksibilnih alkil lanaca za optimizaciju *Van der Waals*-ovih kontakata, te funkcionalnih grupa koje učestvuju u građenju vodoničnih veza. Ovi uvidi pružaju čvrst temelj za dalji razvoj selektivnih i potentnih ROCK2 inhibitora sa povoljnim *drug-like* osobinama.

4.14.4.2. Analiza molekularnih determinanti HDAC6 inhibitora

Najuticajniji deskriptor u 2D-QSAR (HDAC6) modelu je **VSA_EState2** koji objedinjuje informacije o *van der Waals*-ovoj površini i elektronskom topološkom stanju molekula. Interesantno, u slučaju HDAC6 inhibitora, niže vrijednosti ovog deskriptora su korelirale sa većom biološkom aktivnošću, ukazujući na to da prekomjerna površina bogata elektronima može negativno uticati na afinitet vezivanja ka HDAC6 izoformi. Ova inverzna korelacija sugerise da su za HDAC6 optimalni molekuli sa manjom elektronskom gustinom, dok su za ROCK2, s druge strane, poželjne veće površine i elektronske gustine. Pomenuta razlika naglašava složenost dizajna *multitarget* inhibitora i ukazuje da strukturna optimizacija mora biti usmjerena ka uravnoteženju svojstava pogodnih za oba enzimska cilja.

U tom kontekstu, racionalan dizajn zahtjeva modifikaciju postojećih molekularnih struktura kroz uvođenje heterocikličnih sistema sa višestrukim donorima vodoničnih veza (npr. pirazol, triazol), manjih aromatičnih sistema poput benzenovog prstena u kombinaciji sa elektronegativnim grupama poput karbonilne ili sulfonil grupe. Ovakav pristup omogućava fino podešavanje gustine elektrona i topoloških svojstava, čime se balansiraju afiniteti prema HDAC6 i ROCK2 enzimima.

Drugi značajan deskriptor je **BCUT2D_MRHI**, koji kvantifikuje polarnost posmatranu kroz maksimalne vrijednosti indeksa refrakcije [322]. Negativna korelacija ovog deskriptora sa aktivnošću HDAC6 inhibitora sugerise da manja refraktivna zapremina omogućava bolju prostornu komplementarnost i efikasnije vezivanje u katalitičkom džepu HDAC6. Iako azotni heterociklični prstenovi mogu doprinijeti visokoj polarnosti i elektronskoj gustini, njihov efekat se mora kontrolisati dodatnim funkcionalnim grupama koje privlače elektrone, kao što su karbonilna ili nitro grupa.

Treći deskriptor po značaju, **AvgIpc**, predstavlja indeks prosječne povezanosti atoma unutar molekula i odražava topološku kompleksnost strukture [323]. Pozitivna korelacija sa aktivnošću HDAC6 inhibitora

ukazuje na to da su visoko povezana i geometrijski organizovana jedinjenja (npr. kondenzovani aromatični prstenovi) pogodna za formiranje višestrukih specifičnih interakcija unutar katalitičkog domena 2 HDAC6 enzima.

Četvrti deskriptor, **MinEStateIndex**, koji mjeri najniže elektronsko stanje u molekulu, iako manje dominantan, dao je pozitivan doprinos prediktivnom kapacitetu modela [324]. Niska, ali pozitivna vrijednost ovog parametra može reflektovati prisustvo lokalizovanih elektronskih regija koje učestvuju u specifičnim interakcijama. Na primjer, jedinjenje **C-38**, koje je pokazalo najvišu aktivnost prema HDAC6, je imalo optimalnu vrijednost MinEStateIndex-a, što implicira značaj fine elektronske raspodjele. Zamjena sulfonil grupe karbonilnom u **C-38** je dovela do poboljšanja elektronskih i sternih osobina molekula, što je dodatno potvrdilo značaj VSA_EState2 deskriptora. Pored toga, zamjena izohinolinskog prstena sa piridin-fenilnim fragmentom je omogućila dodatne π - π interakcije što je doprinijelo boljem vezivanju za HDAC6 i potencijalno očuvanom djelovanju prema ROCK2 enzimu.

Na osnovu analize najuticajnijih molekulskih deskriptora identifikovanih 2D-QSAR modelima za HDAC6 i ROCK2, izvedeni su sledeći ključni zaključci koji mogu poslužiti kao smjernice za racionalni dizajn novih *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora:

1. Dužina alkilnog lanca kao ključni strukturni parametar

- Optimalna dužina alkilnog lanca značajno utiče na inhibitorski potencijal prema oba ciljana enzima.
- Izrazito kratki lanci ne omogućavaju adekvatnu prostornu pokrivenost u aktivnim mjestima enzima, dok predugački lanci mogu uzrokovati sterne smetnje i smanjenje selektivnosti.
- Srednje dugi alkil lanci omogućavaju efikasne *van der Waals* interakcije i osiguravaju dobru konformacionu prilagodljivost liganda u vezujućim džepovima oba proteina.

2. Uloga heterocikličnih sistema bogatih azotom u farmakofornom dizajnu

- Heterociklični prstenovi koji sadrže više donora i/ili akceptora vodoničnih veza, poput indazola, pirazola, doprinose sljedećim povoljnim interakcijama:
 - π - π interakcijama sa aromatičnim aminokiselinama,
 - vodoničnim vezama unutar *hinge binding* regiona ROCK2 i katalitičkog domena 2 HDAC6.
 - hidrofobnim interakcijama sa aminokiselinским ostacima proteina.
- U okviru ROCK2 enzima, ovi prstenovi dodatno povećavaju površinu interakcija i molekulsku ciklizaciju, što pozitivno korelira sa afinitetom i potentnošću.

3. Specifične modifikacije za selektivnu inhibiciju HDAC6 izoforme

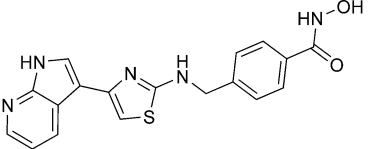
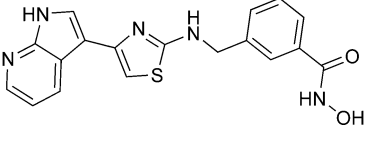
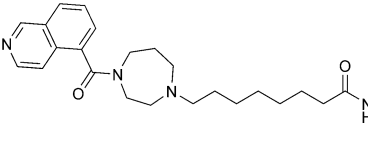
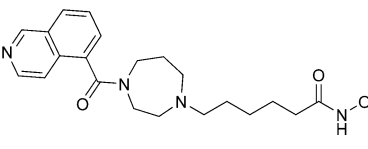
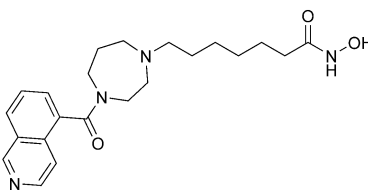
- Uvođenje aromatičnih prstenova, poput fenil grupe, doprinosi stabilizaciji liganda unutar katalitičkog džepa HDAC6.
- Prisustvo elektronegativnih funkcionalnih grupa, kao što je karbonilna grupa, doprinosi smanjenju lokalne elektronske gustine, što je povezano sa povoljnijom distribucijom elektrona i većom selektivnošću ka HDAC6 izoformi.

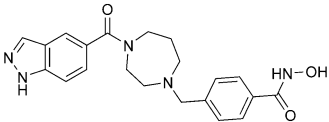
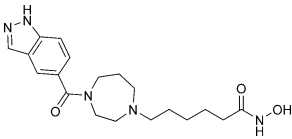
4. Značaj karbonilne grupe u modifikaciji elektronskih i interakcijskih svojstava

- Karbonilna grupa ispoljava dvostruki efekat: a) doprinosi smanjenju molekulske refraktivnosti zahvaljujući svom elektron-akceptorskom karakteru; b) omogućava formiranje stabilnih vodoničnih veza zahvaljujući elektronskim parovima kiseonika.
- Ove osobine su naročito važne za povećanje HDAC6 inhibicije uz očuvanje ROCK2 aktivnosti.

Na osnovu identifikovanih strukturnih osobina, vodeća molekula **C-9** je podvrgnuta strukturnim modifikacijama sa ciljem poboljšanja aktivnosti *multitarget* inhibitora. Dizajnirano je sedam novih derivata sa unapređenim farmakofornim osobinama, koji su dalje detaljno evaluirani kroz prethodno uspostavljeni *in silico* protokol (**Tabela 19**).

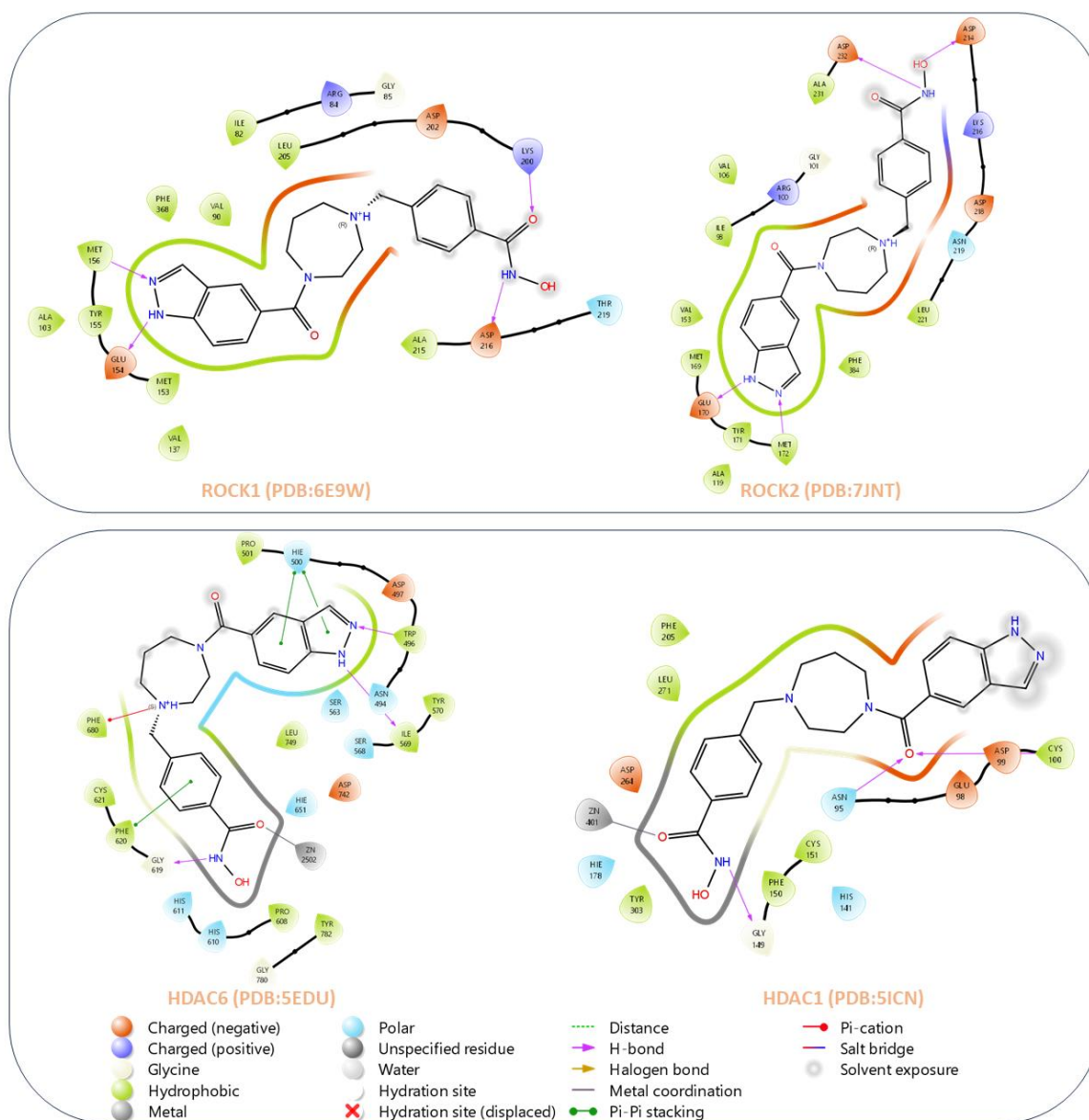
Tabela 19. Strukture, doking vrijednost, *Glide* vrijednost, MM-GBSA slobodna energija vezivanja i MM-GBSA efikasnost liganda novodizajniranih molekula.

Jedinjenje	Struktura	Enzim	Doking vrijednost	<i>Glide</i> vrijednost	MM-GBSA energija vezivanja	MM-GBSA efikasnost liganda
C-62		ROCK1	-8,725	-8,751	-45,45	-1,748
		ROCK2	-9,371	-9,397	-36,19	-1,392
		HDAC6	-9,714	-9,740	-20,95	-0,806
C-63		ROCK1	-7,730	-7,760	-49,14	-1,890
		ROCK2	-7,243	-7,274	-55,27	-2,126
		HDAC6	-10,193	-10,223	-19,37	-0,745
C-84		ROCK1	-9,602	-9,675	-57,18	-1,906
		ROCK2	-9,503	-9,576	-52,78	-1,759
		HDAC6	-6,744	-8,032	-10,27	-0,342
C-85		ROCK1	-9,358	-9,432	-57,96	-2,198
		ROCK2	-10,201	-10,274	-62,82	-2,244
		HDAC6	-9,576	-9,649	-10,39	-0,371
C-86		ROCK1	-9,751	-9,824	-61,06	-2,105
		ROCK2	-9,942	-10,016	-63,19	-2,179
		HDAC6	-8,877	-8,950	-18,96	-0,654

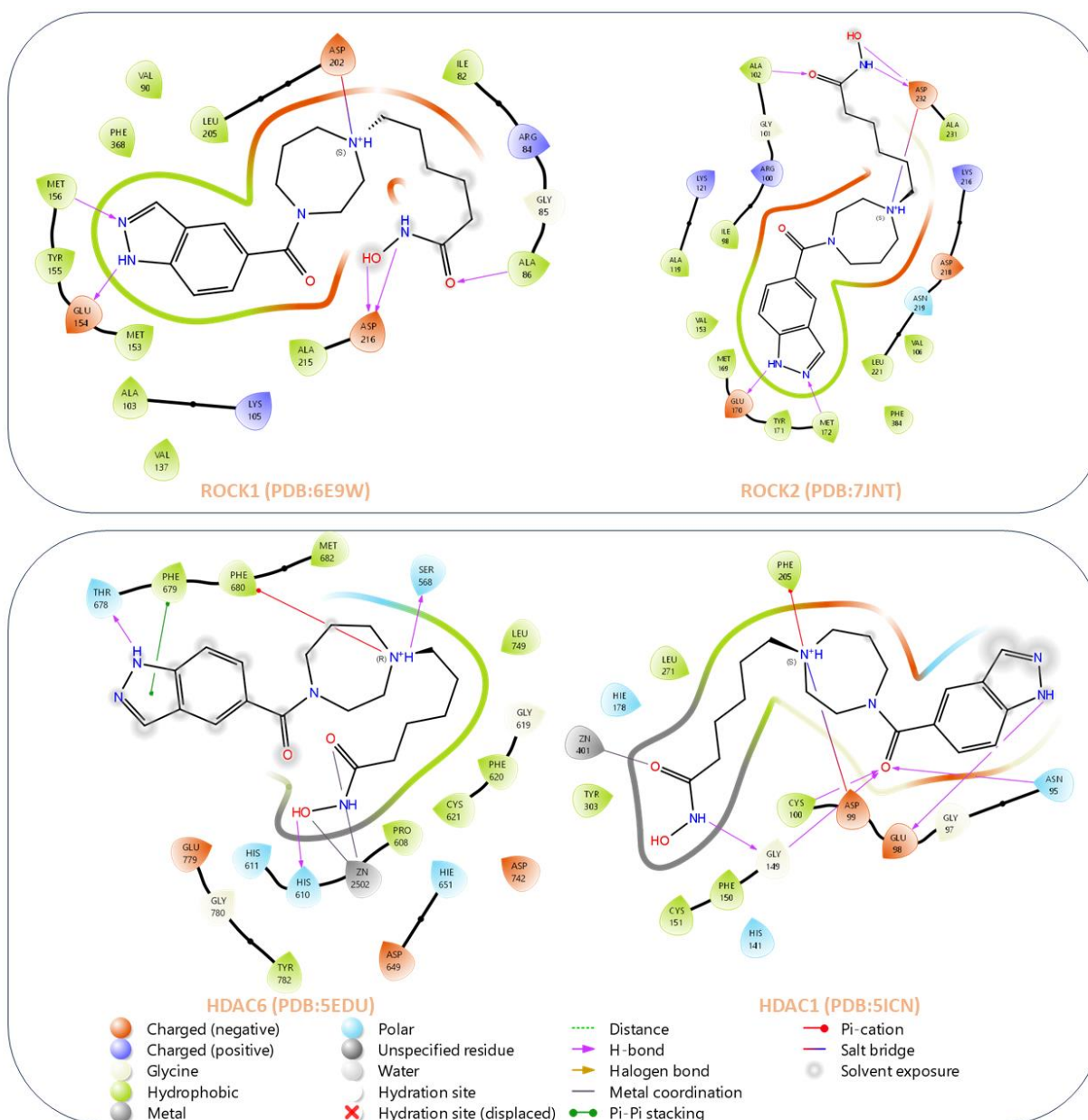
C-91		ROCK1	-8,699	-9,216	-37,83	-1,305
		ROCK2	-9,037	-9,554	-45,66	-1,574
		HDAC6	-9,733	-10,250	-31,91	-1,100
C-92		ROCK1	-8,045	-9,326	-62,73	-2,163
		ROCK2	-8,805	-10,087	-52,79	-1,820
		HDAC6	-8,189	-9,471	-18,46	-0,637

Prvobitno su sprovedene studije molekuskog dokinga i računanja energije vezivanja MM-GBSA metodom za novodizajnirana jedinjenja.

Za razliku od **C-9**, jedinjenja **C-91** (Slika 64) i **C-92** (Slika 65) pokazuju nešto izmijenjen način vezivanja koji se karakteriše formiranjem dvije vodonične veze sa ključnim aminokiselinskim ostacima u *hinge* regijama enzima ROCK1 (Met156 i Glu154) i ROCK2 (Met172 i Glu170). Ovakav obrazac interakcije sugerise potencijalno jači afinitet ka obje ROCK izoforme u poređenju sa jedinjenjem **C-9**. Oba jedinjenja ostvaruju hidrofobne interakcije sa ROCK1 i ROCK2, koje podsjećaju na interakcioni profil jedinjenja **C-9**.



Slika 64. Ključne interakcije ostvarene između **C-91** i ROCK1, ROCK2, HDAC6 i HDAC1.



Slika 65. Ključne interakcije ostvarene između **C-92** i ROCK1, ROCK2, HDAC6 i HDAC1.

Jedinjenja **C-85** i **C-86** se strukturno razlikuju od **C-9** zamjenom sulfonilne grupe karbonilnom, ali i različitim dužinama alkil lanca. Ove izmjene značajno utiču na načine vezivanja ovih jedinjenja za enzime. Posebno je izraženo povećanje broja vodoničnih veza koje hidroksamske kiseline ostvaruju sa aktivnim mjestima ROCK1 i ROCK2 u odnosu na **C-9** (Slike P3.1. i P3.2). Osim toga, zapažene su i stabilne interakcije sa *hinge* regionima ROCK1 (Met156) i ROCK2 (Met172), uz prisustvo različitih hidrofobnih kontakata sličnih onima kod jedinjenja **C-9**.

Detaljna analiza vezivanja jedinjenja **C-91**, **C-92**, **C-85** i **C-86** u okviru HDAC6 je pokazala da je formiran kompleks sa Zn^{2+} koji je dodatno stabilizovan vodoničnim vezama kod većine jedinjenja (Gly619 kod **C-91** i His610 kod **C-92** i **C-86**). Ovi molekuli ostvaruju značajne π - π i π -kationske interakcije sa važnim aminokiselinskim ostacima, uključujući His500, Phe620, Phe679 i Phe680. Ove

aminokiseline su ranije identifikovane kao značajne za HDAC6 inhibiciju (Slike 64,65, P3.1, P3.2). Takođe, azotni atomi homopiperazinskog prstena u jedinjenjima C-92, C-85 i C-86 (Slike 65, P3.1, P3.2) formiraju vodonične veze sa Ser568, interakciju koja je na osnovu rezultata prethodnih istraživanja značajna za HDAC6 inhibiciju. Izostanak ove interakcije kod C-91 (Slika 64) može ukazivati na nešto niži afinitet ka HDAC6 u poređenju sa ostalim jedinjenjima.

Sva testirana jedinjenja pokazuju visoke Doking i *Glide* vrijednosti (Tabela 19), koje su u skladu sa njihovim načinima vezivanja. Ova sveobuhvatna analiza ukazuje da su jedinjenja C-91, C-92, C-85 i C-86 obećavajući *multitarget* HDAC/ROCK inhibitori koji zahtjevaju dalju sintezu i detaljnu evaluaciju.

Sa druge strane, jedinjenja C-62 i C-63 pokazuju veoma visoke Doking i *Glide* vrijednosti za HDAC6, pri čemu C-62 premašuje sve ostale dizajnirane inhibitore. Međutim, njihovi načini vezivanja za ROCK izoforme ne uključuju ključne vodonične interakcije sa *hinge* regionima ROCK1 i ROCK2 (Met156 i Met172), što dovodi do zaključka da ova jedinjenja mogu biti potentni HDAC6 inhibitori, ali ne i *multitarget* HDAC/ROCK inhibitori.

Na kraju, biološka aktivnost novodizajniranih jedinjenja je predviđena primjenom prethodno razvijenih QSAR modela (Tabela 20). Ovi modeli, zasnovani na molekulskim deskriptorima sa potvrđenim značajem za inhibiciju ciljnih enzima, omogućili su pouzdanu procjenu inhibitornog potencijala dizajniranih jedinjenja. Svaki od novodizajniranih molekula je pokazao povoljne prediktivne vrijednosti za inhibiciju HDAC i ROCK izoformi, što dodatno ističe njihov potencijal kao obećavajućih *multitarget* inhibitora sa mogućom primjenom u terapiji kompleksnih bolesti koje uključuju aberantnu aktivnost ovih enzima.

Tabela 20. Predviđene HDAC6 and ROCK2 aktivnosti novih HDAC/ROCK *multitarget* inhibitora

Jedinjenje	ROCK2 _{pred}	HDAC6 _{pred}
C-91	7,32	7,51
C-92	7,03	7,13
C-84	7,37	7,07
C-85	7,55	7,04
C-86	7,50	7,08
C-62	7,53	7,19
C-63	7,53	7,17

5. ZAKLJUČAK

U okviru doktorske disertacije pod nazivom „**Određivanje strukture farmakofore, dizajn, sinteza i *in vitro* ispitivanje dualnih inhibitora histon deacetilaza (HDAC) i *Rho*-vezanih protein kinaza (ROCK)**“ sprovedena su opsežna istraživanja, koja su obuhvatila tri ključna segmenta:

1. ***In silico* analize** – uključujući određivanje farmakofore inhibitora ROCK kinaza, racionalni dizajn novih ROCK i HDAC/ROCK inhibitora i njihovu evaluaciju i selekciju primjenom molekuskog dokinga i QSAR analiza.
2. **Sinteza jedinjenja** – hemijska sinteza i karakterizacija odabranih ROCK i dualnih HDAC/ROCK inhibitora.
3. **Biološka evaluacija** – enzimska i ćelijska ispitivanja sintetisanih jedinjenja u cilju procjene njihove inhibitorne aktivnosti, citotoksičnosti, anti-tumorskih, anti-migratornih, anti-invazivnih osobina i potencijala za dalje prekliničke studije.

Na osnovu sveobuhvatne multimodalne analize dobijenih rezultata mogu se izvesti sljedeći najvažniji zaključci:

- Razvijen je visoko pouzdan 3D-QSAR model za ROCK1 inhibitore čija je validnost potvrđena analizom ključnih statističkih parametara interne i eksterne validacije. Svi dobijeni parametri interne validacije ($R^2 = 0,914$, $Q^2_{\text{LOO}} = 0,59$ i $\text{RMSEE} = 0,393$), eksterne validacije ($R^2_{\text{pred}} = 0,792$ i $\text{RMSEP} = 0,561$), kao i parametri r-metrike potvrdili su visoku prediktivnu moć razvijenog modela. Pored toga, konstruisan je i 3D-QSAR model kojim su identifikovani ključni strukturni elementi neophodni za inhibitornu aktivnost prema ROCK2 kinazi. Ispunjeni kriterijumi interne ($R^2 = 0,933$, $Q^2_{\text{LOO}} = 0,54$, $\text{RMSEE} = 0,327$) i eksterne validacije ($R^2_{\text{pred}} = 0,851$ i $\text{RMSEP} = 0,499$), kao i svi parametri r-metrike koji su imali vrijednosti iznad 0,5 potvrđuju visoku prediktivnu sposobnost 3D-QSAR modela za ROCK2. Ovi rezultati ukazuju na potencijal korišćenja formiranih 3D-QSAR modela u dizajn ROCK1 i ROCK2 inhibitora, pružajući smjernice za optimizaciju hemijskih struktura sa ciljem poboljšanja inhibitorne aktivnosti.
- Na osnovu integrisanih rezultata 3D-QSAR modelovanja i molekuskog dokinga definisana je farmakofora ROCK1/ROCK2 inhibitora koja obuhvata tri ključne strukturne komponente neophodne za efikasnu inhibiciju enzima. Prva i osnovna komponenta je **hinge-vezujući domen** koji sadrži heterociklične sisteme sposobne za formiranje vodoničnih veza sa ključnim aminokiselinskim ostacima aktivnih mjesta enzima - Glu154 i Met156 kod ROCK1, te Glu170 i Met172 kod ROCK2. Ove interakcije su od suštinskog značaja za postizanje ROCK inhibicije, što je nedvosmisleno potvrđeno i rezultatima 3D-QSAR studija. Ključne pozitivne promijenljive koje opisuju uticaj *hinge*-vezujućeg domena na inhibitorni potencijal su var323 i var328 za ROCK1, odnosno var254 i var459 za ROCK2. Druga komponenta je **linker segment** koji sadrži funkcionalne grupe sposobne za doniranje ili prihvatanje vodoničnih veza čime se dodatno stabilizuje vezivanje inhibitora za aktivno mjesto enzima. Prisustvo donorskih (npr. amidna azotna grupa) i akceptorskih (npr. karbonilna grupa) funkcionalnih elemenata omogućava formiranje vodoničnih veza sa ključnim aminokiselinskim ostacima Lys105 i Asp232 kod ROCK1, odnosno Lys121 kod ROCK2. Treća ključna komponenta farmakofore je **hidrofobni aromatični prsten**, najčešće benzenovog tipa, koji ostvaruje hidrofobne interakcije sa aminokiselinskim ostacima Ala103, Val137, Leu205, Met153, Phe120, Val90 i Gly85 kod ROCK1, te P-petljom kod ROCK2, čime doprinosi poboljšanoj ROCK inhibitornoj aktivnosti.

Dodatno, prisustvo elektron-donorskih supstituenata, poput fluoro, hidroksi i metoksi grupa, u *meta*- i *para*-pozicijama benzenovog prstena može značajno pojačati inhibitorski potencijal jedinjenja. Ovaj efekat se ostvaruje formiranjem dodatnih vodoničnih veza sa Phe87 kod ROCK1 i Phe103 kod ROCK2, što je potvrđeno i pozitivnim korelacijama u 3D-QSAR modelima između ovakvog tipa supstitucije i inhibitorske aktivnosti, naročito kroz promijenljive var573, var383 i var164 za ROCK1, odnosno var597 i var477 za ROCK2.

- Na osnovu definisane strukture farmakofore ROCK inhibitora, dizajnirani su i sintetisani novi potencijalni ROCK inhibitori koji sadrže **izohinolin** i **piridin** kao *hinge*-vezujuće domene. Enzimska evaluacija ovih jedinjenja je omogućila identifikaciju **C-19**, jedinjenja koje se izdvojilo kao najperspektivniji kandidat, ispoljavajući **umjerenu inhibitorsku aktivnost** prema ROCK kinazama. Konkretno, IC₅₀ vrijednosti određene u biohemijskim testovima su iznosile 4,22 μM za ROCK1 i 6,13 μM za ROCK2, što potvrđuje njegov potencijal kao modulatora aktivnosti ovih enzima.
- Jedinjenje **C-19** je ispoljilo izražena antitumorska svojstva sa IC₅₀ vrijednostima od 19,10 μM i 35,03 μM na ćelijskim linijama raka pankreasa MiaPaCa-2 i Panc-1. Tretman jedinjenjem **C-19** je doveo do značajnog povećanja procenta apoptotičnih ćelija u obje testirane ćelijske linije raka pankreasa, što ukazuje na njegovu sposobnost da indukuje programiranu ćelijsku smrt. Pored toga, **C-19** je uticao na ćelijski ciklus, pri čemu je u ćelijama MiaPaCa-2 uočeno značajno povećanje procenta ćelija u sub-G1 fazi, uz istovremeno smanjenje frakcije ćelija u G0/G1 fazi. U ćelijama Panc-1, tretiranje jedinjenjem **C-19** je rezultiralo blagim povećanjem procenta ćelija u G0/G1 fazi, što može sugerisati potencijalni citostatski efekat u ovom ćelijskom modelu. Pored citotoksičnih efekata, **C-19** kao jedinjenje sa najizraženijom ROCK inhibicijom među sintetisanim derivatima, je pokazalo snažne anti-migratorne i anti-invazivne osobine, pri čemu su njegovi efekti bili uporedivi sa poznatim ROCK inhibitorom fasudilom. S obzirom na visok stepen strukturne sličnosti kinaza, vjerovatno je da sintetisana jedinjenja ispoljavaju inhibitorske efekte i na druge kinaze, što bi trebalo dodatno istražiti u budućim eksperimentalnim studijama.
- Dizajnirani su **prvi dualni HDAC/ROCK inhibitori** uvođenjem strukturnih elemenata HDAC inhibitora u osnovni skelet fasudila. Azotov atom homopiperazinskog prstena je ciljano modifikovan uvođenjem farmakofornih elemenata karakterističnih za HDAC inhibitore. Prethodno sprovedenim doking analizama je pokazano da je azotov atom homopiperazinske regije fasudila izložen rastvaraču (*solvent-exposed* region) i da ne učestvuje u ključnim interakcijama odgovornim za ROCK inhibiciju.
- Dizajnirani HDAC/ROCK inhibitori su sintetisani u umjerenim prinosima (30-40%) a njihova struktura je okarakterisana pomoću NMR spektroskopije i masene analize visoke rezolucije.
- Novosintetisani dualni HDAC/ROCK inhibitori (**C-8**, **C-9** i **C-10**) su ispoljili značajnu inhibiciju serin/treonin kinaza ROCK1 i ROCK2. Među ispitivanim jedinjenjima, inhibitor **C-10** je pokazao najvišu inhibitorsku aktivnost sa IC₅₀ vrijednostima u nanomolarnom opsegu (468 nM za ROCK1 i 448 nM za ROCK2). Iako je **C-9** ispoljio nešto nižu inhibitorsku aktivnost na ROCK kinaze u poređenju sa **C-10** (800 nM za ROCK1 i 700 nM za ROCK2), on se izdvojio kao najpotentniji HDAC6 inhibitor sa IC₅₀ vrijednošću od 185 nM, dok je aktivnost **C-10** na HDAC6 bila slabija, IC₅₀= 440 nM. **Na ovaj način je biohemijskim testovima potvrđena identifikacija prvih dualnih HDAC/ROCK inhibitora.**

- **C-9** je pokazao bolju aktivnost u citotoksičnim testovima u poređenju sa standardnim ROCK i HDAC6 inhibitorima – fasudilom i tubastatinom A, kao i drugim sintetisanim HDAC/ROCK dualnim inhibitorima, **C-8** i **C-10**. Uticaj **C-9** je naročito bio izražen u ćelijskim linijama trostruko-negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231 i pankreasnog adenokarcinoma MiaPaCa-2 i Panc-1 sa IC₅₀ vrijednostima 5,81 μM, 3,87 μM i 19,57 μM što sugerise da **C-9** ima širok spektar antitumorskog djelovanja. Visok indeks selektivnosti (Si), posebno u MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 ćelijama, je ukazao na mogućnost ciljanog uticaja na tumorske ćelije uz minimalan toksični efekat na normalne ćelije, čime se otvara mogućnost razvoja **C-9** kao potencijalnog terapijskog kandidata.
- Analizom ćelijskog ciklusa je pokazano da **C-9** izaziva značajno povećanje broja MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 ćelija u sub-G1 frakciji što ukazuje na indukciju apoptoze. Ovaj efekat je dodatno potvrđen analizom depolarizacije mitohondrijske membrane (MMP), koja ukazuje na aktivaciju unutrašnjeg apoptotskog puta. Povećana produkcija ROS unutar mitohondrija je dodatno potvrdila disfunkciju mitohondrija kao jednog od ključnih mehanizama apoptotskog odgovora na tretman **C-9**.
- **C-9** je značajno smanjio veličinu i vijabilnost MiaPaCa-2 i Panc-1 sferoida tokom 72-časovnog tretmana u koncentracijama ekvivalentnim IC₅₀ vrijednostima u 2D modelima. Osim što je inhibirao rast već formiranih sferoida, **C-9** je značajno smanjio sposobnost formiranja novih tumorskih agregata, što ukazuje na njegov potencijal u sprečavanju širenja tumorskih ćelija. Ovaj efekat je bio izraženiji u poređenju sa fasudilom i tubastatinom A, što dodatno potvrđuje superiornost pristupa zasnovanog na korišćenju liganada sa višestrukim ciljnim mjestom dejstva u inhibiciji progresije karcinoma.
- **C-9** je značajno uticao na sposobnost MDA-MB-231 i MiaPaCa-2 ćelija da migriraju i invadiraju kroz Matrigel, pri čemu je ovaj efekat bio izraženiji u poređenju sa standardnim ROCK inhibitorom, fasudilom. Konkretno, **C-9** je smanjio migraciju MDA-MB-231 ćelija za 64,5% i MiaPaCa-2 ćelija za 65,3%, dok su invazivna svojstva ovih ćelijskih linija smanjena za 80,7% i 93,4%. Ovi rezultati ukazuju na to da **C-9** efikasno inhibira ključne procese metastaziranja, što ga čini perspektivnim kandidatom za terapiju invazivnih oblika karcinoma.
- **C-9** je izabran kao vodeći molekul za dalje strukturne modifikacije i dizajn novih HDAC/ROCK inhibitora na osnovu rezultata *in vitro* enzimskih i ćelijskih testova. Novi dualni HDAC/ROCK inhibitori su dizajnirani uzimajući u obzir farmakoforu ROCK inhibitora koja je prethodno definisana u ovom istraživanju, kao i literaturne podatke o HDAC farmakofori. Novodizajnirani HDAC/ROCK inhibitori su potom podvrgnuti *in silico* evaluaciji, uključujući molekulski doking i proračune slobodne energije vezivanja MM-GBSA metodom.
- Sprovedena *in silico* analiza je pokazala da neka od novodizajniranih jedinjenja ne samo da zadržavaju sposobnost istovremenog djelovanja na HDAC i ROCK, već pokazuju i potencijal za superiornije osobine u poređenju sa vodećim molekulom **C-9**. Kombinovani rezultati molekuskog dokinga, MM-GBSA proračuna slobodne energije vezivanja i procjene efikasnosti liganda su jasno sugerisali da svi analizirani molekuli ispoljavaju poboljšani afinitet ka ROCK1 i/ili ROCK2 i/ili HDAC6. Finalno, ovi rezultati su pružili čvrstu osnovu za dalju hemijsku sintezu i eksperimentalnu validaciju izabranih jedinjenja.

- Na osnovu rezultata enzimskih studija, jedinjenja **C-55**, **C-57**, **C-38**, **C-40** i **C-35** su izabrana za dalju evaluaciju na nivou ćelija. Jedinjenje **C-55** je identifikovano kao najefikasniji ROCK inhibitor, sa izraženom aktivnošću prema ROCK1 ($IC_{50} = 370$ nM) i ROCK2 ($IC_{50} = 650$ nM), ali sa nižim afinitetom prema HDAC6 ($IC_{50} = 294$ nM) i slabom aktivnošću prema drugim HDAC izoformama pri koncentraciji od $1 \mu M$. Najpotentniji HDAC6 inhibitori su bila jedinjenja **C-38** i **C-57**, sa IC_{50} vrijednostima od $94,71$ nM i $92,49$ nM. Ova jedinjenja su pokazala visoku selektivnost prema HDAC6, dok je njihova aktivnost prema nuklearnim HDAC1, HDAC2 i HDAC3 bila ograničena, uz inhibiciju od $\leq 50\%$ pri $1 \mu M$. Istovremeno, njihova aktivnost prema ROCK kinazama je bila manja i pri višim koncentracijama ($10 \mu M$). Jedinjenja **C-35** i **C-40** su pokazala uravnotežen inhibitorski profil prema citoplazmatskim i nuklearnim HDAC izoformama. **C-40** je pokazalo i umjerenu aktivnost na ROCK kinazama (ROCK1 $IC_{50} = 1,51 \mu M$; ROCK2 $IC_{50} = 3,70 \mu M$), za razliku od **C-35**, koje je imalo minimalan efekat na ROCK inhibiciju.
- Na osnovu rezultata *in vitro* ćelijskih ispitivanja, može se zaključiti da novodizajnirani dualni HDAC/ROCK inhibitori, naročito jedinjenja **C-35** i **C-40**, pokazuju obećavajući antitumorski potencijal prema TNBC ćelijskim linijama (MDA-MB-231 sa $IC_{50} = 17 \mu M$ i $IC_{50} = 27 \mu M$; MDA-MB-468 za oba jedinjenja IC_{50} približno $35 \mu M$), uz povoljan profil selektivnosti prema normalnim ćelijama. **C-35** je, uz vodeće jedinjenje **C-9**, demonstriralo sposobnost da naruši ćelijski ciklus i indukuje ranu apoptozu u obje ispitivane TNBC ćelijske linije, što ukazuje na moguće mehanizme njegovog antiproliferativnog djelovanja.
- Jedinjenja **C-35**, **C-40** i **C-9** su pokazala izražen imunomodulatorni potencijal kroz uticaj na ekspresiju imunološki relevantnih površinskih antigena u TNBC ćelijskoj liniji MDA-MB-468. Sva tri jedinjenja su dovela do smanjenja nivoa imunosupresivnog markera PD-L1. Tretman **C-9** je dodatno uzrokovao smanjenje ekspresije PVR antigena, dok je tretman **C-35** rezultirao povećanom ekspresijom MICA. Kombinacija smanjenja ekspresije PD-L1 i PVR, uz porast MICA, ukazuje na sposobnost ovih jedinjenja da preoblikuju imunosupresivno tumorsko mikrookruženje čime se može poboljšati imunološka prepoznatljivost i osjetljivost tumorskih ćelija na efektorske mehanizme antitumorskog imuniteta. Ovi rezultati dodatno potvrđuju potencijal HDAC/ROCK inhibitora, ne samo kao direktnih antiproliferativnih agensa, već i kao molekula sa sposobnošću imunomodulacije, što ih svrstava među perspektivne kandidate za integrisane antitumorske terapijske pristupe.
- Primjenom RF algoritma mašinskog učenja formirani su regresioni 2D-QSAR modeli za HDAC6 i ROCK2, a sva prethodno sintetisana jedinjenja i njihove IC_{50} vrijednosti su iskorišćena za formiranje seta za slijepu validaciju formiranih modela. Oba modela su pokazala dobre vrijednosti parametara interne i eksterne validacije (2D-QSAR (HDAC6): $R^2 = 0,95$; OOB = $0,60$; MSE = $0,07$; $R^2_{test} = 0,76$ i MSE = $0,30$ i 2D-QSAR (ROCK2): $R^2 = 0,96$; OOB = $0,72$; MSE = $0,07$; $R^2_{test} = 0,73$ i MSE od $0,48$) što je potvrdilo stabilnost i prediktivnu snagu formiranih modela. Posebno je značajno da su svi testirani inhibitori iz seta za slijepu validaciju pokazali prediktivne vrijednosti u skladu sa eksperimentalno određenim aktivnostima, bez većih odstupanja ili izlazaka iz domena primjenljivosti, čime je dodatno potvrđena pouzdanost i konzistentnost razvijenih QSAR modela. Ovi rezultati ukazuju na potencijal RF-baziranih 2D-QSAR modela kao korisnih alata u ranoj fazi dizajna i optimizacije *multitarget* inhibitora.
- Na osnovu identifikovanih najrelevantnijih molekulskih deskriptora tokom 2D-QSAR analiza, definisane su ključne farmakoforne karakteristike odgovorne za inhibiciju HDAC i ROCK enzima. Uzimajući u obzir ove rezultate, dizajnirani su novi potencijalni dualni HDAC/ROCK

inhibitori. Detaljna *in silico* evaluacija, uključujući molekularni doking, pokazala je da **C-91** i **C-92** ostvaruju povoljne interakcije sa katalitičkim domenom 2 HDAC6 enzima, kao i sa ROCK kinazama. Posebno značajan rezultat predstavlja formiranje dvije stabilne vodikove veze unutar *hinge* regiona ROCK kinaza, što je poznato kao ključna determinanta jakog i selektivnog vezivanja inhibitora. Finalno, predviđene pIC₅₀ vrijednosti za sva dizajnirana jedinjenja prema svim ciljanim enzimima su bile veće od 7, što ukazuje na njihov značajan potencijal. Ovi podaci sugeriraju da dizajnirana jedinjenja predstavljaju obećavajuće kandidate za dalju sintezu i eksperimentalnu validaciju u okviru razvoja *multitarget* terapija za tretman agresivnih oblika karcinoma.

U okviru ove doktorske disertacije uspostavljen je sveobuhvatan i validiran ***in silico* protokol** koji može služiti kao osnova za racionalan dizajn novih *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora, kao i selektivnih HDAC6 ili ROCK2 inhibitora. Predloženi protokol integriše savremene pristupe SBDD i LBDD dizajna, uključujući molekularni doking, računanje slobodne energije vezivanja primjenom MM-GBSA metode, te primjenu 2D-QSAR modela baziranih na *Random Forest* algoritmu mašinskog učenja. Ovako integrisan pristup omogućava pouzdanu predikciju biološke aktivnosti i optimizaciju farmakološkog profila dizajniranih molekula još u ranoj fazi razvoja. U svjetlu dobijenih rezultata, jedinjenja poput **C-9** i **C-35** su identifikovana kao obećavajući *multitarget* HDAC/ROCK kandidati sa značajnim antiproliferativnim i imunomodulatornim efektima, čime su pokazala potencijal za dalji farmakološki razvoj u okviru savremenih onkoloških strategija, posebno u kontekstu terapije usmjerene ka višestrukim molekularnim ciljevima.

6. Literatura

1. What Is Cancer? - NCI Available online: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (accessed on 18 February 2025).
2. Webster, N. *An American Dictionary of the English Language*; Merriam, 1869;
3. Brown, J.S.; Amend, S.R.; Austin, R.H.; Gatenby, R.A.; Hammarlund, E.U.; Pienta, K.J. Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research* **2023**, *21*, 1142–1147, doi:10.1158/1541-7786.MCR-23-0411.
4. Sudhakar, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Canc Sci Ther* **2009**, *01*, i–iv, doi:10.4172/1948-5956.100000e2.
5. A. Baudino, T. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Current Drug Discovery Technologies* **2015**, *12*, 3–20.
6. Padma, V.V. An Overview of Targeted Cancer Therapy. *BioMed* **2015**, *5*, 19, doi:10.7603/s40681-015-0019-4.
7. Wang, L. Early Diagnosis of Breast Cancer. *Sensors* **2017**, *17*, 1572, doi:10.3390/s17071572.
8. Esteller, M. Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine* **2008**, *358*, 1148–1159, doi:10.1056/NEJMra072067.
9. Biswas, S.; Rao, C.M. Epigenetics in Cancer: Fundamentals and Beyond. *Pharmacology & Therapeutics* **2017**, *173*, 118–134, doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.011.
10. Dupont, C.; Armant, D.; Brenner, C. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin Reprod Med* **2009**, *27*, 351–357, doi:10.1055/s-0029-1237423.
11. Sadikovic, B.; Al-Romaih, K.; Squire, J.; Zielenska, M. Cause and Consequences of Genetic and Epigenetic Alterations in Human Cancer. *CG* **2008**, *9*, 394–408, doi:10.2174/138920208785699580.
12. Shahzad, H. *Neoplasm*; BoD – Books on Demand, 2018; ISBN 978-1-78923-777-1.
13. Singh, R.K.; Kumar, S.; Prasad, D.N.; Bhardwaj, T.R. Therapeutic Journey of Nitrogen Mustard as Alkylating Anticancer Agents: Historic to Future Perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *151*, 401–433, doi:10.1016/j.ejmech.2018.04.001.
14. Urruticoechea, A.; Alemany, R.; Balart, J.; Villanueva, A.; Vinals, F.; Capella, G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *CPD* **2010**, *16*, 3–10, doi:10.2174/138161210789941847.
15. Strebhardt, K.; Ullrich, A. Paul Ehrlich's Magic Bullet Concept: 100 Years of Progress. *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 473–480, doi:10.1038/nrc2394.
16. Han-Chung, W.; Chang, D.-K.; Chia-Ting, H. Targeted Therapy for Cancer. *Journal of Cancer Molecules* **2006**, *2*.
17. Lee, Y.T.; Tan, Y.J.; Oon, C.E. Molecular Targeted Therapy: Treating Cancer with Specificity. *European Journal of Pharmacology* **2018**, *834*, 188–196, doi:10.1016/j.ejphar.2018.07.034.
18. Sawyers, C. Targeted Cancer Therapy. *Nature* **2004**, *432*, 294–297, doi:10.1038/nature03095.
19. Jin, H.; Wang, L.; Bernards, R. Rational Combinations of Targeted Cancer Therapies: Background, Advances and Challenges. *Nat Rev Drug Discov* **2023**, *22*, 213–234, doi:10.1038/s41573-022-00615-z.

20. Gerber, D.E. Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments. *Targeted Therapies* **2008**, *77*.
21. Benson, J.D.; Chen, Y.-N.P.; Cornell-Kennon, S.A.; Dorsch, M.; Kim, S.; Leszczyniecka, M.; Sellers, W.R.; Lengauer, C. Validating Cancer Drug Targets. *Nature* **2006**, *441*, 451–456, doi:10.1038/nature04873.
22. Mobashir, M.; Turunen, S.P.; Izhari, M.A.; Ashankyty, I.M.; Helleday, T.; Lehti, K. An Approach for Systems-Level Understanding of Prostate Cancer from High-Throughput Data Integration to Pathway Modeling and Simulation. *Cells* **2022**, *11*, 4121, doi:10.3390/cells11244121.
23. Giordano, S.; Petrelli, A. From Single- to Multi-Target Drugs in Cancer Therapy: When Aspecificity Becomes an Advantage. *Current Medicinal Chemistry* **2008**, *15*, 422–432, doi:10.2174/092986708783503212.
24. Raghavendra, N.M.; Pingili, D.; Kadasi, S.; Mettu, A.; Prasad, S.V.U.M. Dual or Multi-Targeting Inhibitors: The next Generation Anticancer Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *143*, 1277–1300, doi:10.1016/j.ejmech.2017.10.021.
25. Zhong, L.; Li, Y.; Xiong, L.; Wang, W.; Wu, M.; Yuan, T.; Yang, W.; Tian, C.; Miao, Z.; Wang, T.; et al. Small Molecules in Targeted Cancer Therapy: Advances, Challenges, and Future Perspectives. *Sig Transduct Target Ther* **2021**, *6*, 1–48, doi:10.1038/s41392-021-00572-w.
26. Anighoro, A.; Bajorath, J.; Rastelli, G. Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7874–7887, doi:10.1021/jm5006463.
27. Zhou, J.; Jiang, X.; He, S.; Jiang, H.; Feng, F.; Liu, W.; Qu, W.; Sun, H. Rational Design of Multitarget-Directed Ligands: Strategies and Emerging Paradigms. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 8881–8914, doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00017.
28. Gentile, C.; Martorana, A.; Lauria, A.; Bonsignore, R. Kinase Inhibitors in Multitargeted Cancer Therapy. *CMC* **2017**, *24*, doi:10.2174/0929867324666170112112734.
29. Jiang, Q.; Li, M.; Li, H.; Chen, L. Entrectinib, a New Multi-Target Inhibitor for Cancer Therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2022**, *150*, 112974, doi:10.1016/j.biopha.2022.112974.
30. Fukumura, D.; Kloepper, J.; Amoozgar, Z.; Duda, D.G.; Jain, R.K. Enhancing Cancer Immunotherapy Using Antiangiogenics: Opportunities and Challenges. *Nat Rev Clin Oncol* **2018**, *15*, 325–340, doi:10.1038/nrclinonc.2018.29.
31. Cho, Y.S.; Kwon, H.J. Identification and Validation of Bioactive Small Molecule Target through Phenotypic Screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, 1922–1928, doi:10.1016/j.bmc.2011.11.021.
32. Ma, X.H.; Shi, Z.; Tan, C.; Jiang, Y.; Go, M.L.; Low, B.C.; Chen, Y.Z. In-Silico Approaches to Multi-Target Drug Discovery. *Pharm Res* **2010**, *27*, 739–749, doi:10.1007/s11095-010-0065-2.
33. Miller, M.L.; Molinelli, E.J.; Nair, J.S.; Sheikh, T.; Samy, R.; Jing, X.; He, Q.; Korkut, A.; Crago, A.M.; Singer, S.; et al. Drug Synergy Screen and Network Modeling in Dedifferentiated Liposarcoma Identifies CDK4 and IGF1R as Synergistic Drug Targets. *Science Signaling* **2013**, *6*, ra85–ra85, doi:10.1126/scisignal.2004014.
34. Morphy, R.; Rankovic, Z. Designing Multiple Ligands - Medicinal Chemistry Strategies and Challenges. *Current Pharmaceutical Design* **2009**, *15*, 587–600.

35. Fu, R.; Sun, Y.; Sheng, W.; Liao, D. Designing Multi-Targeted Agents: An Emerging Anticancer Drug Discovery Paradigm. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *136*, 195–211, doi:10.1016/j.ejmech.2017.05.016.
36. Ramaiah, M.J.; Tangutur, A.D.; Manyam, R.R. Epigenetic Modulation and Understanding of HDAC Inhibitors in Cancer Therapy. *Life Sciences* **2021**, *277*, 119504, doi:10.1016/j.lfs.2021.119504.
37. Rousseaux, S.; Khochbin, S. Histone Acylation beyond Acetylation: Terra Incognita in Chromatin Biology. *Cell J* **2015**, *17*, 1–6.
38. Zhang, Y.; Sun, Z.; Jia, J.; Du, T.; Zhang, N.; Tang, Y.; Fang, Y.; Fang, D. Overview of Histone Modification. In *Histone Mutations and Cancer*; Fang, D., Han, J., Eds.; Springer: Singapore, 2021; pp. 1–16 ISBN 9789811581045.
39. Wolffe, A.P.; Hayes, J.J. Chromatin Disruption and Modification. *Nucleic Acids Research* **1999**, *27*, 711–720, doi:10.1093/nar/27.3.711.
40. Turner, B.M. Histone Acetylation and an Epigenetic Code. *BioEssays* **2000**, *22*, 836–845, doi:10.1002/1521-1878(200009)22:9<836::AID-BIES9>3.0.CO;2-X.
41. Bannister, A.J.; Kouzarides, T. Regulation of Chromatin by Histone Modifications. *Cell Res* **2011**, *21*, 381–395, doi:10.1038/cr.2011.22.
42. Ho, T.C.S.; Chan, A.H.Y.; Ganesan, A. Thirty Years of HDAC Inhibitors: 2020 Insight and Hindsight. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 12460–12484, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00830.
43. Jenke, R.; Reßing, N.; Hansen, F.K.; Aigner, A.; Büch, T. Anticancer Therapy with HDAC Inhibitors: Mechanism-Based Combination Strategies and Future Perspectives. *Cancers* **2021**, *13*, 634, doi:10.3390/cancers13040634.
44. Bertrand, P. Inside HDAC with HDAC Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45*, 2095–2116, doi:10.1016/j.ejmech.2010.02.030.
45. Millard, C.J.; Watson, P.J.; Fairall, L.; Schwabe, J.W.R. Targeting Class I Histone Deacetylases in a “Complex” Environment. *Trends in Pharmacological Sciences* **2017**, *38*, 363–377, doi:10.1016/j.tips.2016.12.006.
46. Aramsangtienchai, P.; Spiegelman, N.A.; He, B.; Miller, S.P.; Dai, L.; Zhao, Y.; Lin, H. HDAC8 Catalyzes the Hydrolysis of Long Chain Fatty Acyl Lysine. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2685–2692, doi:10.1021/acscchembio.6b00396.
47. Ruzic, D.; Ellinger, B.; Djokovic, N.; Santibanez, J.F.; Gul, S.; Beljkas, M.; Djuric, A.; Ganesan, A.; Pavic, A.; Srdic-Rajic, T.; et al. Discovery of 1-Benzhydryl-Piperazine-Based HDAC Inhibitors with Anti-Breast Cancer Activity: Synthesis, Molecular Modeling, In Vitro and In Vivo Biological Evaluation. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2600, doi:10.3390/pharmaceutics14122600.
48. Hubbert, C.; Guardiola, A.; Shao, R.; Kawaguchi, Y.; Ito, A.; Nixon, A.; Yoshida, M.; Wang, X.-F.; Yao, T.-P. HDAC6 Is a Microtubule-Associated Deacetylase. *Nature* **2002**, *417*, 455–458, doi:10.1038/417455a.
49. Patel, A.S.; Schechter, G.L.; Wasilenko, W.J.; Somers, K.D. Overexpression of EMS1/Cortactin in NIH3T3 Fibroblasts Causes Increased Cell Motility and Invasion in Vitro. *Oncogene* **1998**, *16*, 3227–3232, doi:10.1038/sj.onc.1201850.

50. Kovacs, J.J.; Murphy, P.J.M.; Gaillard, S.; Zhao, X.; Wu, J.-T.; Nicchitta, C.V.; Yoshida, M.; Toft, D.O.; Pratt, W.B.; Yao, T.-P. HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Molecular Cell* **2005**, *18*, 601–607, doi:10.1016/j.molcel.2005.04.021.
51. Subramanian, C.; Jarzembowski, J.A.; Opipari, A.W.; Castle, V.P.; Kwok, R.P.S. HDAC6 Deacetylates Ku70 and Regulates Ku70-Bax Binding in Neuroblastoma. *Neoplasia* **2011**, *13*, 726–734, doi:10.1593/neo.11558.
52. Riolo, M.T.; Cooper, Z.A.; Holloway, M.P.; Cheng, Y.; Bianchi, C.; Yakirevich, E.; Ma, L.; Chin, Y.E.; Altura, R.A. Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Deacetylates Survivin for Its Nuclear Export in Breast Cancer *. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 10885–10893, doi:10.1074/jbc.M111.308791.
53. Koeneke, E.; Witt, O.; Oehme, I. HDAC Family Members Intertwined in the Regulation of Autophagy: A Druggable Vulnerability in Aggressive Tumor Entities. *Cells* **2015**, *4*, 135–168, doi:10.3390/cells4020135.
54. Hai, Y.; Shinsky, S.A.; Porter, N.J.; Christianson, D.W. Histone Deacetylase 10 Structure and Molecular Function as a Polyamine Deacetylase. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15368, doi:10.1038/ncomms15368.
55. Kutil, Z.; Novakova, Z.; Meleshin, M.; Mikesova, J.; Schutkowski, M.; Barinka, C. Histone Deacetylase 11 Is a Fatty-Acid Deacylase. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 685–693, doi:10.1021/acschembio.7b00942.
56. Yanginlar, C.; Logie, C. HDAC11 Is a Regulator of Diverse Immune Functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **2018**, *1861*, 54–59, doi:10.1016/j.bbagr.2017.12.002.
57. Fraga, M.F.; Ballestar, E.; Villar-Garea, A.; Boix-Chornet, M.; Espada, J.; Schotta, G.; Bonaldi, T.; Haydon, C.; Ropero, S.; Petrie, K.; et al. Loss of Acetylation at Lys16 and Trimethylation at Lys20 of Histone H4 Is a Common Hallmark of Human Cancer. *Nat Genet* **2005**, *37*, 391–400, doi:10.1038/ng1531.
58. Li, Y.; Seto, E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2016**, *6*, a026831, doi:10.1101/cshperspect.a026831.
59. Glozak, M.A.; Seto, E. Histone Deacetylases and Cancer. *Oncogene* **2007**, *26*, 5420–5432, doi:10.1038/sj.onc.1210610.
60. West, A.C.; Johnstone, R.W. New and Emerging HDAC Inhibitors for Cancer Treatment. *J Clin Invest* **2014**, *124*, 30–39, doi:10.1172/JCI69738.
61. Luo, J.; Su, F.; Chen, D.; Shiloh, A.; Gu, W. Deacetylation of P53 Modulates Its Effect on Cell Growth and Apoptosis. *Nature* **2000**, *408*, 377–381, doi:10.1038/35042612.
62. Duan, H.; Heckman, C.A.; Boxer, L.M. Histone Deacetylase Inhibitors Down-Regulate Bcl-2 Expression and Induce Apoptosis in t(14;18) Lymphomas. *Molecular and Cellular Biology* **2005**, *25*, 1608–1619, doi:10.1128/MCB.25.5.1608-1619.2005.
63. Melesina, J.; Simoben, C.V.; Praetorius, L.; Bülbül, E.F.; Robaa, D.; Sippl, W. Strategies To Design Selective Histone Deacetylase Inhibitors. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 1336–1359, doi:10.1002/cmdc.202000934.

64. FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma | The Oncologist | Oxford Academic Available online: <https://academic.oup.com/oncolo/article/12/10/1247/6398870> (accessed on 25 September 2023).
65. FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma | Clinical Cancer Research | American Association for Cancer Research Available online: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/21/12/2666/261198/FDA-Approval-Belinostat-for-the-Treatment-of> (accessed on 25 September 2023).
66. Raedler, L.A. Farydak (Panobinostat): First HDAC Inhibitor Approved for Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *Am Health Drug Benefits* **2016**, *9*, 84–87.
67. Lu, X.; Ning, Z.; Li, Z.; Cao, H.; Wang, X. Development of Chidamide for Peripheral T-Cell Lymphoma, the First Orphan Drug Approved in China. *Intractable & Rare Diseases Research* **2016**, *5*, 185–191, doi:10.5582/iridr.2016.01024.
68. Grant, C.; Rahman, F.; Piekarz, R.; Peer, C.; Frye, R.; Robey, R.W.; Gardner, E.R.; Figg, W.D.; Bates, S.E. Romidepsin: A New Therapy for Cutaneous T-Cell Lymphoma and a Potential Therapy for Solid Tumors. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2010**, *10*, 997–1008, doi:10.1586/era.10.88.
69. Peng, X.; Sun, Z.; Kuang, P.; Chen, J. Recent Progress on HDAC Inhibitors with Dual Targeting Capabilities for Cancer Treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *208*, 112831, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112831.
70. McGuigan, A.; Kelly, P.; Turkington, R.C.; Jones, C.; Coleman, H.G.; McCain, R.S. Pancreatic Cancer: A Review of Clinical Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Outcomes. *World J Gastroenterol* **2018**, *24*, 4846–4861, doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846.
71. Foulkes, W.D.; Smith, I.E.; Reis-Filho, J.S. Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **2010**, *363*, 1938–1948, doi:10.1056/NEJMra1001389.
72. Djokovic, N.; Djuric, A.; Ruzic, D.; Srdic-Rajic, T.; Nikolic, K. Correlating Basal Gene Expression across Chemical Sensitivity Data to Screen for Novel Synergistic Interactors of HDAC Inhibitors in Pancreatic Carcinoma. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 294, doi:10.3390/ph16020294.
73. Wang, X.-X.; Wan, R.-Z.; Liu, Z.-P. Recent Advances in the Discovery of Potent and Selective HDAC6 Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *143*, 1406–1418, doi:10.1016/j.ejmech.2017.10.040.
74. Kaur, S.; Rajoria, P.; Chopra, M. HDAC6: A Unique HDAC Family Member as a Cancer Target. *Cell Oncol.* **2022**, *45*, 779–829, doi:10.1007/s13402-022-00704-6.
75. Zhang, Y.; Kwon, S.; Yamaguchi, T.; Cubizolles, F.; Rousseaux, S.; Kneissel, M.; Cao, C.; Li, N.; Cheng, H.-L.; Chua, K.; et al. Mice Lacking Histone Deacetylase 6 Have Hyperacetylated Tubulin but Are Viable and Develop Normally. *Molecular and Cellular Biology* **2008**, *28*, 1688–1701, doi:10.1128/MCB.01154-06.
76. Miyake, Y.; Keusch, J.J.; Wang, L.; Saito, M.; Hess, D.; Wang, X.; Melancon, B.J.; Helquist, P.; Gut, H.; Matthias, P. Structural Insights into HDAC6 Tubulin Deacetylation and Its Selective Inhibition. *Nat Chem Biol* **2016**, *12*, 748–754, doi:10.1038/nchembio.2140.
77. Hai, Y.; Christianson, D.W. Histone Deacetylase 6 Structure and Molecular Basis of Catalysis and Inhibition. *Nat Chem Biol* **2016**, *12*, 741–747, doi:10.1038/nchembio.2134.

78. Zhang, X.; Yuan, Z.; Zhang, Y.; Yong, S.; Salas-Burgos, A.; Koomen, J.; Olashaw, N.; Parsons, J.T.; Yang, X.-J.; Dent, S.R.; et al. HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Molecular Cell* **2007**, *27*, 197–213, doi:10.1016/j.molcel.2007.05.033.
79. Kaluza, D.; Kroll, J.; Gesierich, S.; Yao, T.; Boon, R.A.; Hergenreider, E.; Tjwa, M.; Rössig, L.; Seto, E.; Augustin, H.G.; et al. Class IIb HDAC6 Regulates Endothelial Cell Migration and Angiogenesis by Deacetylation of Cortactin. *The EMBO Journal* **2011**, *30*, 4142–4156, doi:10.1038/emboj.2011.298.
80. Kerr, E.; Holohan, C.; McLaughlin, K.M.; Majkut, J.; Dolan, S.; Redmond, K.; Riley, J.; McLaughlin, K.; Stasik, I.; Crudden, M.; et al. Identification of an Acetylation-Dependant Ku70/FLIP Complex That Regulates FLIP Expression and HDAC Inhibitor-Induced Apoptosis. *Cell Death Differ* **2012**, *19*, 1317–1327, doi:10.1038/cdd.2012.8.
81. Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Deacetylates Survivin for Its Nuclear Export in Breast Cancer* - Journal of Biological Chemistry Available online: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)48021-4/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)48021-4/fulltext) (accessed on 25 September 2023).
82. Zhu, Q. -y; Wang, Z.; Ji, C.; Cheng, L.; Yang, Y. -l; Ren, J.; Jin, Y. -h; Wang, Q. -j; Gu, X. -j; Bi, Z. -g; et al. C6-Ceramide Synergistically Potentiates the Anti-Tumor Effects of Histone Deacetylase Inhibitors via AKT Dephosphorylation and α -Tubulin Hyperacetylation Both in Vitro and in Vivo. *Cell Death Dis* **2011**, *2*, e117–e117, doi:10.1038/cddis.2010.96.
83. Chen, C.-S.; Weng, S.-C.; Tseng, P.-H.; Lin, H.-P.; Chen, C.-S. Histone Acetylation-Independent Effect of Histone Deacetylase Inhibitors on Akt through the Reshuffling of Protein Phosphatase 1 Complexes *. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 38879–38887, doi:10.1074/jbc.M505733200.
84. Xu, J.; Liu, X.; Jiang, Y.; Chu, L.; Hao, H.; Liua, Z.; Verfaillie, C.; Zweier, J.; Gupta, K.; Liu, Z. MAPK/ERK Signalling Mediates VEGF-Induced Bone Marrow Stem Cell Differentiation into Endothelial Cell. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2008**, *12*, 2395–2406, doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00266.x.
85. Wickström, S.A.; Masoumi, K.C.; Khochbin, S.; Fässler, R.; Massoumi, R. CYLD Negatively Regulates Cell-cycle Progression by Inactivating HDAC6 and Increasing the Levels of Acetylated Tubulin. *The EMBO Journal* **2010**, *29*, 131–144, doi:10.1038/emboj.2009.317.
86. Massoumi, R.; Chmielarska, K.; Hennecke, K.; Pfeifer, A.; Fässler, R. Cyld Inhibits Tumor Cell Proliferation by Blocking Bcl-3-Dependent NF- κ B Signaling. *Cell* **2006**, *125*, 665–677, doi:10.1016/j.cell.2006.03.041.
87. Schoepflin, Z.R.; Shapiro, I.M.; Risbud, M.V. Class I and IIa HDACs Mediate HIF-1 α Stability Through PHD2-Dependent Mechanism, While HDAC6, a Class IIb Member, Promotes HIF-1 α Transcriptional Activity in Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc. *Journal of Bone and Mineral Research* **2016**, *31*, 1287–1299, doi:10.1002/jbmr.2787.
88. Park, J.-H.; Kim, S.-H.; Choi, M.-C.; Lee, J.; Oh, D.-Y.; Im, S.-A.; Bang, Y.-J.; Kim, T.-Y. Class II Histone Deacetylases Play Pivotal Roles in Heat Shock Protein 90-Mediated Proteasomal Degradation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, *368*, 318–322, doi:10.1016/j.bbrc.2008.01.056.
89. Ruan, G.; Kazlauskas, A. Axl Is Essential for VEGF-A-dependent Activation of PI3K/Akt. *The EMBO Journal* **2012**, *31*, 1692–1703, doi:10.1038/emboj.2012.21.

90. Terranova-Barberio, M.; Thomas, S.; Ali, N.; Pawlowska, N.; Park, J.; Krings, G.; Rosenblum, M.D.; Budillon, A.; Munster, P.N. HDAC Inhibition Potentiates Immunotherapy in Triple Negative Breast Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 114156–114172, doi:10.18632/oncotarget.23169.
91. Zitvogel, L.; and Kroemer, G. Targeting PD-1/PD-L1 Interactions for Cancer Immunotherapy. *OncoImmunology* **2012**, *1*, 1223–1225, doi:10.4161/onci.21335.
92. Iwai, Y.; Ishida, M.; Tanaka, Y.; Okazaki, T.; Honjo, T.; Minato, N. Involvement of PD-L1 on Tumor Cells in the Escape from Host Immune System and Tumor Immunotherapy by PD-L1 Blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 12293–12297, doi:10.1073/pnas.192461099.
93. Kumar, S.; Chatterjee, M.; Ghosh, P.; Ganguly, K.K.; Basu, M.; Ghosh, M.K. Targeting PD-1/PD-L1 in Cancer Immunotherapy: An Effective Strategy for Treatment of Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) Patients. *Genes & Diseases* **2023**, *10*, 1318–1350, doi:10.1016/j.gendis.2022.07.024.
94. Biersack, B.; Nitzsche, B.; Höpfner, M. Immunomodulatory Properties of HDAC6 Inhibitors in Cancer Diseases: New Chances for Sophisticated Drug Design and Treatment Optimization. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2024**, *154*, 286–294, doi:10.1016/j.semcdb.2022.09.009.
95. Banik, D.; Noonepalle, S.; Hadley, M.; Palmer, E.; Gracia-Hernandez, M.; Zevallos-Delgado, C.; Manhas, N.; Simonyan, H.; Young, C.N.; Popratiloff, A.; et al. HDAC6 Plays a Noncanonical Role in the Regulation of Antitumor Immune Responses, Dissemination, and Invasiveness of Breast Cancer. *Cancer Research* **2020**, *80*, 3649–3662, doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-3738.
96. Amengual, J.E.; Lue, J.K.; Ma, H.; Lichtenstein, R.; Shah, B.; Cremers, S.; Jones, S.; Sawas, A. First-in-Class Selective HDAC6 Inhibitor (ACY-1215) Has a Highly Favorable Safety Profile in Patients with Relapsed and Refractory Lymphoma. *Oncologist* **2021**, *26*, 184–e366, doi:10.1002/onco.13673.
97. Columbia University Multi-Center Phase IB Trial of ACY-1215 (Ricolinostat) Combined With Nab-Paclitaxel in Unresectable or Metastatic Breast Cancer; clinicaltrials.gov, 2021;
98. Celgene A Phase Ib Study of the Selective HDAC6 Inhibitor ACY-241 in Combination With Ipilimumab and Nivolumab in Patients With Unresectable Stage III or Stage IV Melanoma; clinicaltrials.gov, 2017;
99. Celgene A Phase Ib Study of the Selective HDAC6 Inhibitor ACY-241 in Combination With Nivolumab in Patients With Unresectable Non-Small Cell Lung Cancer; clinicaltrials.gov, 2023;
100. Depetter, Y.; Geurs, S.; De Vreese, R.; Goethals, S.; Vandoorn, E.; Laevens, A.; Steenbrugge, J.; Meyer, E.; de Tullio, P.; Bracke, M.; et al. Selective Pharmacological Inhibitors of HDAC6 Reveal Biochemical Activity but Functional Tolerance in Cancer Models. *International Journal of Cancer* **2019**, *145*, 735–747, doi:10.1002/ijc.32169.
101. Beljkas, M.; Ilic, A.; Cebzan, A.; Radovic, B.; Djokovic, N.; Ruzic, D.; Nikolic, K.; Oljatic, S. Targeting Histone Deacetylases 6 in Dual-Target Therapy of Cancer. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2581, doi:10.3390/pharmaceutics15112581.
102. Wozniak, M.B.; Villuendas, R.; Bischoff, J.R.; Aparicio, C.B.; Martínez Leal, J.F.; de La Cueva, P.; Rodriguez, M.E.; Herreros, B.; Martin-Perez, D.; Longo, M.I.; et al. Vorinostat Interferes with the Signaling Transduction Pathway of T-Cell Receptor and Synergizes with Phosphoinositide-3 Kinase Inhibitors in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Haematologica* **2010**, *95*, 613–621, doi:10.3324/haematol.2009.013870.

103. Dawson, J.C.; Serrels, B.; Byron, A.; Muir, M.T.; Makda, A.; García-Muñoz, A.; von Kriegsheim, A.; Lietha, D.; Carragher, N.O.; Frame, M.C. A Synergistic Anticancer FAK and HDAC Inhibitor Combination Discovered by a Novel Chemical–Genetic High-Content Phenotypic Screen. *Molecular Cancer Therapeutics* **2020**, *19*, 637–649, doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0330.
104. Yoo, J.; Jeon, Y.H.; Lee, D.H.; Kim, G.W.; Lee, S.W.; Kim, S.Y.; Park, J.; Kwon, S.H. HDAC6-Selective Inhibitors Enhance Anticancer Effects of Paclitaxel in Ovarian Cancer Cells. *Oncology Letters* **2021**, *21*, 1–1, doi:10.3892/ol.2021.12462.
105. Makarević, J.; Tawanaie, N.; Juengel, E.; Reiter, M.; Mani, J.; Tsaur, I.; Bartsch, G.; Haferkamp, A.; Blaheta, R.A. Cross-Communication between Histone H3 and H4 Acetylation and Akt-mTOR Signalling in Prostate Cancer Cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2014**, *18*, 1460–1466, doi:10.1111/jcmm.12299.
106. Carew, J.S.; Espitia, C.M.; Zhao, W.; Visconte, V.; Anwer, F.; Kelly, K.R.; Nawrocki, S.T. Rational Cotargeting of HDAC6 and BET Proteins Yields Synergistic Antimyeloma Activity. *Blood Advances* **2019**, *3*, 1318–1329, doi:10.1182/bloodadvances.2018026484.
107. Gibbs, A.; Schwartzman, J.; Deng, V.; Alumkal, J. Sulforaphane Destabilizes the Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells by Inactivating Histone Deacetylase 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 16663–16668, doi:10.1073/pnas.0908908106.
108. Liu, P.; Xiao, J.; Wang, Y.; Song, X.; Huang, L.; Ren, Z.; Kitazato, K.; Wang, Y. Posttranslational Modification and beyond: Interplay between Histone Deacetylase 6 and Heat-Shock Protein 90. *Molecular Medicine* **2021**, *27*, 110, doi:10.1186/s10020-021-00375-3.
109. Mikami, D.; Kobayashi, M.; Uwada, J.; Yazawa, T.; Kamiyama, K.; Nishimori, K.; Nishikawa, Y.; Nishikawa, S.; Yokoi, S.; Taniguchi, T.; et al. β -Hydroxybutyrate Enhances the Cytotoxic Effect of Cisplatin via the Inhibition of HDAC/Survivin Axis in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Journal of Pharmacological Sciences* **2020**, *142*, 1–8, doi:10.1016/j.jphs.2019.10.007.
110. Kim, Y.; Kim, H.; Jeoung, D. Tubulin Beta3 Serves as a Target of HDAC3 and Mediates Resistance to Microtubule-Targeting Drugs. *Mol Cells* **2015**, *38*, 705–714, doi:10.14348/molcells.2015.0086.
111. Vanaja, G.R.; Ramulu, H.G.; Kalle, A.M. Overexpressed HDAC8 in Cervical Cancer Cells Shows Functional Redundancy of Tubulin Deacetylation with HDAC6. *Cell Communication and Signaling* **2018**, *16*, 20, doi:10.1186/s12964-018-0231-4.
112. Li, J.; Chen, S.; Cleary, R.A.; Wang, R.; Gannon, O.J.; Seto, E.; Tang, D.D. Histone Deacetylase 8 Regulates Cortactin Deacetylation and Contraction in Smooth Muscle Tissues. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2014**, *307*, C288–C295, doi:10.1152/ajpcell.00102.2014.
113. Duan, Y.-C.; Ma, Y.-C.; Qin, W.-P.; Ding, L.-N.; Zheng, Y.-C.; Zhu, Y.-L.; Zhai, X.-Y.; Yang, J.; Ma, C.-Y.; Guan, Y.-Y. Design and Synthesis of Tranlylcypromine Derivatives as Novel LSD1/HDACs Dual Inhibitors for Cancer Treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *140*, 392–402, doi:10.1016/j.ejmech.2017.09.038.
114. Rodrigues, D.A.; Guerra, F.S.; Sagrillo, F.S.; de Sena M. Pinheiro, P.; Alves, M.A.; Thota, S.; Chaves, L.S.; Sant’Anna, C.M.R.; Fernandes, P.D.; Fraga, C.A.M. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of First-in-Class Multitarget N-Acylhydrazone Derivatives as Selective HDAC6/8 and PI3K α Inhibitors. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 539–551, doi:10.1002/cmdc.201900716.

115. Zhang, Y.; Gao, J.; Wu, J.; Liu, S.; Zhang, X.; Lv, X. Discovery of (S)-N1-(Thiazol-2-Yl) Pyrrolidine-1,2-Dicarboxamide Derivatives Targeting PI3K α /HDAC6 for the Treatment of Cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2023**, *94*, 129462, doi:10.1016/j.bmcl.2023.129462.
116. Li, Z.; Zhao, C.; He, G.; Wang, Y.; Wang, Y.; Ma, X. Identification of PI3K/HDAC Dual-Targeted Inhibitors with Subtype Selectivity as Potential Therapeutic Agents against Solid Tumors: Building HDAC6 Potency in a Quinazolinone-Based PI3K δ -Selective Template. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2022**, *73*, 117028, doi:10.1016/j.bmc.2022.117028.
117. Yao, D.; Jiang, J.; Zhang, H.; Huang, Y.; Huang, J.; Wang, J. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Dual mTOR/HDAC6 Inhibitors in MDA-MB-231 Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2021**, *47*, 128204, doi:10.1016/j.bmcl.2021.128204.
118. Chen, J.; Li, Y.; Zhang, J.; Zhang, M.; Wei, A.; Liu, H.; Xie, Z.; Ren, W.; Duan, W.; Zhang, Z.; et al. Discovery of Selective HDAC/BRD4 Dual Inhibitors as Epigenetic Probes. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *209*, 112868, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112868.
119. Chen, L.; Meng, S.; Wang, H.; Bali, P.; Bai, W.; Li, B.; Atadja, P.; Bhalla, K.N.; Wu, J. Chemical Ablation of Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells by the Histone Deacetylase Inhibitor LAQ824. *Molecular Cancer Therapeutics* **2005**, *4*, 1311–1319, doi:10.1158/1535-7163.MCT-04-0287.
120. Zhou, M.; Zheng, H.; Li, Y.; Huang, H.; Min, X.; Dai, S.; Zhou, W.; Chen, Z.; Xu, G.; Chen, Y. Discovery of a Novel AR/HDAC6 Dual Inhibitor for Prostate Cancer Treatment. *Aging (Albany NY)* **2021**, *13*, 6982–6998, doi:10.18632/aging.202554.
121. Ojha, R.; Huang, H.-L.; HuangFu, W.-C.; Wu, Y.-W.; Nepali, K.; Lai, M.-J.; Su, C.-J.; Sung, T.-Y.; Chen, Y.-L.; Pan, S.-L.; et al. 1-Aroylindoline-Hydroxamic Acids as Anticancer Agents, Inhibitors of HSP90 and HDAC. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *150*, 667–677, doi:10.1016/j.ejmech.2018.03.006.
122. Ojha, R.; Nepali, K.; Chen, C.-H.; Chuang, K.-H.; Wu, T.-Y.; Lin, T.E.; Hsu, K.-C.; Chao, M.-W.; Lai, M.-J.; Lin, M.-H.; et al. Isoindoline Scaffold-Based Dual Inhibitors of HDAC6 and HSP90 Suppressing the Growth of Lung Cancer in Vitro and in Vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *190*, 112086, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112086.
123. Wu, T.-Y.; Chen, M.; Chen, I.-C.; Chen, Y.-J.; Chen, C.-Y.; Wang, C.-H.; Cheng, J.-J.; Nepali, K.; Chuang, K.-H.; Liou, J.-P. Rational Design of Synthetically Tractable HDAC6/HSP90 Dual Inhibitors to Destroy Immune-Suppressive Tumor Microenvironment. *Journal of Advanced Research* **2023**, *46*, 159–171, doi:10.1016/j.jare.2022.06.009.
124. Lee, H.-Y.; Lee, J.-F.; Kumar, S.; Wu, Y.-W.; HuangFu, W.-C.; Lai, M.-J.; Li, Y.-H.; Huang, H.-L.; Kuo, F.-C.; Hsiao, C.-J.; et al. 3-Aroylindoles Display Antitumor Activity in Vitro and in Vivo: Effects of N1-Substituents on Biological Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *125*, 1268–1278, doi:10.1016/j.ejmech.2016.11.033.
125. Wu, Y.-W.; Hsu, K.-C.; Lee, H.-Y.; Huang, T.-C.; Lin, T.E.; Chen, Y.-L.; Sung, T.-Y.; Liou, J.-P.; Hwang-Verslues, W.W.; Pan, S.-L.; et al. A Novel Dual HDAC6 and Tubulin Inhibitor, MPT0B451, Displays Anti-Tumor Ability in Human Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, *9*.
126. Kumar, K.; Das, R.; Thapa, B.; Rakhecha, B.; Srivastava, S.; Savita, K.; Israr, M.; Chanda, D.; Banerjee, D.; Shanker, K.; et al. Dual Targeted 2-Benzylideneindanone Pendant Hydroxamic Acid Group

Exhibits Selective HDAC6 Inhibition along with Tubulin Stabilization Effect. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2023**, *86*, 117300, doi:10.1016/j.bmc.2023.117300.

127. Wang, F.; Zheng, L.; Yi, Y.; Yang, Z.; Qiu, Q.; Wang, X.; Yan, W.; Bai, P.; Yang, J.; Li, D.; et al. SKLB-23bb, A HDAC6-Selective Inhibitor, Exhibits Superior and Broad-Spectrum Antitumor Activity via Additionally Targeting Microtubules. *Molecular Cancer Therapeutics* **2018**, *17*, 763–775, doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0332.

128. Naveen Sadhu, M.; Sivanandhan, D.; Gajendran, C.; Tantry, S.; Dewang, P.; Murugan, K.; Chickamunivenkatappa, S.; Zainuddin, M.; Nair, S.; Vaithilingam, K.; et al. Novel Dual LSD1/HDAC6 Inhibitors for the Treatment of Multiple Myeloma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2021**, *34*, 127763, doi:10.1016/j.bmcl.2020.127763.

129. Bulut, I.; Lee, A.; Cevatemre, B.; Ruzic, D.; Belle, R.; Kawamura, A.; Gul, S.; Nikolic, K.; Ganesan, A.; Acilan, C. Dual LSD1 and HDAC6 Inhibition Induces Doxorubicin Sensitivity in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Cancers* **2022**, *14*, 6014, doi:10.3390/cancers14236014.

130. Chen, J.; Sang, Z.; Jiang, Y.; Yang, C.; He, L. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Quinazoline Derivatives as Dual HDAC1 and HDAC6 Inhibitors for the Treatment of Cancer. *Chemical Biology & Drug Design* **2019**, *93*, 232–241, doi:10.1111/cbdd.13405.

131. Cho, M.; Choi, E.; Yang, J.S.; Lee, C.; Seo, J.J.; Kim, B.S.; Oh, S.J.; Kim, H.M.; Lee, K.; Park, S.-K.; et al. Discovery of Pyridone-Based Histone Deacetylase Inhibitors: Approaches for Metabolic Stability. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 272–279, doi:10.1002/cmdc.201200529.

132. Miao, J.-F.; Peng, Y.-F.; Chen, S.; Gao, W.-J.; Yang, Q.-X.; Zhu, P.; Guo, J.; Tao, J.; Luo, L.; Zhang, Y.; et al. A Novel Harmine Derivative, N-(4-(Hydroxycarbamoyl)Benzyl)-1-(4-Methoxyphenyl)-9H-Pyrido[3,4-b]Indole-3-Carboxamide (HBC), as Histone Deacetylase Inhibitor: In Vitro Antiproliferation, Apoptosis Induction, Cell Cycle Arrest, and Antimetastatic Effects. *European Journal of Pharmacology* **2018**, *824*, 78–88, doi:10.1016/j.ejphar.2018.02.004.

133. Ling, Y.; Li, Y.; Zhu, R.; Qian, J.; Liu, J.; Gao, W.; Meng, C.; Miao, J.; Xiong, B.; Qiu, X.; et al. Hydroxamic Acid Derivatives of β -Carboline/Hydroxycinnamic Acid Hybrids Inducing Apoptosis and Autophagy through the PI3K/Akt/mTOR Pathways. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 1442–1450, doi:10.1021/acs.jnatprod.8b00843.

134. Miao, J.; Meng, C.; Wu, H.; Shan, W.; Wang, H.; Ling, C.; Zhang, J.; Yang, T. Novel Hybrid CHC from β -Carboline and N-Hydroxyacrylamide Overcomes Drug-Resistant Hepatocellular Carcinoma by Promoting Apoptosis, DNA Damage, and Cell Cycle Arrest. *Frontiers in Pharmacology* **2021**, *11*.

135. Ling, Y.; Gao, W.-J.; Ling, C.; Liu, J.; Meng, C.; Qian, J.; Liu, S.; Gan, H.; Wu, H.; Tao, J.; et al. β -Carboline and N-Hydroxycinnamamide Hybrids as Anticancer Agents for Drug-Resistant Hepatocellular Carcinoma. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *168*, 515–526, doi:10.1016/j.ejmech.2019.02.054.

136. Soumyanarayanan, U.; Ramanujulu, P.M.; Mustafa, N.; Haider, S.; Fang Nee, A.H.; Tong, J.X.; Tan, K.S.W.; Chng, W.J.; Dymock, B.W. Discovery of a Potent Histone Deacetylase (HDAC) 3/6 Selective Dual Inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *184*, 111755, doi:10.1016/j.ejmech.2019.111755.

137. Olson, D.E.; Wagner, F.F.; Kaya, T.; Gale, J.P.; Aidoud, N.; Davoine, E.L.; Lazzaro, F.; Weïwer, M.; Zhang, Y.-L.; Holson, E.B. Discovery of the First Histone Deacetylase 6/8 Dual Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4816–4820, doi:10.1021/jm400390r.

138. Rodrigues, D.A.; Ferreira-Silva, G.À.; Ferreira, A.C.S.; Fernandes, R.A.; Kwee, J.K.; Sant'Anna, C.M.R.; Ionta, M.; Fraga, C.A.M. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel N-Acylhydrazone Derivatives as Potent Histone Deacetylase 6/8 Dual Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 655–670, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01525.
139. Tang, G.; Wong, J.C.; Zhang, W.; Wang, Z.; Zhang, N.; Peng, Z.; Zhang, Z.; Rong, Y.; Li, S.; Zhang, M.; et al. Identification of a Novel Aminotetralin Class of HDAC6 and HDAC8 Selective Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8026–8034, doi:10.1021/jm5008962.
140. Negmeldin, A.T.; Knoff, J.R.; Pflum, M.K.H. The Structural Requirements of Histone Deacetylase Inhibitors: C4-Modified SAHA Analogs Display Dual HDAC6/HDAC8 Selectivity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *143*, 1790–1806, doi:10.1016/j.ejmech.2017.10.076.
141. Federico, S.; Khan, T.; Fontana, A.; Brogi, S.; Benedetti, R.; Sarno, F.; Carullo, G.; Pezzotta, A.; Saraswati, A.P.; Passaro, E.; et al. Azetidin-2-One-Based Small Molecules as Dual hHDAC6/HDAC8 Inhibitors: Investigation of Their Mechanism of Action and Impact of Dual Inhibition Profile on Cell Viability. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, *238*, 114409, doi:10.1016/j.ejmech.2022.114409.
142. Zhang, J.; Chen, X.; Chen, G.; Wang, H.; Jia, L.; Hao, Y.; Yao, D. Identification of a Novel PAK1/HDAC6 Dual Inhibitor ZMF-23 That Triggers Tubulin-Stathmin Regulated Cell Death in Triple Negative Breast Cancer. *International Journal of Biological Macromolecules* **2023**, *251*, 126348, doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.126348.
143. Song, J.; Liu, X.; Zhang, Y.-F.; Tian, X.-Y.; Deng, M.-Y.; Huang, C.-Z.; Zhang, S.-Y. The Dual FAK-HDAC Inhibitor MY-1259 Displays Potent Activities in Gastric Cancers in Vitro and in Vivo. *Bioorganic Chemistry* **2023**, *131*, 106328, doi:10.1016/j.bioorg.2022.106328.
144. Xiang, X.-S.; Li, P.-C.; Wang, W.-Q.; Liu, L. Histone Deacetylases: A Novel Class of Therapeutic Targets for Pancreatic Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2022**, *1877*, 188676, doi:10.1016/j.bbcan.2022.188676.
145. Mao, C.; Fang, J.; Zou, S.; Huang, Y.; Chen, X.; Ding, X.; Fang, Z.; Zhang, N.; Lou, Y.; Chen, Z.; et al. Discovery of the First-in-Class Dual-Target ROCK/HDAC Inhibitor with Potent Antitumor Efficacy in Vivo That Trigger Antitumor Immunity. *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 20619–20638, doi:10.1021/acs.jmedchem.4c02183.
146. Morgan-Fisher, M.; Wewer, U.M.; Yoneda, A. Regulation of ROCK Activity in Cancer. *J Histochem Cytochem.* **2013**, *61*, 185–198, doi:10.1369/0022155412470834.
147. Feng, Y.; LoGrasso, P.V.; Defert, O.; Li, R. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2269–2300, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00683.
148. Wei, L.; Surma, M.; Shi, S.; Lambert-Cheatham, N.; Shi, J. Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2016**, *64*, 259–278, doi:10.1007/s00005-015-0382-6.
149. Lee, M.-H.; Kundu, J.K.; Chae, J.-I.; Shim, J.-H. Targeting ROCK/LIMK/Cofilin Signaling Pathway in Cancer. *Arch. Pharm. Res.* **2019**, *42*, 481–491, doi:10.1007/s12272-019-01153-w.
150. Julian, L.; Olson, M.F. Rho-Associated Coiled-Coil Containing Kinases (ROCK): Structure, Regulation, and Functions. *Small GTPases* **2014**, *5*, e29846, doi:10.4161/sgtp.29846.

151. Amano, M.; Chihara, K.; Nakamura, N.; Kaneko, T.; Matsuura, Y.; Kaibuchi, K. The COOH Terminus of Rho-Kinase Negatively Regulates Rho-Kinase Activity *. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 32418–32424, doi:10.1074/jbc.274.45.32418.
152. Jaffe, A.B.; Hall, A. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2005**, *21*, 247–269, doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721.
153. RHO GTPases in Cancer: Known Facts, Open Questions, and Therapeutic Challenges | Biochemical Society Transactions | Portland Press Available online: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article-abstract/46/3/741/67418/RHO-GTPases-in-cancer-known-facts-open-questions> (accessed on 5 August 2024).
154. Coleman, M.L.; Sahai, E.A.; Yeo, M.; Bosch, M.; Dewar, A.; Olson, M.F. Membrane Blebbing during Apoptosis Results from Caspase-Mediated Activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* **2001**, *3*, 339–345, doi:10.1038/35070009.
155. Amano, M.; Ito, M.; Kimura, K.; Fukata, Y.; Chihara, K.; Nakano, T.; Matsuura, Y.; Kaibuchi, K. Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase) *. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 20246–20249, doi:10.1074/jbc.271.34.20246.
156. Maekawa, M.; Ishizaki, T.; Boku, S.; Watanabe, N.; Fujita, A.; Iwamatsu, A.; Obinata, T.; Ohashi, K.; Mizuno, K.; Narumiya, S. Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-Kinase. *Science* **1999**, *285*, 895–898, doi:10.1126/science.285.5429.895.
157. Barcelo, J.; Samain, R.; Sanz-Moreno, V. Preclinical to Clinical Utility of ROCK Inhibitors in Cancer. *Trends in Cancer* **2023**, *9*, 250–263, doi:10.1016/j.trecan.2022.12.001.
158. Croft, D.R.; Olson, M.F. The Rho GTPase Effector ROCK Regulates Cyclin A, Cyclin D1, and p27Kip1 Levels by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology* **2006**, *26*, 4612–4627, doi:10.1128/MCB.02061-05.
159. Wang, H.-F.; Takenaka, K.; Nakanishi, A.; Miki, Y. BRCA2 and Nucleophosmin Coregulate Centrosome Amplification and Form a Complex with the Rho Effector Kinase ROCK2. *Cancer Research* **2011**, *71*, 68–77, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0030.
160. Di Savino, A.; Panuzzo, C.; Rocca, S.; Familiari, U.; Piazza, R.; Crivellaro, S.; Carrà, G.; Ferretti, R.; Fusella, F.; Giugliano, E.; et al. Morgana Acts as an Oncosuppressor in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **2015**, *125*, 2245–2253, doi:10.1182/blood-2014-05-575001.
161. Zhang, C.; Zhang, S.; Zhang, Z.; He, J.; Xu, Y.; Liu, S. ROCK Has a Crucial Role in Regulating Prostate Tumor Growth through Interaction with C-Myc. *Oncogene* **2014**, *33*, 5582–5591, doi:10.1038/onc.2013.505.
162. Liu, S.; Goldstein, R.H.; Scepansky, E.M.; Rosenblatt, M. Inhibition of Rho-Associated Kinase Signaling Prevents Breast Cancer Metastasis to Human Bone. *Cancer Research* **2009**, *69*, 8742–8751, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1541.
163. Chen, W.; Mao, K.; Liu, Z.; Dinh-Xuan, A.T. The Role of the RhoA/Rho Kinase Pathway in Anti-angiogenesis and Its Potential Value in Prostate Cancer (Review). *Oncology Letters* **2014**, *8*, 1907–1911, doi:10.3892/ol.2014.2471.
164. Sun, H.; Breslin, J.W.; Zhu, J.; Yuan, S.Y.; Wu, M.H. Rho and ROCK Signaling in VEGF-Induced Microvascular Endothelial Hyperpermeability. *Microcirculation* **2006**, *13*, 237–247, doi:10.1080/10739680600556944.

165. Katoh, K.; Kano, Y.; Noda, Y. Rho-Associated Kinase-Dependent Contraction of Stress Fibres and the Organization of Focal Adhesions. *Journal of The Royal Society Interface* **2010**, *8*, 305–311, doi:10.1098/rsif.2010.0419.
166. Chrzanowska-Wodnicka, M.; Burridge, K. Rho-Stimulated Contractility Drives the Formation of Stress Fibers and Focal Adhesions. *The Journal of cell biology* **1996**, *133*, 1403–1415, doi:10.1083/jcb.133.6.1403.
167. Katoh, K.; Kano, Y.; Amano, M.; Kaibuchi, K.; Fujiwara, K. Stress Fiber Organization Regulated by MLCK and Rho-Kinase in Cultured Human Fibroblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2001**, *280*, C1669–C1679, doi:10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1669.
168. Sahai, E.; Marshall, C.J. Differing Modes of Tumour Cell Invasion Have Distinct Requirements for Rho/ROCK Signalling and Extracellular Proteolysis. *Nat Cell Biol* **2003**, *5*, 711–719, doi:10.1038/ncb1019.
169. Wyckoff, J.B.; Pinner, S.E.; Gschmeissner, S.; Condeelis, J.S.; Sahai, E. ROCK- and Myosin-Dependent Matrix Deformation Enables Protease-Independent Tumor-Cell Invasion In Vivo. *Current Biology* **2006**, *16*, 1515–1523, doi:10.1016/j.cub.2006.05.065.
170. Shao, J.-Z.; Qi, Y.; Du, S.-S.; Du, W.-W.; Li, F.-Z.; Zhang, F.-Y. In Vitro Inhibition of Proliferation, Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Lens Epithelial Cells by Fasudil. *Int J Ophthalmol* **2018**, *11*, 1253–1257, doi:10.18240/ijo.2018.08.02.
171. Zhu, F.; Zhang, Z.; Wu, G.; Li, Z.; Zhang, R.; Ren, J.; Nong, L. Rho Kinase Inhibitor Fasudil Suppresses Migration and Invasion Through Down-Regulating the Expression of VEGF in Lung Cancer Cell Line A549. *Med Oncol* **2011**, *28*, 565–571, doi:10.1007/s12032-010-9468-5.
172. Meng, F.; Su, Y.; Xu, B. Rho-Associated Protein Kinase-Dependent Moesin Phosphorylation Is Required for PD-L1 Stabilization in Breast Cancer. *Molecular Oncology* **2020**, *14*, 2701–2712, doi:10.1002/1878-0261.12804.
173. Shi, J.; Wu, X.; Surma, M.; Vemula, S.; Zhang, L.; Yang, Y.; Kapur, R.; Wei, L. Distinct Roles for ROCK1 and ROCK2 in the Regulation of Cell Detachment. *Cell Death Dis* **2013**, *4*, e483–e483, doi:10.1038/cddis.2013.10.
174. Newell-Litwa, K.A.; Badoual, M.; Asmussen, H.; Patel, H.; Whitmore, L.; Horwitz, A.R. ROCK1 and 2 Differentially Regulate Actomyosin Organization to Drive Cell and Synaptic Polarity. *J Cell Biol* **2015**, *210*, 225–242, doi:10.1083/jcb.201504046.
175. Yin, L.; Morishige, K.; Takahashi, T.; Hashimoto, K.; Ogata, S.; Tsutsumi, S.; Takata, K.; Ohta, T.; Kawagoe, J.; Takahashi, K.; et al. Fasudil Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis in Vitro and in Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* **2007**, *6*, 1517–1525, doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0689.
176. Ying, H.; Biroc, S.L.; Li, W.; Alicke, B.; Xuan, J.-A.; Pagila, R.; Ohashi, Y.; Okada, T.; Kamata, Y.; Dinter, H. The Rho Kinase Inhibitor Fasudil Inhibits Tumor Progression in Human and Rat Tumor Models. *Molecular Cancer Therapeutics* **2006**, *5*, 2158–2164, doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0440.
177. Whatcott, C.J.; Ng, S.; Barrett, M.T.; Hostetter, G.; Hoff, D.D.V.; Han, H. Inhibition of ROCK1 Kinase Modulates Both Tumor Cells and Stromal Fibroblasts in Pancreatic Cancer. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0183871, doi:10.1371/journal.pone.0183871.

178. Vennin, C.; Rath, N.; Pajic, M.; Olson, M.F.; Timpson, P. Targeting ROCK Activity to Disrupt and Prime Pancreatic Cancer for Chemotherapy. *Small GTPases* **2020**, *11*, 45–52, doi:10.1080/21541248.2017.1345712.
179. Vennin, C.; Chin, V.T.; Warren, S.C.; Lucas, M.C.; Herrmann, D.; Magenau, A.; Melenec, P.; Walters, S.N.; del Monte-Nieto, G.; Conway, J.R.W.; et al. Transient Tissue Priming via ROCK Inhibition Uncouples Pancreatic Cancer Progression, Sensitivity to Chemotherapy, and Metastasis. *Science Translational Medicine* **2017**, *9*, eaai8504, doi:10.1126/scitranslmed.aai8504.
180. Meng, F.; Su, Y.; Xu, B. Rho-associated Protein Kinase-dependent Moesin Phosphorylation Is Required for PD-L1 Stabilization in Breast Cancer. *Molecular Oncology* **2020**, *14*, 2701–2712, doi:10.1002/1878-0261.12804.
181. Iskit, S.; Lieftink, C.; Halonen, P.; Shahrabi, A.; Possik, P.A.; Beijersbergen, R.L.; Peeper, D.S. Integrated in Vivo Genetic and Pharmacologic Screening Identifies Co-Inhibition of EGRF and ROCK as a Potential Treatment Regimen for Triple-Negative Breast Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 42859–42872, doi:10.18632/oncotarget.10230.
182. McLeod, R.; Kumar, R.; Papadatos-Pastos, D.; Mateo, J.; Brown, J.S.; Garces, A.H.I.; Ruddie, R.; Decordova, S.; Jueliger, S.; Ferraldeschi, R.; et al. First-in-Human Study of AT13148, a Dual ROCK-AKT Inhibitor in Patients with Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* **2020**, *26*, 4777–4784, doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-0700.
183. Mertsch, S.; Krämer, O.H. The Interplay between Histone Deacetylases and Rho Kinases Is Important for Cancer and Neurodegeneration. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **2017**, *37*, 29–45, doi:10.1016/j.cytogfr.2017.05.006.
184. Nam, G.-H.; Lee, E.J.; Kim, Y.K.; Hong, Y.; Choi, Y.; Ryu, M.-J.; Woo, J.; Cho, Y.; Ahn, D.J.; Yang, Y.; et al. Combined Rho-Kinase Inhibition and Immunogenic Cell Death Triggers and Propagates Immunity against Cancer. *Nat Commun* **2018**, *9*, 2165, doi:10.1038/s41467-018-04607-9.
185. Yin, Y.; Guan, X.; Li, G.; Chen, C.; Duan, Y.; Yu, Z. The HDAC Inhibitor HFY-4A Improves TUSC2 Transcription to Induce Immunogenic Cell Death in Breast Cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2023**, *478*, 116698, doi:10.1016/j.taap.2023.116698.
186. DiMasi, J.A.; Grabowski, H.G.; Hansen, R.W. Innovation in the Pharmaceutical Industry: New Estimates of R&D Costs. *Journal of Health Economics* **2016**, *47*, 20–33, doi:10.1016/j.jhealeco.2016.01.012.
187. Zhong, F.; Xing, J.; Li, X.; Liu, X.; Fu, Z.; Xiong, Z.; Lu, D.; Wu, X.; Zhao, J.; Tan, X.; et al. Artificial Intelligence in Drug Design. *Sci. China Life Sci.* **2018**, *61*, 1191–1204, doi:10.1007/s11427-018-9342-2.
188. Gurung, A.B.; Ali, M.A.; Lee, J.; Farah, M.A.; Al-Anazi, K.M. An Updated Review of Computer-Aided Drug Design and Its Application to COVID-19. *BioMed Research International* **2021**, *2021*, 8853056, doi:10.1155/2021/8853056.
189. Macalino, S.J.Y.; Gosu, V.; Hong, S.; Choi, S. Role of Computer-Aided Drug Design in Modern Drug Discovery. *Arch. Pharm. Res.* **2015**, *38*, 1686–1701, doi:10.1007/s12272-015-0640-5.
190. Iwaloye, O.; Ottu, P.O.; Olawale, F.; Babalola, O.O.; Elekofehinti, O.O.; Kikiowo, B.; Adegboyega, A.E.; Ogbonna, H.N.; Adeboboye, C.F.; Folorunso, I.M.; et al. Computer-Aided Drug

Design in Anti-Cancer Drug Discovery: What Have We Learnt and What Is the Way Forward? *Informatics in Medicine Unlocked* **2023**, *41*, 101332, doi:10.1016/j.imu.2023.101332.

191. Dai, J.; Zhou, Z.; Zhao, Y.; Kong, F.; Zhai, Z.; Zhu, Z.; Cai, J.; Huang, S.; Xu, Y.; Sun, T. Combined Usage of Ligand- and Structure-Based Virtual Screening in the Artificial Intelligence Era. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2025**, *283*, 117162, doi:10.1016/j.ejmech.2024.117162.

192. Sabe, V.T.; Ntombela, T.; Jhamba, L.A.; Maguire, G.E.M.; Govender, T.; Naicker, T.; Kruger, H.G. Current Trends in Computer Aided Drug Design and a Highlight of Drugs Discovered via Computational Techniques: A Review. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *224*, 113705, doi:10.1016/j.ejmech.2021.113705.

193. Druker, B.J.; Lydon, N.B. Lessons Learned from the Development of an Abl Tyrosine Kinase Inhibitor for Chronic Myelogenous Leukemia. *J Clin Invest* **2000**, *105*, 3–7, doi:10.1172/JCI9083.

194. Ward, W.H.J.; Cook, P.N.; Slater, A.M.; Davies, D.H.; Holdgate, G.A.; Green, L.R. Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase: Investigation of Catalytic Mechanism, Structure-Based Searching and Discovery of a Potent Inhibitor. *Biochemical Pharmacology* **1994**, *48*, 659–666, doi:10.1016/0006-2952(94)90042-6.

195. Lackey, K. Lessons from the Drug Discovery of Lapatinib, a Dual ErbB1/2 Tyrosine Kinase Inhibitor. *CTMC* **2006**, *6*, 435–460, doi:10.2174/156802606776743156.

196. Cui, J.J.; Tran-Dubé, M.; Shen, H.; Nambu, M.; Kung, P.-P.; Pairish, M.; Jia, L.; Meng, J.; Funk, L.; Botrous, I.; et al. Structure Based Drug Design of Crizotinib (PF-02341066), a Potent and Selective Dual Inhibitor of Mesenchymal–Epithelial Transition Factor (c-MET) Kinase and Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK). *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6342–6363, doi:10.1021/jm2007613.

197. Scott, W.J.; Hentemann, M.F.; Rowley, R.B.; Bull, C.O.; Jenkins, S.; Bullion, A.M.; Johnson, J.; Redman, A.; Robbins, A.H.; Esler, W.; et al. Discovery and SAR of Novel 2,3-Dihydroimidazo[1,2-c]Quinazoline PI3K Inhibitors: Identification of Copanlisib (BAY 80-6946). *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1517–1530, doi:10.1002/cmdc.201600148.

198. Discovery, Optimization, and Evaluation of Potent and Highly Selective PI3K γ –PI3K δ Dual Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *62*, 4936–4948, doi:10.1021/acs.jmedchem.8b02014.

199. Popovici-Muller, J.; Lemieux, R.M.; Artin, E.; Saunders, J.O.; Salituro, F.G.; Travins, J.; Cianchetta, G.; Cai, Z.; Zhou, D.; Cui, D.; et al. Discovery of AG-120 (Ivosidenib): A First-in-Class Mutant IDH1 Inhibitor for the Treatment of IDH1 Mutant Cancers. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 300–305, doi:10.1021/acsmedchemlett.7b00421.

200. Wang, B.; Chu, D.; Feng, Y.; Shen, Y.; Aoyagi-Scharber, M.; Post, L.E. Discovery and Characterization of (8S,9R)-5-Fluoro-8-(4-Fluorophenyl)-9-(1-Methyl-1H-1,2,4-Triazol-5-Yl)-2,7,8,9-Tetrahydro-3H-Pyrido[4,3,2-de]Phthalazin-3-One (BMN 673, Talazoparib), a Novel, Highly Potent, and Orally Efficacious Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1/2 Inhibitor, as an Anticancer Agent. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 335–357, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01498.

201. Murray, C.W.; Newell, D.R.; Angibaud, P. A Successful Collaboration between Academia, Biotech and Pharma Led to Discovery of Erdafitinib, a Selective FGFR Inhibitor Recently Approved by the FDA. *Med. Chem. Commun.* **2019**, *10*, 1509–1511, doi:10.1039/C9MD90044F.

202. Batool, M.; Ahmad, B.; Choi, S. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 2783, doi:10.3390/ijms20112783.

203. Bank, R.P.D. RCSB PDB: Homepage Available online: <https://www.rcsb.org/> (accessed on 13 November 2023).
204. Kalyaanamoorthy, S.; Chen, Y.-P.P. Structure-Based Drug Design to Augment Hit Discovery. *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 831–839, doi:10.1016/j.drudis.2011.07.006.
205. Ferreira, L.G.; Dos Santos, R.N.; Oliva, G.; Andricopulo, A.D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* **2015**, *20*, 13384–13421, doi:10.3390/molecules200713384.
206. Goodnow, R.A. Hit and Lead Identification: Integrated Technology-Based Approaches. *Drug Discovery Today: Technologies* **2006**, *3*, 367–375, doi:10.1016/j.ddtec.2006.12.009.
207. Bera, I.; Payghan, P.V. Use of Molecular Dynamics Simulations in Structure-Based Drug Discovery. *Current Pharmaceutical Design* **2019**, *25*, 3339–3349, doi:10.2174/1381612825666190903153043.
208. Hartenfeller, M.; Schneider, G. De Novo Drug Design. In *Chemoinformatics and Computational Chemical Biology*; Bajorath, J., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp. 299–323 ISBN 978-1-60761-839-3.
209. Meng, X.-Y.; Zhang, H.-X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design* **2011**, *7*, 146–157, doi:10.2174/157340911795677602.
210. Pinzi, L.; Rastelli, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 4331, doi:10.3390/ijms20184331.
211. Lionta, E.; Spyrou, G.; Vassilatis, D.; Cournia, Z. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *CTMC* **2014**, *14*, 1923–1938, doi:10.2174/1568026614666140929124445.
212. Sousa, S.F.; Fernandes, P.A.; Ramos, M.J. Protein–Ligand Docking: Current Status and Future Challenges. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2006**, *65*, 15–26, doi:10.1002/prot.21082.
213. Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm. *Journal of Molecular Biology* **1996**, *261*, 470–489, doi:10.1006/jmbi.1996.0477.
214. Sauton, N.; Lagorce, D.; Villoutreix, B.O.; Miteva, M.A. MS-DOCK: Accurate Multiple Conformation Generator and Rigid Docking Protocol for Multi-Step Virtual Ligand Screening. *BMC Bioinformatics* **2008**, *9*, 184, doi:10.1186/1471-2105-9-184.
215. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible docking¹¹Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *267*, 727–748, doi:10.1006/jmbi.1996.0897.
216. Krovat, E.M.; Steindl, T.; Langer, T. Recent Advances in Docking and Scoring. *Current Computer-Aided Drug Design* **2005**, *1*, 93–102, doi:10.2174/1573409052952314.
217. Fischer, D.; Norel, R.; Wolfson, H.; Nussinov, R. Surface Motifs by a Computer Vision Technique: Searches, Detection, and Implications for Protein–Ligand Recognition. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **1993**, *16*, 278–292, doi:10.1002/prot.340160306.

218. Moitessier, N.; Englebienne, P.; Lee, D.; Lawandi, J.; Corbeil, C.R. Towards the Development of Universal, Fast and Highly Accurate Docking/Scoring Methods: A Long Way to Go. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153*, S7–S26, doi:10.1038/sj.bjp.0707515.
219. Eldridge, M.D.; Murray, C.W.; Auton, T.R.; Paolini, G.V.; Mee, R.P. Empirical Scoring Functions: I. The Development of a Fast Empirical Scoring Function to Estimate the Binding Affinity of Ligands in Receptor Complexes. *J Comput Aided Mol Des* **1997**, *11*, 425–445, doi:10.1023/A:1007996124545.
220. Ain, Q.U.; Aleksandrova, A.; Roessler, F.D.; Ballester, P.J. Machine-Learning Scoring Functions to Improve Structure-Based Binding Affinity Prediction and Virtual Screening. *WIREs Computational Molecular Science* **2015**, *5*, 405–424, doi:10.1002/wcms.1225.
221. Charifson, P.S.; Corkery, J.J.; Murcko, M.A.; Walters, W.P. Consensus Scoring: A Method for Obtaining Improved Hit Rates from Docking Databases of Three-Dimensional Structures into Proteins. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5100–5109, doi:10.1021/jm990352k.
222. Yusuf, D.; Davis, A.M.; Kleywegt, G.J.; Schmitt, S. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 1411–1422, doi:10.1021/ci800084x.
223. De, P.; Kar, S.; Ambure, P.; Roy, K. Prediction Reliability of QSAR Models: An Overview of Various Validation Tools. *Arch Toxicol* **2022**, *96*, 1279–1295, doi:10.1007/s00204-022-03252-y.
224. Verma, J.; Khedkar, V.; Coutinho, E. 3D-QSAR in Drug Design - A Review. *CTMC* **2010**, *10*, 95–115, doi:10.2174/156802610790232260.
225. Tropsha, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Molecular Informatics* **2010**, *29*, 476–488, doi:10.1002/minf.201000061.
226. Veerasamy, R.; Rajak, H.; Jain, A.; Sivadasan, S.; Christapher, P.V.; Agrawal, R. Validation of QSAR Models - Strategies and Importance. *Int J Drug Design and Discov* **2011**, *2*, 511–519, doi:10.37285/ijddd.2.3.1.
227. Piir, G.; Kahn, I.; García-Sosa, A.T.; Sild, S.; Ahte, P.; Maran, U. Best Practices for QSAR Model Reporting: Physical and Chemical Properties, Ecotoxicity, Environmental Fate, Human Health, and Toxicokinetics Endpoints. *Environ Health Perspect* **2018**, *126*, 126001, doi:10.1289/EHP3264.
228. Sarker, I.H. Machine Learning: Algorithms, Real-World Applications and Research Directions. *SN COMPUT. SCI.* **2021**, *2*, 160, doi:10.1007/s42979-021-00592-x.
229. Dasgupta, A.; Nath, A. Classification of Machine Learning Algorithms. *International Journal of Innovative Resear ch in Advanced Engineering* **2016**, *3*.
230. Breiman, L. Random Forests. *Machine Learning* **2001**, *45*, 5–32, doi:10.1023/A:1010933404324.
231. Fourches, D.; Muratov, E.; Tropsha, A. Trust, But Verify: On the Importance of Chemical Structure Curation in Cheminformatics and QSAR Modeling Research. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 1189–1204, doi:10.1021/ci100176x.
232. Ambure, P.; Cordeiro, M.N.D.S. Importance of Data Curation in QSAR Studies Especially While Modeling Large-Size Datasets. In *Ecotoxicological QSARs*; Roy, K., Ed.; Springer US: New York, NY, 2020; pp. 97–109 ISBN 978-1-07-160150-1.

233. Landrum, G.A.; Riniker, S. Combining IC₅₀ or K_i Values from Different Sources Is a Source of Significant Noise. *J. Chem. Inf. Model.* **2024**, *64*, 1560–1567, doi:10.1021/acs.jcim.4c00049.
234. Roy, K. On Some Aspects of Validation of Predictive Quantitative Structure–Activity Relationship Models. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2007**, *2*, 1567–1577, doi:10.1517/17460441.2.12.1567.
235. Estrada, E.; Uriarte, E. Recent Advances on the Role of Topological Indices in Drug Discovery Research. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, *8*, 1573–1588, doi:10.2174/0929867013371923.
236. Prasanna, S.; Doerksen, R.J. Topological Polar Surface Area: A Useful Descriptor in 2D-QSAR. *Current Medicinal Chemistry* **2009**, *16*, 21–41, doi:10.2174/092986709787002817.
237. Danishuddin; Khan, A.U. Descriptors and Their Selection Methods in QSAR Analysis: Paradigm for Drug Design. *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 1291–1302, doi:10.1016/j.drudis.2016.06.013.
238. Golbraikh, A.; Tropsha, A. QSAR Modeling Using Chirality Descriptors Derived from Molecular Topology. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 144–154, doi:10.1021/ci025516b.
239. Sliwoski, G.; Mendenhall, J.; Meiler, J. Autocorrelation Descriptor Improvements for QSAR: 2DA_Sign and 3DA_Sign. *J Comput Aided Mol Des* **2016**, *30*, 209–217, doi:10.1007/s10822-015-9893-9.
240. Martinez-Lopez, Y.; Caballero, Y.; J. Barigye, S.; Marrero-Ponce, Y.; Millan-Cabrera, R.; Madera, J.; Torrens, F.; A. Castillo-Garit, J. State of the Art Review and Report of New Tool for Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2017**, *17*, 2957–2976, doi:10.2174/1568026617666170821123856.
241. Yap, C.W. PaDEL-Descriptor: An Open Source Software to Calculate Molecular Descriptors and Fingerprints. *Journal of Computational Chemistry* **2011**, *32*, 1466–1474, doi:10.1002/jcc.21707.
242. Aires-de-Sousa, J. GUIDEMOL: A Python Graphical User Interface for Molecular Descriptors Based on RDKit. *Molecular Informatics* **2024**, *43*, e202300190, doi:10.1002/minf.202300190.
243. Helguera, A.; Combes, R.; Gonzalez, M.; Cordeiro, M.N. Applications of 2D Descriptors in Drug Design: A DRAGON Tale. *CTMC* **2008**, *8*, 1628–1655, doi:10.2174/156802608786786598.
244. Artese, A.; Cross, S.; Costa, G.; Distinto, S.; Parrotta, L.; Alcaro, S.; Ortuso, F.; Cruciani, G. Molecular Interaction Fields in Drug Discovery: Recent Advances and Future Perspectives. *WIREs Comput Mol Sci* **2013**, *3*, 594–613, doi:10.1002/wcms.1150.
245. Pastor, M.; Cruciani, G.; McLay, I.; Pickett, S.; Clementi, S. GRid-INdependent Descriptors (GRIND): A Novel Class of Alignment-Independent Three-Dimensional Molecular Descriptors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3233–3243, doi:10.1021/jm000941m.
246. Dudek, A.; Arodz, T.; Galvez, J. Computational Methods in Developing Quantitative Structure–Activity Relationships (QSAR): A Review. *CCHTS* **2006**, *9*, 213–228, doi:10.2174/138620706776055539.
247. Gramatica, P. Principles of QSAR Models Validation: Internal and External. *QSAR & Combinatorial Science* **2007**, *26*, 694–701, doi:10.1002/qsar.200610151.
248. Golbraikh, A.; Tropsha, A. Beware of Q²! *J Mol Graph Model* **2002**, *20*, 269–276, doi:10.1016/s1093-3263(01)00123-1.

249. Piir, G.; Sild, S.; Maran, U. Classifying Bio-Concentration Factor with Random Forest Algorithm, Influence of the Bio-Accumulative vs. Non-Bio-Accumulative Compound Ratio to Modelling Result, and Applicability Domain for Random Forest Model. *SAR and QSAR in Environmental Research* **2014**, *25*, 967–981, doi:10.1080/1062936X.2014.969310.
250. Roy, K.; Mitra, I.; Kar, S.; Ojha, P.K.; Das, R.N.; Kabir, H. Comparative Studies on Some Metrics for External Validation of QSPR Models. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 396–408, doi:10.1021/ci200520g.
251. Roy, K.; Kar, S.; Ambure, P. On a Simple Approach for Determining Applicability Domain of QSAR Models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2015**, *145*, 22–29, doi:10.1016/j.chemolab.2015.04.013.
252. Gadaleta, D.; Mangiatordi, G.F.; Catto, M.; Carotti, A.; Nicolotti, O. Applicability Domain for QSAR Models: Where Theory Meets Reality. *IJQSPR* **2016**, *1*, 45–63, doi:10.4018/IJQSPR.2016010102.
253. Sahigara, F.; Mansouri, K.; Ballabio, D.; Mauri, A.; Consonni, V.; Todeschini, R. Comparison of Different Approaches to Define the Applicability Domain of QSAR Models. *Molecules* **2012**, *17*, 4791–4810, doi:10.3390/molecules17054791.
254. Jaworska, J.; Nikolova-Jeliazkova, N.; Aldenberg, T. QSAR Applicability Domain Estimation by Projection of the Training Set in Descriptor Space: A Review. *Altern Lab Anim* **2005**, *33*, 445–459, doi:10.1177/026119290503300508.
255. GitHub · Build and Ship Software on a Single, Collaborative Platform · GitHub Available online: <https://github.com/> (accessed on 23 March 2025).
256. Ruusmann, V.; Sild, S.; Maran, U. QSAR DataBank - an Approach for the Digital Organization and Archiving of QSAR Model Information. *J Cheminform* **2014**, *6*, 25, doi:10.1186/1758-2946-6-25.
257. Van Drie, J.H.; Weininger, D.; Martin, Y.C. ALADDIN: An Integrated Tool for Computer-Assisted Molecular Design and Pharmacophore Recognition from Geometric, Steric, and Substructure Searching of Three-Dimensional Molecular Structures. *J Computer-Aided Mol Des* **1989**, *3*, 225–251, doi:10.1007/BF01533070.
258. Kumar, V.; Krishna, S.; Siddiqi, M.I. Virtual Screening Strategies: Recent Advances in the Identification and Design of Anti-Cancer Agents. *Methods* **2015**, *71*, 64–70, doi:10.1016/j.ymeth.2014.08.010.
259. Lavecchia, A.; Giovanni, C. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. *CMC* **2013**, *20*, 2839–2860, doi:10.2174/09298673113209990001.
260. Horvath, D. Pharmacophore-Based Virtual Screening. In *Chemoinformatics and Computational Chemical Biology*; Bajorath, J., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; Vol. 672, pp. 261–298 ISBN 978-1-60761-838-6.
261. Howitz, K.T. Screening and Profiling Assays for HDACs and Sirtuins. *Drug Discovery Today: Technologies* **2015**, *18*, 38–48, doi:10.1016/j.ddtec.2015.10.008.
262. Yang, Y.; Hu, X.-Q.; Li, Q.-S.; Zhang, X.-X.; Ruan, B.-F.; Xu, J.; Liao, C. Metalloprotein Inhibitors for the Treatment of Human Diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2016**, *16*, 384–396.

263. Anastassiadis, T.; Deacon, S.W.; Devarajan, K.; Ma, H.; Peterson, J.R. Comprehensive Assay of Kinase Catalytic Activity Reveals Features of Kinase Inhibitor Selectivity. *Nat Biotechnol* **2011**, *29*, 1039–1045, doi:10.1038/nbt.2017.
264. Badr-Eldin, S.M.; Aldawsari, H.M.; Kotta, S.; Deb, P.K.; Venugopala, K.N. Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models for Efficient Drug Discovery: Progress So Far and Future Prospects. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 926, doi:10.3390/ph15080926.
265. Nunes, A.S.; Barros, A.S.; Costa, E.C.; Moreira, A.F.; Correia, I.J. 3D Tumor Spheroids as in Vitro Models to Mimic in Vivo Human Solid Tumors Resistance to Therapeutic Drugs. *Biotechnology and Bioengineering* **2019**, *116*, 206–226, doi:10.1002/bit.26845.
266. Benien, P.; Swami, A. 3D Tumor Models: History, Advances and Future Perspectives. *Future Oncol.* **2014**, *10*, 1311–1327, doi:10.2217/fon.13.274.
267. Costa, E.C.; Moreira, A.F.; de Melo-Diogo, D.; Gaspar, V.M.; Carvalho, M.P.; Correia, I.J. 3D Tumor Spheroids: An Overview on the Tools and Techniques Used for Their Analysis. *Biotechnology Advances* **2016**, *34*, 1427–1441, doi:10.1016/j.biotechadv.2016.11.002.
268. Koltai, T.; Reshkin, S.J.; Carvalho, T.M.A.; Di Molfetta, D.; Greco, M.R.; Alfarouk, K.O.; Cardone, R.A. Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Physiopathologic and Pharmacologic Review. *Cancers* **2022**, *14*, 2486, doi:10.3390/cancers14102486.
269. Garrido-Castro, A.C.; Lin, N.U.; Polyak, K. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discovery* **2019**, *9*, 176–198, doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1177.
270. Kohler, B.A.; Sherman, R.L.; Howlader, N.; Jemal, A.; Ryerson, A.B.; Henry, K.A.; Boscoe, F.P.; Cronin, K.A.; Lake, A.; Noone, A.-M.; et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2015**, *107*, djv048, doi:10.1093/jnci/djv048.
271. Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L.; Duellman, S.; Benink, H.A.; Worzella, T.J.; Minor, L. Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual [Internet]*; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.
272. Morgan, D.M.L. Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity. In *Polyamine Protocols*; Morgan, D.M.L., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 1998; pp. 179–184 ISBN 978-1-59259-565-5.
273. Zimmermann, K.C.; Green, D.R. How Cells Die: Apoptosis Pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2001**, *108*, S99–S103, doi:10.1067/mai.2001.117819.
274. Fulda, S.; Debatin, K.-M. Extrinsic versus Intrinsic Apoptosis Pathways in Anticancer Chemotherapy. *Oncogene* **2006**, *25*, 4798–4811, doi:10.1038/sj.onc.1209608.
275. Hongmei, Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. In *Apoptosis and Medicine*; IntechOpen, 2012 ISBN 978-953-51-0701-9.
276. Telford, W.G. Multiparametric Analysis of Apoptosis by Flow Cytometry. In *Flow Cytometry Protocols*; Hawley, T.S., Hawley, R.G., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2018; Vol. 1678, pp. 167–202 ISBN 978-1-4939-7344-6.

277. Kastan, M.B.; Bartek, J. Cell-Cycle Checkpoints and Cancer. *Nature* **2004**, *432*, 316–323, doi:10.1038/nature03097.
278. Darzynkiewicz, Z.; Bedner, E.; Smolewski, P. Flow Cytometry in Analysis of Cell Cycle and Apoptosis. *Seminars in Hematology* **2001**, *38*, 179–193, doi:10.1016/S0037-1963(01)90051-4.
279. Castaneda, M.; den Hollander, P.; Kuburich, N.A.; Rosen, J.M.; Mani, S.A. Mechanisms of Cancer Metastasis. *Seminars in Cancer Biology* **2022**, *87*, 17–31, doi:10.1016/j.semcancer.2022.10.006.
280. Kalluri, R.; Weinberg, R.A. The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Clin Invest* **2009**, *119*, 1420–1428, doi:10.1172/JCI39104.
281. Friedl, P.; Locker, J.; Sahai, E.; Segall, J.E. Classifying Collective Cancer Cell Invasion. *Nat Cell Biol* **2012**, *14*, 777–783, doi:10.1038/ncb2548.
282. Rodriguez, L.G.; Wu, X.; Guan, J.-L. Wound-Healing Assay. In *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*; Guan, J.-L., Ed.; Methods in Molecular BiologyTM; Humana Press: Totowa, NJ, 2005; pp. 23–29 ISBN 978-1-59259-860-1.
283. Justus, C.R.; Leffler, N.; Ruiz-Echevarria, M.; Yang, L.V. In Vitro Cell Migration and Invasion Assays. *J Vis Exp* **2014**, 51046, doi:10.3791/51046.
284. Gandalovičová, A.; Rosel, D.; Fernandes, M.; Veselý, P.; Heneberg, P.; Čermák, V.; Petruželka, L.; Kumar, S.; Sanz-Moreno, V.; Brábek, J. Migrastatics—Anti-Metastatic and Anti-Invasion Drugs: Promises and Challenges. *Trends in Cancer* **2017**, *3*, 391–406, doi:10.1016/j.trecan.2017.04.008.
285. Martínez-Rosell, G.; Giorgino, T.; De Fabritiis, G. PlayMolecule ProteinPrepare: A Web Application for Protein Preparation for Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57*, 1511–1516, doi:10.1021/acs.jcim.7b00190.
286. BIOVIA Available online: <https://www.3ds.com/products/biovia> (accessed on 2 August 2024).
287. PyMOL | Pymol.Org Available online: <https://www.pymol.org/> (accessed on 17 February 2025).
288. Zukic, S.; Beljkas, M. Data for: Molecular Docking, Machine Learning-Guided Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Multitarget HDAC/ROCK Inhibitors. *QsarDB repository, QDB.270*. 2025., doi:<https://doi.org/10.15152/QDB.270>.
289. Wu, F.; Büttner, F.H.; Chen, R.; Hickey, E.; Jakes, S.; Kaplita, P.; Kashem, M.A.; Kerr, S.; Kugler, S.; Paw, Z.; et al. Substituted 2H-Isoquinolin-1-One as Potent Rho-Kinase Inhibitors. Part 1: Hit-to-Lead Account. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 3235–3239, doi:10.1016/j.bmcl.2010.04.070.
290. Li, R.; Martin, M.P.; Liu, Y.; Wang, B.; Patel, R.A.; Zhu, J.-Y.; Sun, N.; Pireddu, R.; Lawrence, N.J.; Li, J.; et al. Fragment-Based and Structure-Guided Discovery and Optimization of Rho Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2474–2478, doi:10.1021/jm201289r.
291. Sessions, E.H.; Chowdhury, S.; Yin, Y.; Pocas, J.R.; Grant, W.; Schröter, T.; Lin, L.; Ruiz, C.; Cameron, M.D.; LoGrasso, P.; et al. Discovery and Optimization of Indole and 7-Azaindoles as Rho Kinase (ROCK) Inhibitors (Part-II). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 7113–7118, doi:10.1016/j.bmcl.2011.09.084.
292. ChEMBL Database Available online: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (accessed on 2 August 2024).

293. Baroni, M.; Costantino, G.; Cruciani, G.; Riganelli, D.; Valigi, R.; Clementi, S. Generating Optimal Linear PLS Estimations (GOLPE): An Advanced Chemometric Tool for Handling 3D-QSAR Problems. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1993**, *12*, 9–20, doi:10.1002/qsar.19930120103.
294. Irwin, J.J.; Sterling, T.; Mysinger, M.M.; Bolstad, E.S.; Coleman, R.G. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1757–1768, doi:10.1021/ci3001277.
295. Sastry, G.M.; Dixon, S.L.; Sherman, W. Rapid Shape-Based Ligand Alignment and Virtual Screening Method Based on Atom/Feature-Pair Similarities and Volume Overlap Scoring. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 2455–2466, doi:10.1021/ci2002704.
296. Dixon, S.L.; Smondyrev, A.M.; Knoll, E.H.; Rao, S.N.; Shaw, D.E.; Friesner, R.A. PHASE: A New Engine for Pharmacophore Perception, 3D QSAR Model Development, and 3D Database Screening: 1. Methodology and Preliminary Results. *J Comput Aided Mol Des* **2006**, *20*, 647–671, doi:10.1007/s10822-006-9087-6.
297. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55–63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
298. Reers, M.; Smiley, S.T.; Mottola-Hartshorn, C.; Chen, A.; Lin, M.; Chen, L.B. [29] Mitochondrial Membrane Potential Monitored by JC-1 Dye. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1995; Vol. 260, pp. 406–417 ISBN 978-0-12-182161-6.
299. Yang, Y.; Karakhanova, S.; Hartwig, W.; D’Haese, J.G.; Philippov, P.P.; Werner, J.; Bazhin, A.V. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *Journal of Cellular Physiology* **2016**, *231*, 2570–2581, doi:10.1002/jcp.25349.
300. Aseervatham, J. Cytoskeletal Remodeling in Cancer. *Biology* **2020**, *9*, 385, doi:10.3390/biology9110385.
301. Molinie, N.; Gautreau, A. Directional Collective Migration in Wound Healing Assays. In *Cell Migration: Methods and Protocols*; Gautreau, A., Ed.; Springer: New York, NY, 2018; pp. 11–19 ISBN 978-1-4939-7701-7.
302. Alseksek, R.K.; Ramadan, W.S.; Saleh, E.; El-Awady, R. The Role of HDACs in the Response of Cancer Cells to Cellular Stress and the Potential for Therapeutic Intervention. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 8141, doi:10.3390/ijms23158141.
303. Chen, F.; Li, X.; Aquadro, E.; Haigh, S.; Zhou, J.; Stepp, D.W.; Weintraub, N.L.; Barman, S.A.; Fulton, D.J.R. Inhibition of Histone Deacetylase Reduces Transcription of NADPH Oxidases and ROS Production and Ameliorates Pulmonary Arterial Hypertension. *Free Radical Biology and Medicine* **2016**, *99*, 167–178, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.003.
304. Beljkas, M.; Ruzic, D.; Djuric, A.; Vuletic, A.; Tchiche, G.N.; Jallet, C.; Cadet-Daniel, V.; Arimondo, P.B.; Santibanez, J.F.; Srdic-Rajic, T.; et al. Pioneering First-in-Class HDAC-ROCK Inhibitors as Potential Multitarget Anticancer Agents. *Future Medicinal Chemistry* **0**, 1–15, doi:10.1080/17568919.2025.2459589.
305. Visser, K.E. de; Joyce, J.A. The Evolving Tumor Microenvironment: From Cancer Initiation to Metastatic Outgrowth. *Cancer Cell* **2023**, *41*, 374–403, doi:10.1016/j.ccell.2023.02.016.

306. Konjević, G.M.; Vuletić, A.M.; Mirjačić Martinović, K.M.; Larsen, A.K.; Jurišić, V.B. The Role of Cytokines in the Regulation of NK Cells in the Tumor Environment. *Cytokine* **2019**, *117*, 30–40, doi:10.1016/j.cyto.2019.02.001.
307. Konjević, G.; Vuletić, A.; Mirjačić Martinović, K. Natural Killer Cell Receptors: Alterations and Therapeutic Targeting in Malignancies. *Immunol Res* **2016**, *64*, 25–35, doi:10.1007/s12026-015-8695-4.
308. Jiang, Y.-Z.; Ma, D.; Suo, C.; Shi, J.; Xue, M.; Hu, X.; Xiao, Y.; Yu, K.-D.; Liu, Y.-R.; Yu, Y.; et al. Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies. *Cancer Cell* **2019**, *35*, 428–440.e5, doi:10.1016/j.ccell.2019.02.001.
309. Soltani, M.; Abbaszadeh, M.; Fouladseresht, H.; Sullman, M.J.M.; Eskandari, N. PD-L1 Importance in Malignancies Comprehensive Insights into the Role of PD-L1 in Malignancies: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Clin Exp Med* **2025**, *25*, 106, doi:10.1007/s10238-025-01641-y.
310. Li, H.; Chang, Y.; Jin, T.; Zhang, M. Progress of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Cell Int* **2025**, *25*, 139, doi:10.1186/s12935-025-03769-z.
311. Wu, B.; Zhong, C.; Lang, Q.; Liang, Z.; Zhang, Y.; Zhao, X.; Yu, Y.; Zhang, H.; Xu, F.; Tian, Y. Poliovirus Receptor (PVR)-like Protein Cosignaling Network: New Opportunities for Cancer Immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* **2021**, *40*, 267, doi:10.1186/s13046-021-02068-5.
312. Jones, A.B.; Rocco, A.; Lamb, L.S.; Friedman, G.K.; Hjelmeland, A.B. Regulation of NKG2D Stress Ligands and Its Relevance in Cancer Progression. *Cancers* **2022**, *14*, 2339, doi:10.3390/cancers14092339.
313. Chavez, K.J.; Garimella, S.V.; Lipkowitz, S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Disease* **2011**, *32*, 35–48, doi:10.3233/BD-2010-0307.
314. Lee, S.; Kim, J.; Jo, J.; Chang, J.W.; Sim, J.; Yun, H. Recent Advances in Development of Hetero-Bivalent Kinase Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, *216*, 113318, doi:10.1016/j.ejmech.2021.113318.
315. Xie, Z.; Yang, X.; Duan, Y.; Han, J.; Liao, C. Small-Molecule Kinase Inhibitors for the Treatment of Nononcologic Diseases. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 1283–1345, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01511.
316. Xie, Y.; Yue, L.; Shi, Y.; Su, X.; Gan, C.; Liu, H.; Xue, T.; Ye, T. Application and Study of ROCK Inhibitors in Pulmonary Fibrosis: Recent Developments and Future Perspectives. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 4342–4360, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01753.
317. Dayal, N.; Mikek, C.G.; Hernandez, D.; Naclerio, G.A.; Yin Chu, E.F.; Carter-Cooper, B.A.; Lapidus, R.G.; Sintim, H.O. Potently Inhibiting Cancer Cell Migration with Novel 3H-Pyrazolo[4,3-f]Quinoline Boronic Acid ROCK Inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *180*, 449–456, doi:10.1016/j.ejmech.2019.06.089.
318. Hall, L.H.; Mohny, B.; Kier, L.B. The Electrotopological State: An Atom Index for QSAR. *Quantitative Structure-Activity Relationships* **1991**, *10*, 43–51, doi:10.1002/qsar.19910100108.
319. Hall, L.H.; Kier, L.B. Electrotopological State Indices for Atom Types: A Novel Combination of Electronic, Topological, and Valence State Information. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1995**, *35*, 1039–1045, doi:10.1021/ci00028a014.

320. Kier, L.B. A Shape Index from Molecular Graphs. *Quantitative Structure-Activity Relationships* **1985**, *4*, 109–116, doi:10.1002/qsar.19850040303.
321. Labute, P. A Widely Applicable Set of Descriptors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2000**, *18*, 464–477, doi:10.1016/S1093-3263(00)00068-1.
322. Pearlman, R.S.; Smith, K.M. Novel Software Tools for Chemical Diversity. In *3D QSAR in Drug Design: Ligand-Protein Interactions and Molecular Similarity*; Kubinyi, H., Folkers, G., Martin, Y.C., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1998; pp. 339–353 ISBN 978-0-306-46857-5.
323. Bonchev, D.; Trinajstić, N. Information Theory, Distance Matrix, and Molecular Branching. *The Journal of Chemical Physics* **1977**, *67*, 4517–4533, doi:10.1063/1.434593.
324. Pearlman, R.S. Molecular Structure Description. The Electrotopological State By Lemont B. Kier (Virginia Commonwealth University) and Lowell H. Hall (Eastern Nazarene College). Academic Press: San Diego. 1999. Xx + 245 Pp. \$99.95. ISBN 0-12-406555-4. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6340–6340, doi:10.1021/ja995771l.

7. Prilozi

P1. 3D-QSAR studija i molekulska doking studija ROCK1 i ROCK2 inhibitora

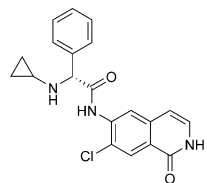
Tabela P1.1. Raspodjela jedinjenja u skupu trening i test seta, zajedno sa eksperimentalno dobijenim i predviđenim pIC_{50} vrijednostima pomoću formiranog 3D-QSAR (ROCK1) modela

Trening set			Test set		
	pIC_{50} (exp)	pIC_{50} (pred)		pIC_{50} (exp)	pIC_{50} (pred)
CHEMBL2023148	3,800	4,433	CHEMBL2022282	4,140	4,239
CHEMBL67352	4,120	3,956	CHEMBL2023149	4,670	5,260
CHEMBL2023147	4,230	4,103	CHEMBL2023157	5,040	6,116
CHEMBL2023161	4,510	5,098	CHEMBL2023151	5,540	6,286
CHEMBL225282	4,860	5,203	CHEMBL2023153	5,660	5,463
CHEMBL2023150	5,340	5,969	CHEMBL2023156	5,940	5,704
CHEMBL2023152	5,580	5,898	CHEMBL2023154	6,190	5,253
CHEMBL2023159	5,580	5,214	CHEMBL4522042	6,550	6,073
CHEMBL2023155	5,610	5,402	CHEMBL1922044	6,920	6,582
CHEMBL2023158	5,770	5,664	CHEMBL1922033	7,340	7,192
CHEMBL2023160	5,850	5,753	CHEMBL1084106	7,410	6,879
CHEMBL1922030	5,960	5,897	CHEMBL1922133	7,520	7,533
CHEMBL1922028	6,150	5,711	CHEMBL1922026	7,720	7,055
CHEMBL38380	6,180	6,192	CHEMBL1922132	7,960	8,050
CHEMBL4555093	6,510	6,495	CHEMBL1922129	8,30	7,537
CHEMBL1084890	6,750	6,358			
CHEMBL1922143	7,040	7,443			
CHEMBL1922134	7,120	6,714			
CHEMBL1085141	7,230	7,565			
CHEMBL1084900	7,280	7,981			
CHEMBL1922142	7,410	7,581			
CHEMBL1922043	7,480	7,653			
CHEMBL1922042	7,570	7,986			
CHEMBL1922125	7,680	8,133			
CHEMBL1084107	7,720	6,732			
GSK	7,850	7,587			
CHEMBL1084892	7,850	7,744			
CHEMBL1922126	7,890	7,397			
CHEMBL1922034	7,920	7,397			
CHEMBL1922127	8,050	7,914			
RKI1447	8,100	7,603			
CHEMBL1922140	8,220	7,956			
CHEMBL1922128	8,520	8,678			
CHEMBL1922035	8,700	8,637			

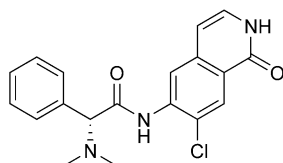
Tabela P1.2. Raspodjela jedinjenja u skupu trening i test seta, zajedno sa eksperimentalno dobijenim i predviđenim pIC₅₀ vrijednostima pomoću formiranog 3D-QSAR (ROCK2) modela

Trening set			Test set		
	pIC ₅₀ (exp)	pIC ₅₀ (pred)		pIC ₅₀ (exp)	pIC ₅₀ (pred)
CHEMBL2023148	4,210	4,353	CHEMBL2023147	4,440	4,908
CHEMBL2023161	4,480	5,122	CHEMBL3689476	4,830	5,336
CHEMBL2023159	4,700	4,830	CHEMBL2023157	5,120	5,247
CHEMBL2023149	5,120	5,322	CHEMBL3689479	5,380	5,008
CHEMBL225282	5,260	5,018	CHEMBL3689466	5,590	6,052
CHEMBL2023160	5,270	5,093	CHEMBL2023153	5,960	5,941
CHEMBL3689496	5,270	5,254	CHEMBL3689482	6,200	5,895
CHEMBL3689498	5,400	5,533	CHEMBL2023156	6,580	6,315
CHEMBL2023150	5,640	6,324	CHEMBL3689502	6,950	6,757
CHEMBL2023151	5,820	5,985	CHEMBL1922135	7,210	6,617
CHEMBL3689477	5,830	5,693	CHEMBL2006299	7,680	7,41
CHEMBL2023155	5,970	5,816	CHEMBL1922044	7,750	7,47
CHEMBL3689484	6,090	6,310	CHEMBL1922033	8,000	7,597
CHEMBL2023152	6,100	6,078	CHEMBL1922133	8,220	8,017
CHEMBL2023154	6,170	5,724	CHEMBL1922132	8,700	7,289
CHEMBL38380	6,400	5,965			
CHEMBL3689506	6,420	6,535			
CHEMBL3689504	6,560	6,435			
CHEMBL1922030	6,700	6,478			
CHEMBL3689500	6,800	7,208			
CHEMBL2023158	7,000	6,533			
CHEMBL3689470	7,130	7,254			
GSK	7,200	7,020			
CHEMBL4522042	7,430	7,257			
CHEMBL1922134	7,720	7,315			
CHEMBL1922143	7,800	8,686			
CHEMBL1922043	8,100	8,113			
RKI1447	8,210	7,762			
CHEMBL1922125	8,300	7,929			
CHEMBL1922042	8,400	8,325			
CHEMBL1922034	8,700	8,781			
CHEMBL1922128	9,000	9,086			

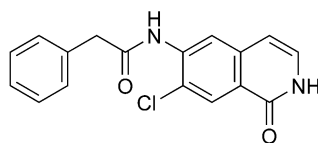
P1.3. Strukture ROCK1 i ROCK2 inhibitora koje su korišćene za pripremu 3D-QSAR modela i doking analize



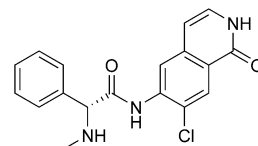
CHEMBL1084106



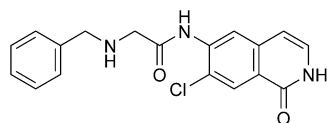
CHEMBL1084107



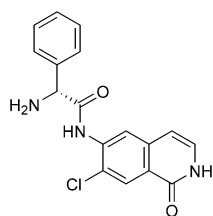
CHEMBL1084890



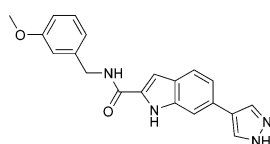
CHEMBL1084892



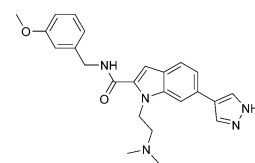
CHEMBL1084900



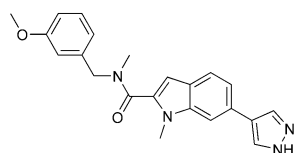
CHEMBL1085141



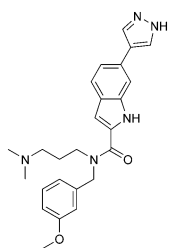
CHEMBL1922026



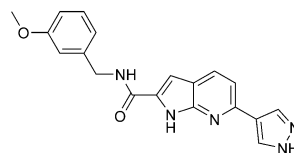
CHEMBL1922028



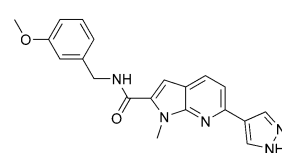
CHEMBL1922030



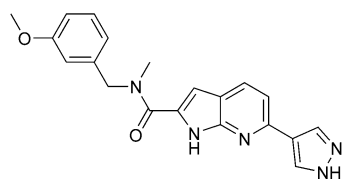
CHEMBL1922033



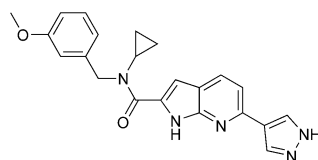
CHEMBL1922034



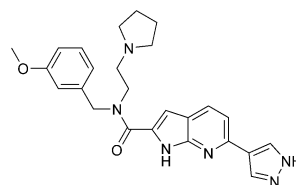
CHEMBL1922035



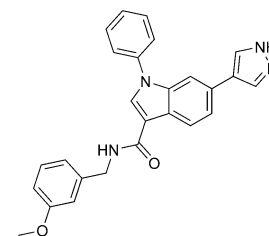
CHEMBL1922042



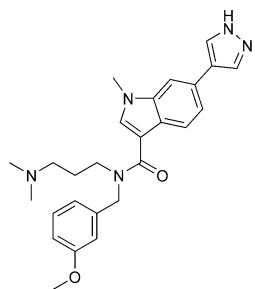
CHEMBL1922043



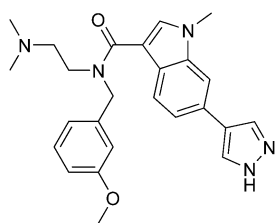
CHEMBL1922044



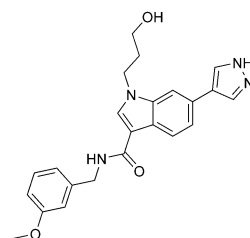
CHEMBL1922125



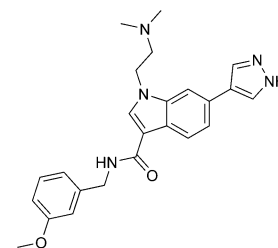
CHEMBL1922126



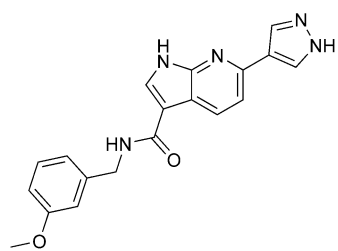
CHEMBL1922127



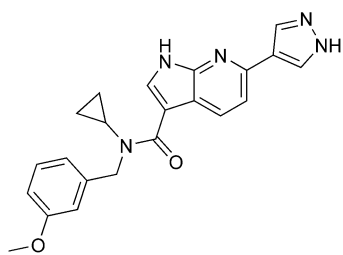
CHEMBL1922128



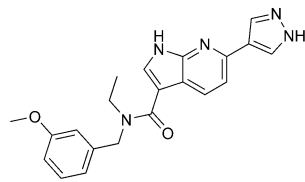
CHEMBL1922129



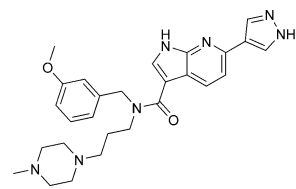
CHEMBL1922132



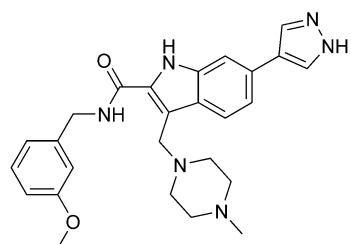
CHEMBL1922133



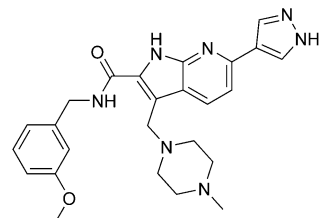
CHEMBL1922134



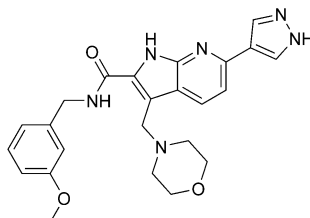
CHEMBL1922135



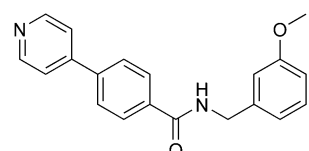
CHEMBL1922140



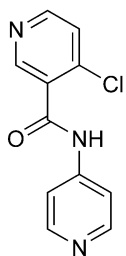
CHEMBL1922142



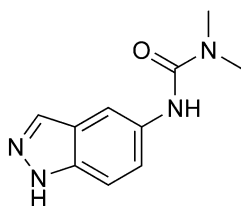
CHEMBL1922143



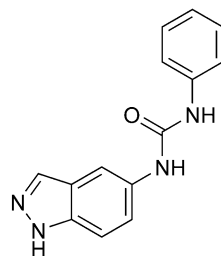
CHEMBL2006299



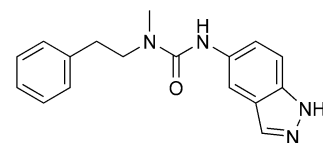
CHEMBL2022282



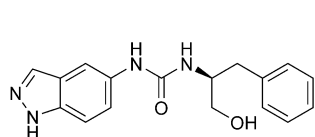
CHEMBL2023147



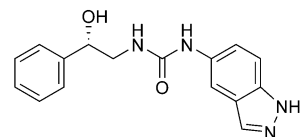
CHEMBL2023148



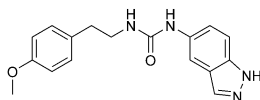
CHEMBL2023149



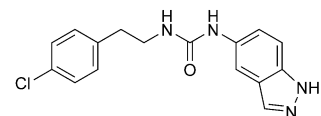
CHEMBL2023150



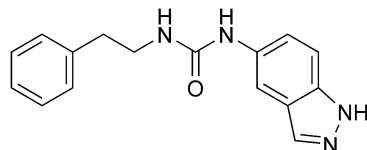
CHEMBL2023151



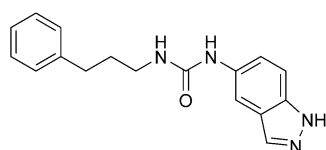
CHEMBL2023152



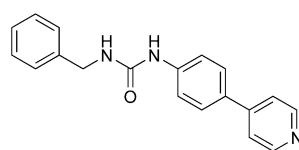
CHEMBL2023153



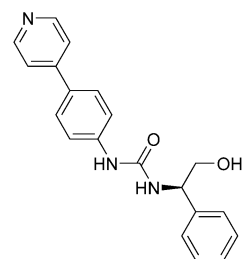
CHEMBL2023154



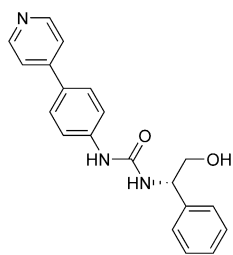
CHEMBL2023155



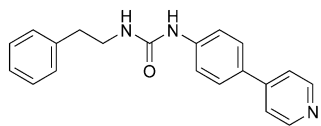
CHEMBL2023156



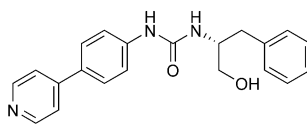
CHEMBL2023157



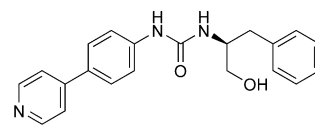
CHEMBL2023158



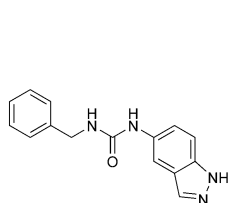
CHEMBL2023159



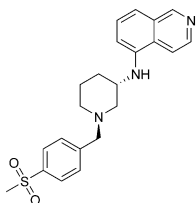
CHEMBL2023160



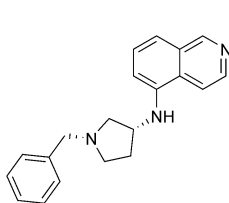
CHEMBL2023161



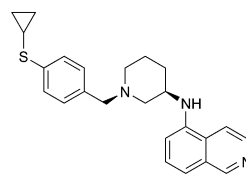
CHEMBL225282



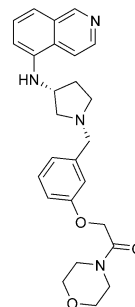
CHEMBL3689466



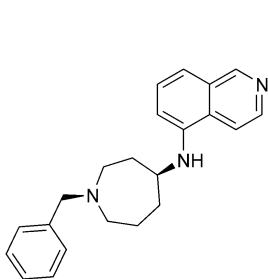
CHEMBL3689470



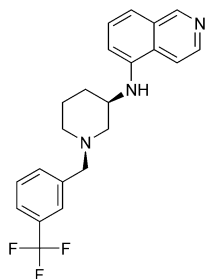
CHEMBL3689476



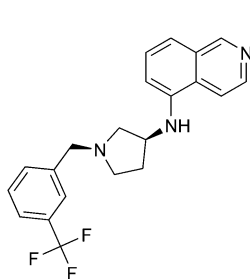
CHEMBL3689506



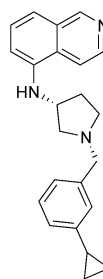
CHEMBL3689477



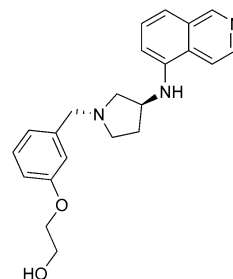
CHEMBL3689479



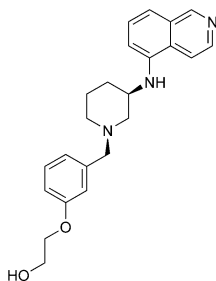
CHEMBL3689482



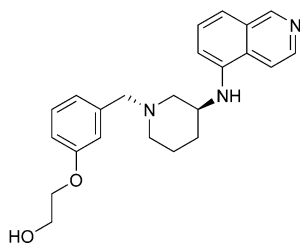
CHEMBL3689484



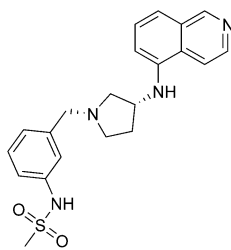
CHEMBL3689496



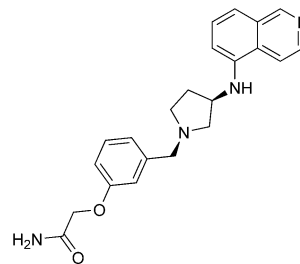
CHEMBL3689498



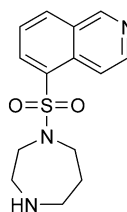
CHEMBL3689500



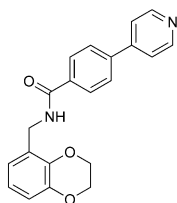
CHEMBL3689502



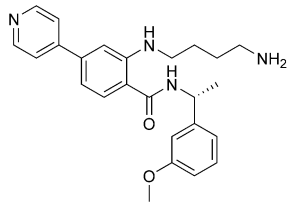
CHEMBL3689504



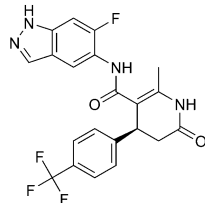
CHEMBL38380



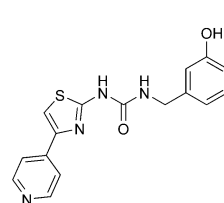
CHEMBL4522042



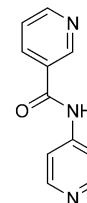
CHEMBL4555093



GSK



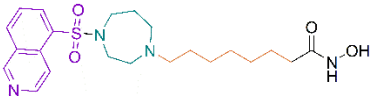
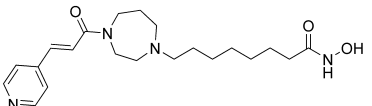
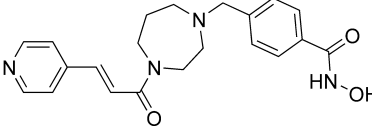
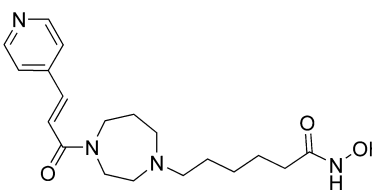
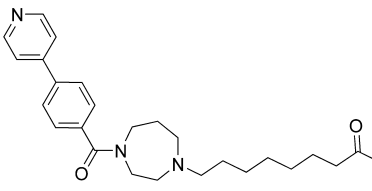
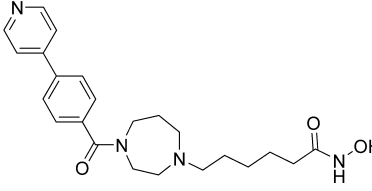
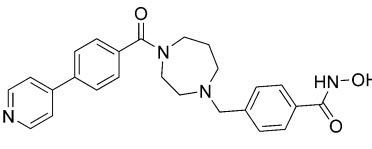
RKI1447



CHEMBL67352

P2. Studije molekuskog dokinga i slobodne energije vezivanja izračunate MM-GBSA metodom

Table P2.1. Strukture, doking vrijednosti, *glide* vrijednosti, vrijednosti *glide* energije i *glide* efikasnosti liganda novodizajniranih HDAC/ROCK *multitarget* inhibitora

Jedinjenje	Struktura	Enzim	Doking vrijednost	Glide vrijednost	Glide energija	Glide efikasnost liganda
C-9-lead compound		ROCK1	-7,348	-7,428	-56,709	-0,237
		ROCK2	-6,300	-6,380	-61,252	-0,203
		HDAC6	-8,956	-9,037	-59,654	-0,289
C-13		ROCK1	-7,985	-8,065	-57,146	-0,285
		ROCK2	-6,077	-7,372	-56,012	-0,236
		HDAC6	-7,367	-7,447	-48,654	-0,263
C-14		ROCK1	-7,968	-8,428	-54,616	-0,285
		ROCK2	-7,309	-7,738	-56,193	-0,261
		HDAC6	-8,282	-8,710	-47,164	-0,296
C-15		ROCK1	-8,399	-8,479	-56,147	-0,285
		ROCK2	-8,617	-8,697	-56,193	-0,261
		HDAC6	-7,928	-8,009	-47,164	-0,296
C-35		ROCK1	-9,214	-9,291	-56,147	-0,323
		ROCK2	-8,756	-8,832	-57,086	-0,331
		HDAC6	-7,829	-7,904	-50,304	-0,305
C-37		ROCK1	-9,293	-9,369	-63,168	-0,310
		ROCK2	-7,600	-8,892	-58,413	-0,292
		HDAC6	-8,714	-8,790	-53,813	-0,290
C-38		ROCK1	-9,253	-9,713	-66,279	-0,289
		ROCK2	-8,663	-9,123	-64,722	-0,271
		HDAC6	-8,747	-9,207	-51,630	-0,273
C-40		ROCK1	-7,545	-7,614	-58,114	-0,251

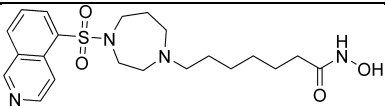
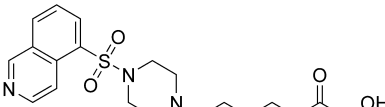
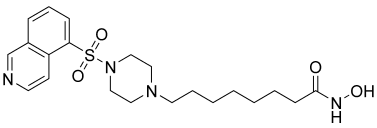
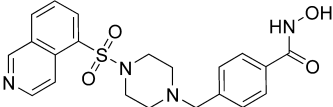
C-55		ROCK2	-7,464	-7,544	-59,381	-0,249
		HDAC6	-8,280	-8,360	-56,933	-0,276
		ROCK1	-7,578	-7,736	-51,852	-0,271
		HDAC6	-7,912	-8,794	-50,000	-0,290
C-56		ROCK1	-6,698	-7,582	-66,122	-0,245
		ROCK2	-8,648	-8,805	-53,858	-0,288
		HDAC6	-7,770	-7,927	-47,952	-0,259
C-57		ROCK1	-5,627	-5,678	-53,816	-0,188
		ROCK2	-6,983	-7,034	-51,739	-0,233
		HDAC6	-9,185	-9,236	-55,621	-0,306

Tabela P2.2. Slobodna energija vezivanja i efikasnost liganda izračunata MM-GBSA metodom

Jedinjenje	Slobodna energija vezivanja (MM-GBSA)		Efikasnost liganda (MM-GBSA)	
C-9-vodeći molekul	ROCK1	-56,98	-1,838	
	ROCK2	-57,56	-1,857	
	HDAC6	-17,96	-0,579	
C-13	ROCK1	-57,55	-2,055	
	ROCK2	-50,24	-1,794	
	HDAC6	-13,07	-0,467	
C-14	ROCK1	-61,65	-2,025	
	ROCK2	-57,15	-2,041	
	HDAC6	-23,57	-0,842	
C-15	ROCK1	-60,79	-2,338	
	ROCK2	-56,90	-2,188	
	HDAC6	-18,60	-0,545	

C-35	ROCK1	-55,13	-1,723
	ROCK2	-59,68	-1,865
	HDAC6	-18,25	-0,570
C-37	ROCK1	-61,07	-2,036
	ROCK2	-51,75	-1,725
	HDAC6	-18,58	-0,619
C-38	ROCK1	-69,23	-2,163
	ROCK2	-57,86	-1,808
	HDAC6	-26,18	-0,818
C-40	ROCK1	-59,19	-1,973
	ROCK2	-55,70	-1,857
	HDAC6	-13,51	-0,450
C-56	ROCK1	-33,86	-1,123
	ROCK2	-43,52	-1,451
	HDAC6	-18,10	-0,603
C-57	ROCK1	-58,62	-1,954
	ROCK2	-56,66	-1,889
	HDAC6	-11,08	-0,369
C-55	ROCK1	-37,11	-1,325
	ROCK2	-45,82	-1,637
	HDAC6	-24,10	-0,861

P.3. 2D-QSAR studije zasnovane na algoritmima mašinskog učenja

Tabela P3.1. Set podataka za ROCK2 inhibitore

CHEMBL oznaka Eseja	Broj jedinjenja	CHEMBL oznaka dokumenta	Opis izvora informacija
CHEMBL3240142	8	CHEMBL3232974	Naučna literatura
CHEMBL1066168	14	CHEMBL1157712	Naučna literatura
CHEMBL3705637	134	CHEMBL3639066	<i>BindingDB Database</i>
CHEMBL3705771	152	CHEMBL3638681	<i>BindingDB Database</i>

Tabela P3.2. Set podataka za HDAC6 inhibitore

CHEMBL oznaka eseja	Broj jedinjenja	CHEMBL oznaka dokumenta	Opis izvora informacija
CHEMBL4024068	1	CHEMBL4020839	Naučna literatura
CHEMBL4771460	1	CHEMBL4765362	Naučna literatura
CHEMBL4346119	1	CHEMBL4342521	Naučna literatura
CHEMBL4422764	1	CHEMBL4422610	Naučna literatura
CHEMBL4035215	1	CHEMBL4033665	Naučna literatura
CHEMBL4377245	2	CHEMBL4376807	Naučna literatura
CHEMBL5121017	2	CHEMBL5120742	Naučna literatura
CHEMBL4396820	3	CHEMBL4393743	Naučna literatura
CHEMBL5056741	3	CHEMBL5055644	Naučna literatura
CHEMBL4704795	4	CHEMBL4699612	Naučna literatura
CHEMBL3293471	4	CHEMBL3286308	Naučna literatura
CHEMBL1838191	5	CHEMBL1833850	Naučna literatura
CHEMBL1293051	5	CHEMBL1287669	Naučna literatura
CHEMBL5036493	11	CHEMBL5036306	Naučna literatura
CHEMBL5119739	26	CHEMBL5113527	Naučna literatura
CHEMBL3888939	19	CHEMBL3886894	<i>BindingDB Patent Bioactivity Data</i>
CHEMBL5132158	20	CHEMBL5131384	Naučna literatura
CHEMBL5332399	42	CHEMBL5331064	Naučna literatura

CHEMBL3887735	66	CHEMBL3886429	BindingDB Patent Bioactivity Data
---------------	----	---------------	-----------------------------------

Table P3.3. Analiza izomera u setu jedinjenja za ROCK2

CHEMBL oznaka	Canonical smiles	pIC ₅₀
CHEMBL3689497	<chem>CS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CCC[C@@H](Nc3cccc4cnccc34)C2)c1</chem>	5,51
CHEMBL3689501	<chem>CS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CCC[C@H](Nc3cccc4cnccc34)C2)c1</chem>	5,51
Srednja vrijednost		5,51
CHEMBL3680707	<chem>N[C@@H]1CCc2nc(NC(=O)c3cccc(CNC(=O)c4cccc(-c5cn[nH]c5)c4)c3)sc2C1</chem>	9,35
CHEMBL3680709	<chem>N[C@H]1CCc2nc(NC(=O)c3cccc(CNC(=O)c4cccc(-c5cn[nH]c5)c4)c3)sc2C1</chem>	9,8
		9,58
CHEMBL3680714	<chem>Cc1nnnn1-c1ccc(C(=O)NCc2cccc(C(=O)Nc3nc4c(s3)C[C@H](N)CC4)c2)cc1</chem>	8,52
CHEMBL3680716	<chem>Cc1nnnn1-c1ccc(C(=O)NCc2cccc(C(=O)Nc3nc4c(s3)C[C@@H](N)CC4)c2)cc1</chem>	9,17
		8,85
CHEMBL3689451	<chem>OC[C@H](O)COc1cccc(CN2CCC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1</chem>	6,07
CHEMBL3689453	<chem>OC[C@@H](O)COc1cccc(CN2CCC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1</chem>	6,26
		6,17
CHEMBL3689435	<chem>CS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CC[C@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1</chem>	6,19
CHEMBL3689427	<chem>CS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CCC(Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1</chem>	6,55
CHEMBL3689437	<chem>CS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1</chem>	6,56
		6,43
CHEMBL3689448	<chem>OCCn1ccc2ccc(CN3CCC[C@H](Nc4ccc5[nH]ncc5c4)C3)cc21</chem>	6,62
CHEMBL3689441	<chem>OCCn1ccc2ccc(CN3CCCC(Nc4ccc5[nH]ncc5c4)C3)cc21</chem>	7,16
CHEMBL3689447	<chem>OCCn1ccc2ccc(CN3CCC[C@@H](Nc4ccc5[nH]ncc5c4)C3)cc21</chem>	6,43
		6,74
CHEMBL3689446	<chem>NC(=O)Cn1ccc2ccc(CN3CCC[C@H](Nc4ccc5[nH]ncc5c4)C3)cc21</chem>	6,83
CHEMBL3689445	<chem>NC(=O)Cn1ccc2ccc(CN3CCC[C@@H](Nc4ccc5[nH]ncc5c4)C3)cc21</chem>	7,16
CHEMBL3689439	<chem>NC(=O)Cn1ccc2ccc(CN3CCCC(Nc4ccc5[nH]ncc5c4)C3)cc21</chem>	7,59

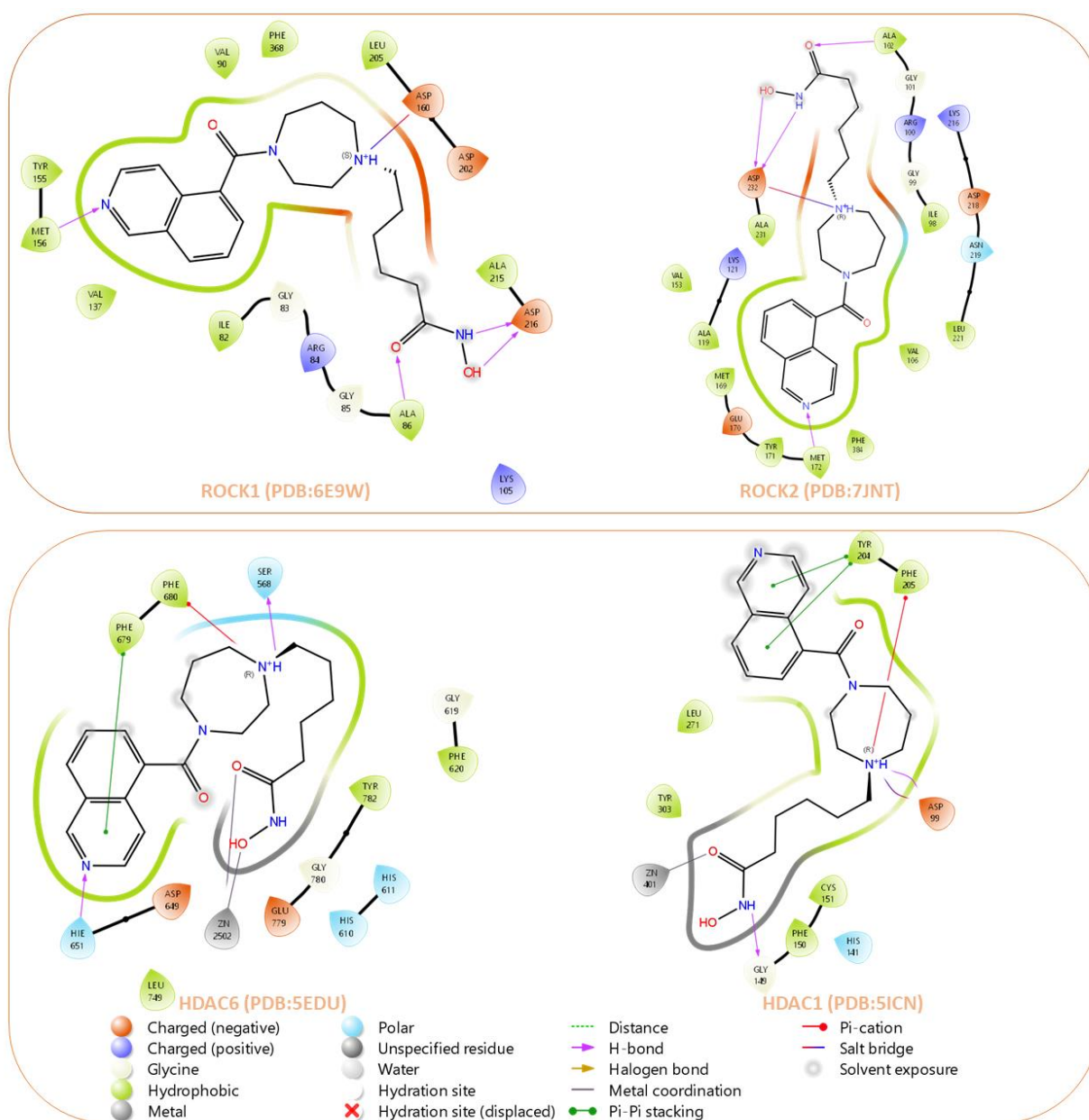
		7,19
CHEMBL3689461	CCS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CCC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	6,87
CHEMBL3689458	CCS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CCCC(Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	6,96
CHEMBL3689462	CCS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CCC[C@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	7,23
		7,02
CHEMBL3689436	OCCOc1cccc(CN2CC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	5,89
CHEMBL3689428	OCCOc1cccc(CN2CC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	6,19
CHEMBL3689434	OCCOc1cccc(CN2CC[C@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	6,33
		6,14
CHEMBL3689433	CS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CCC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	7
CHEMBL3689392	CS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CCCC(Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	7,2
CHEMBL3689431	CS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CCC[C@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	7,31
		7,17
CHEMBL3689463	O=C(O)COc1cccc(CN2CCC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	6,06
CHEMBL3689426	O=C(O)COc1cccc(CN2CCCC(Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	6,51
		6,29
CHEMBL3689487	c1cc(CN2CC[C@H](Nc3cccc4ncccc34)C2)cc(C2CC2)c1	4,8
CHEMBL3689484	c1cc(CN2CC[C@@H](Nc3cccc4ncccc34)C2)cc(C2CC2)c1	6,09
		5,45
CHEMBL3689413	Fc1ccc(CN2CCC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)cc1F	6,96
CHEMBL3689412	Fc1ccc(CN2CCC[C@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)cc1F	7,23
		7,1
CHEMBL3689415	CSc1ccc(CN2CCC[C@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)cc1	7,13
CHEMBL3639795	CSc1ccc(CN2CCC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)cc1	7,14
CHEMBL3689352	CSc1ccc(CN2CCCC(Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)cc1	7,18
		7,15
CHEMBL3689496	OCCOc1cccc(CN2CC[C@H](Nc3cccc4ncccc34)C2)c1	5,27
CHEMBL3689503	OCCOc1cccc(CN2CC[C@@H](Nc3cccc4ncccc34)C2)c1	7
		6,14
CHEMBL3689492	Cc1ccc(CN2CC[C@H](Nc3cccc4ncccc34)C2)cc1	6,1
CHEMBL3689422	Cc1ccc(CN2CC[C@@H](Nc3cccc4ncccc34)C2)cc1	7,52

		6,81
CHEMBL3689490	CSc1ccc(CN2CC[C@@H](Nc3cccc4cnccc34)C2)cc1	5,2
CHEMBL3689493	CSc1ccc(CN2CC[C@H](Nc3cccc4cnccc34)C2)cc1	5,5
		5,35
CHEMBL3689499	CS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CC[C@H](Nc3cccc4cnccc34)C2)c1	5,49
CHEMBL3689502	CS(=O)(=O)Nc1cccc(CN2CC[C@@H](Nc3cccc4cnccc34)C2)c1	6,95
		6,22
CHEMBL3689456	C[C@@H](O)COc1cccc(CN2CCC[C@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	5,85
CHEMBL3689454	C[C@@H](O)COc1cccc(CN2CCC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	6,06
		5,96
CHEMBL3689483	c1cc(N[C@H]2CCN(Cc3ccc(C4CC4)cc3)C2)c2cncc2c1	5,39
CHEMBL3689486	c1cc(N[C@@H]2CCN(Cc3ccc(C4CC4)cc3)C2)c2cncc2c1	6,51
		5,95
CHEMBL3689494	Clc1ccc(CN2CC[C@H](Nc3cccc4cnccc34)C2)cc1	5,61
CHEMBL3689491	Clc1ccc(CN2CC[C@@H](Nc3cccc4cnccc34)C2)cc1	6,92
		6,27
CHEMBL3689432	OCCOc1cccc(CN2CCC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	6,39
CHEMBL3689381	OCCOc1cccc(CN2CCCC(Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)c1	6,48
		6,44
CHEMBL3689416	C#Cc1ccc(CN2CCC[C@@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)cc1	6,96
CHEMBL3689376	C#Cc1ccc(CN2CCCC(Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)cc1	7,16
CHEMBL3689417	C#Cc1ccc(CN2CCC[C@H](Nc3ccc4[nH]ncc4c3)C2)cc1	7,28
		7,13
CHEMBL3680711	N[C@@H]1CCc2nc(NC(=O)c3cccc(CNC(=O)c4csc(-c5ccncc5)n4)c3)sc2C1	8,32
CHEMBL3680713	N[C@H]1CCc2nc(NC(=O)c3cccc(CNC(=O)c4csc(-c5ccncc5)n4)c3)sc2C1	8,96
		8,64
CHEMBL3680731	CN1CCc2ccc(NC(=O)c3cccc(CNC(=O)c4ccc(-c5cnco5)s4)c3)cc2C1	9
CHEMBL3680701	CN1CCc2nc(NC(=O)c3cccc(CNC(=O)c4ccc5cc(O)ccc5c4)c3)sc2C1	9,41
		9,21
CHEMBL3689498	OCCOc1cccc(CN2CCC[C@@H](Nc3cccc4cnccc34)C2)c1	5,4

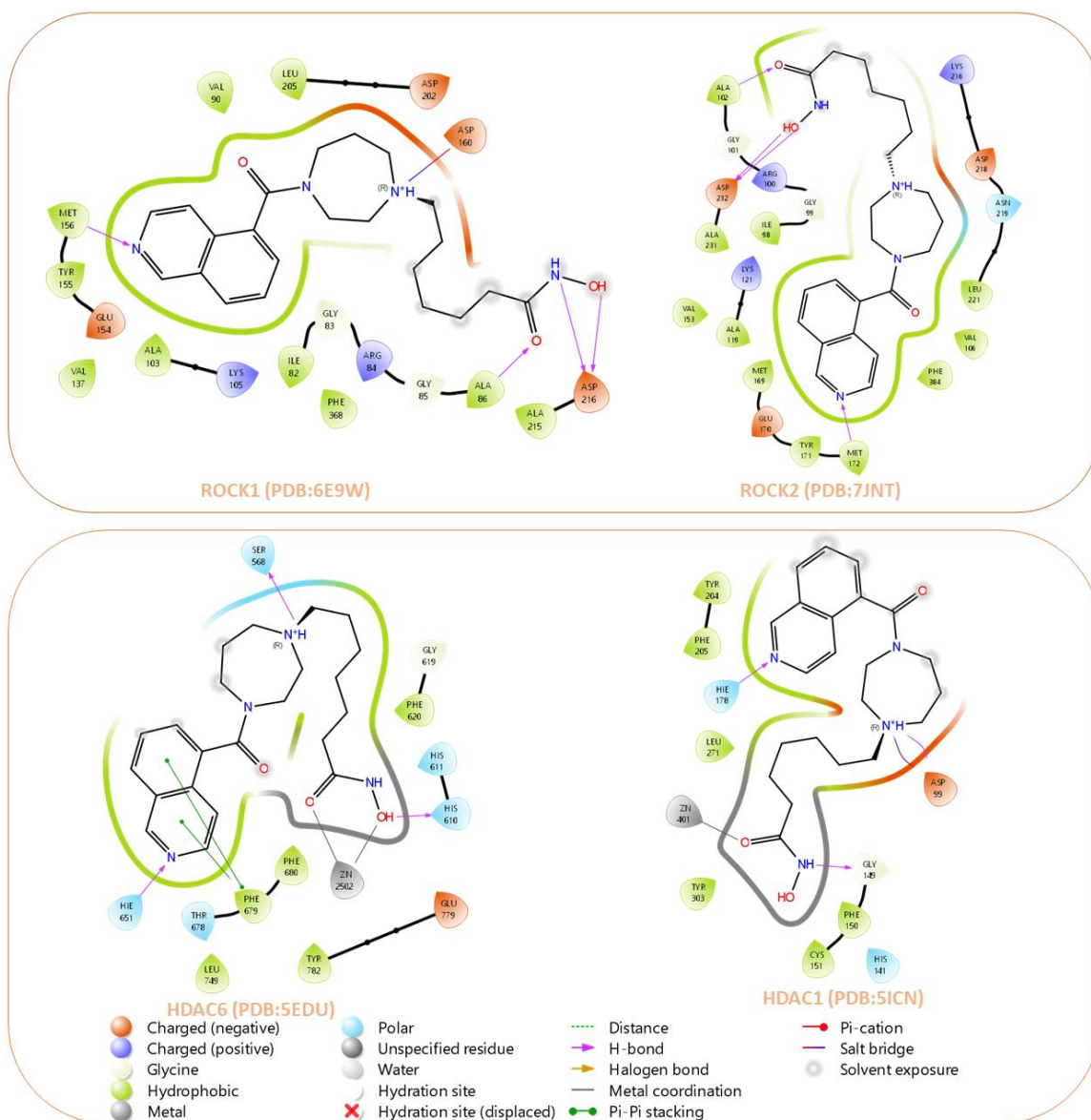
CHEMBL3689500	<chem>OCCOc1cccc(CN2CCC[C@H](Nc3cccc4cnccc34)C2)c1</chem>	6,8
		6,1
CHEMBL3689488	<chem>c1cc(N[C@H]2CCN(Cc3ccc(SC4CC4)cc3)C2)c2ccncc2c1</chem>	5,05
CHEMBL3689485	<chem>c1cc(N[C@@H]2CCN(Cc3ccc(SC4CC4)cc3)C2)c2ccncc2c1</chem>	5,72
		5,39

Table P3.4. Predviđene aktivnosti za već objavljene HDAC6 ili ROCK2 inhibitore

Jedinjenje	ROCK2(pIC ₅₀)exp	ROCK2pred	Razlika
10h*	6,59	7,25	-0,66
4e*	8,17	6,85	1,32
4i*	8,1	6,85	1,25
4j*	6,53	5,96	0,57
4m*	6,65	7,11	-0,46
ID	HDAC6(pIC ₅₀)exp	HDAC6pred	Razlika
10h*	9,39	7,51	1,88

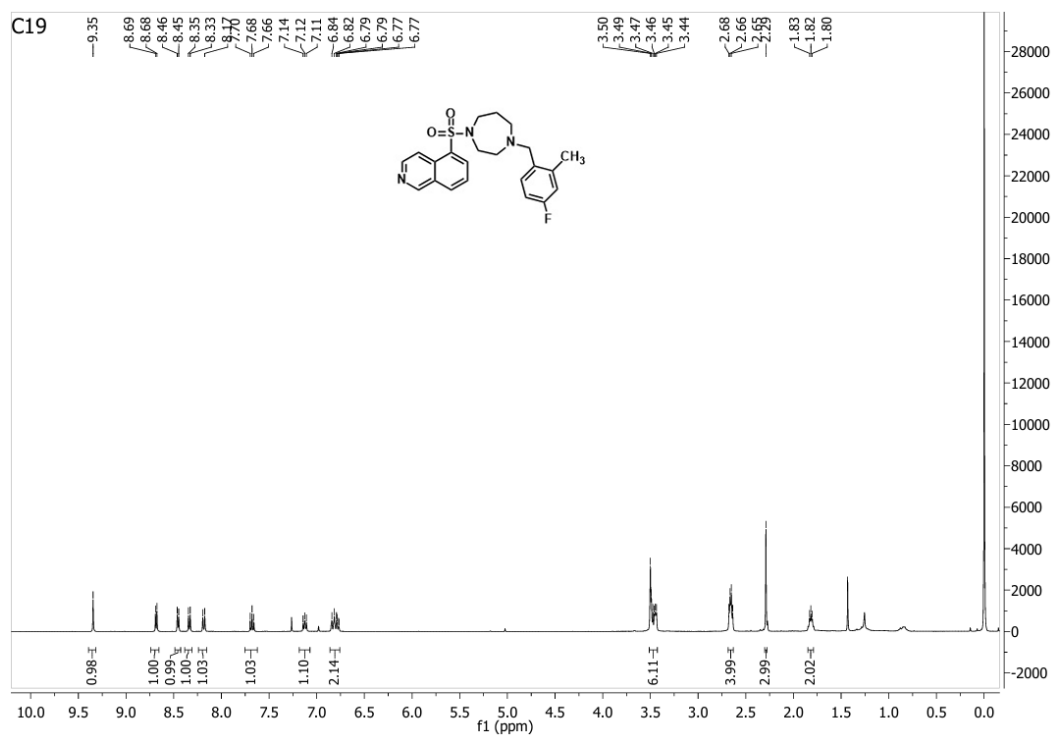


Slika P3.1. 2D-prikaz ključnih interakcija između C-85 and ROCK1, ROCK2, HDAC6 i HDAC1

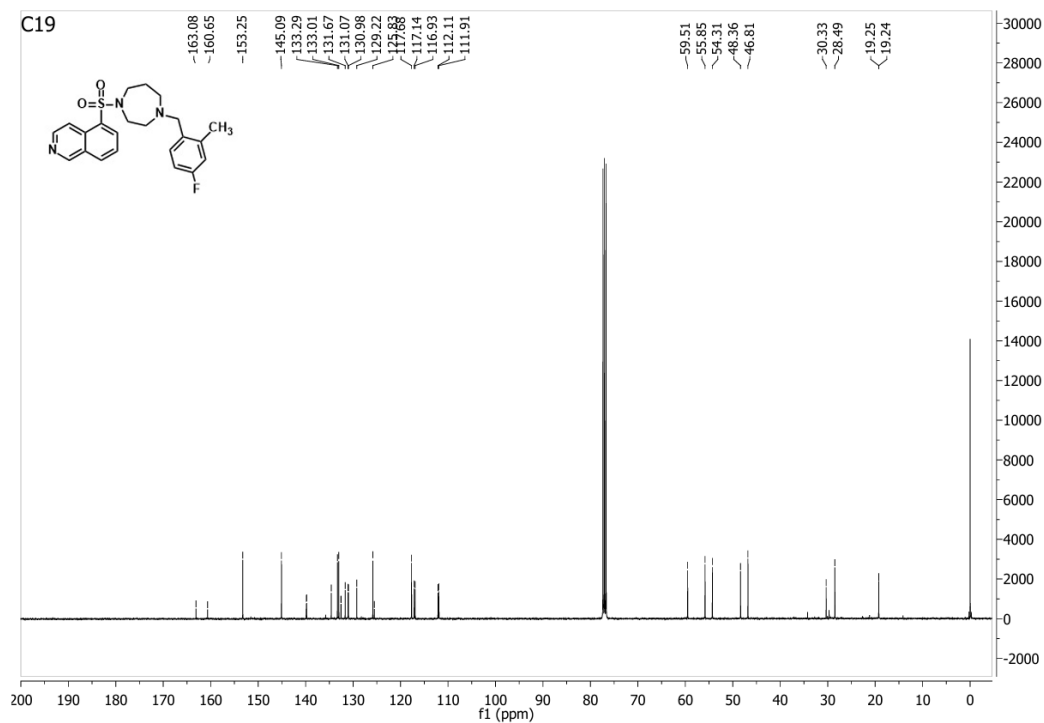


Slika P3.2. 2D-prikaz ključnih interakcija između C-86 and ROCK1, ROCK2, HDAC6 i HDAC1

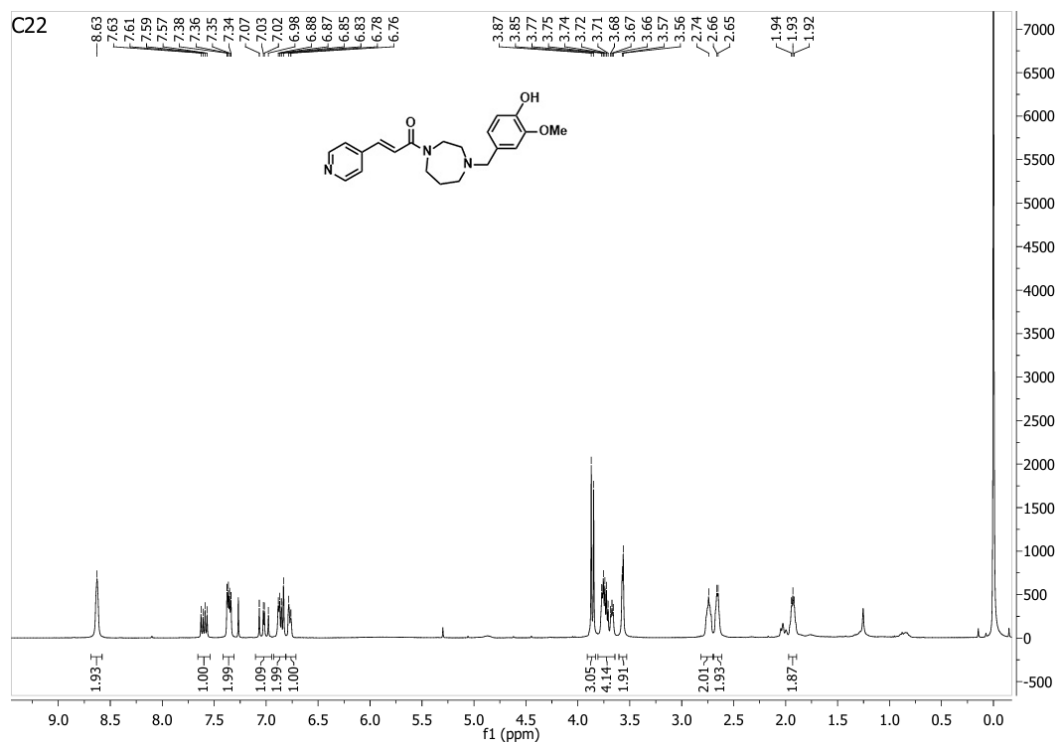
P4. ^1H i ^{13}C spektri potencialnih ROCK inhibitora



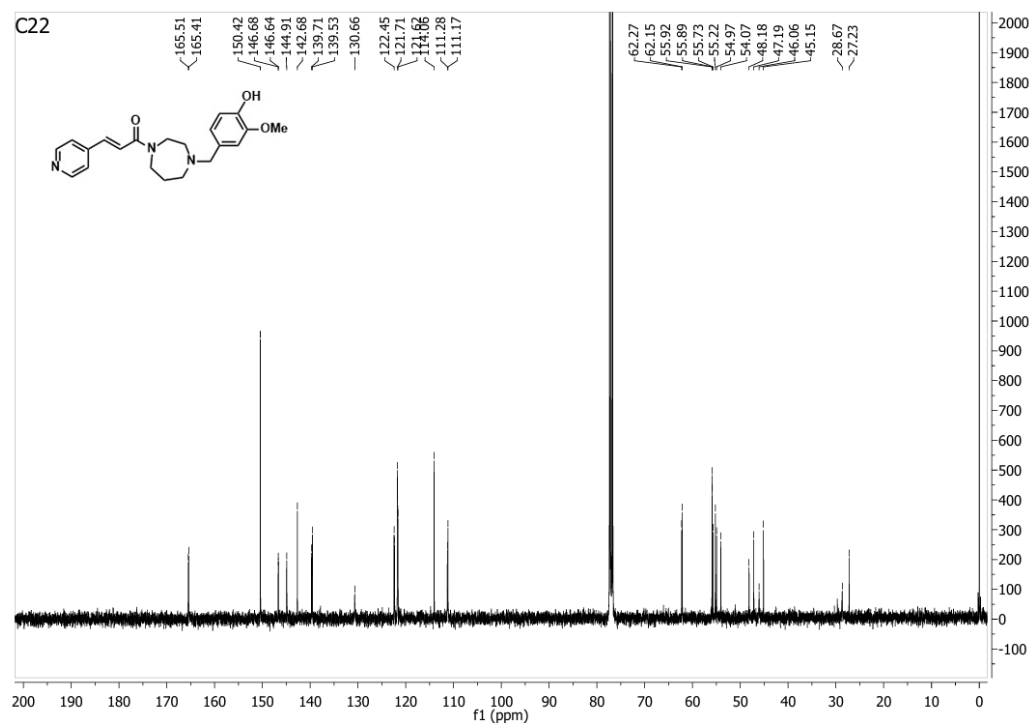
Slika P2.1. ^1H NMR spektar C-19



Slika P2.2. ^{13}C NMR spektar C-19.

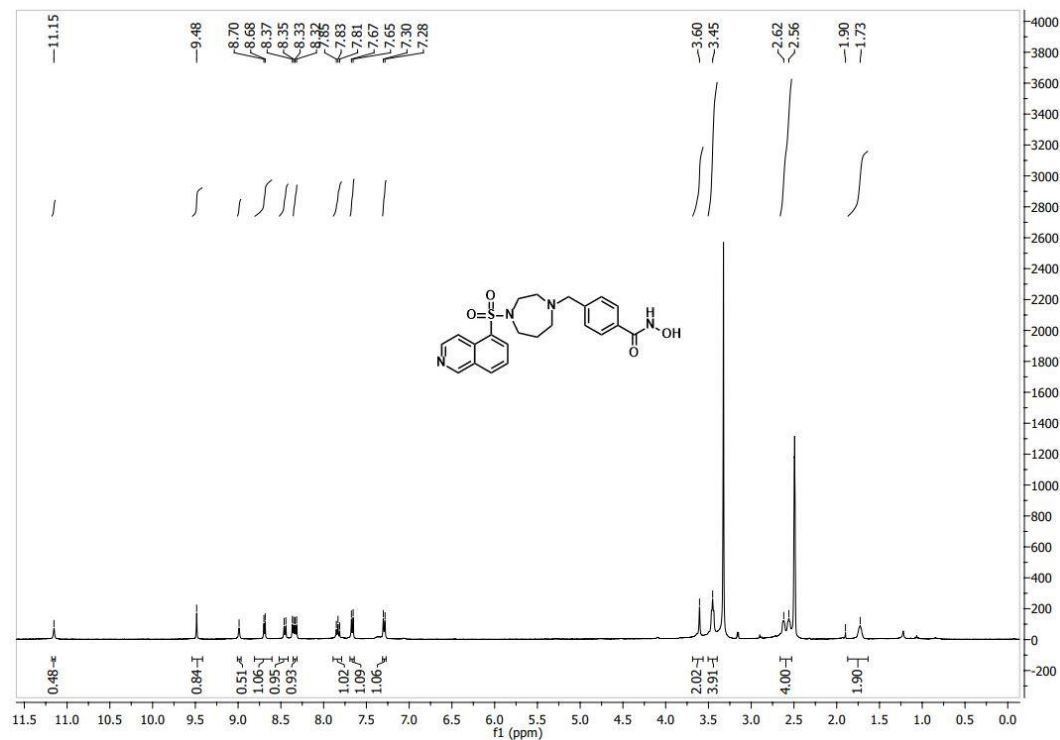


Slika P2.3. ¹H NMR spektar C-22

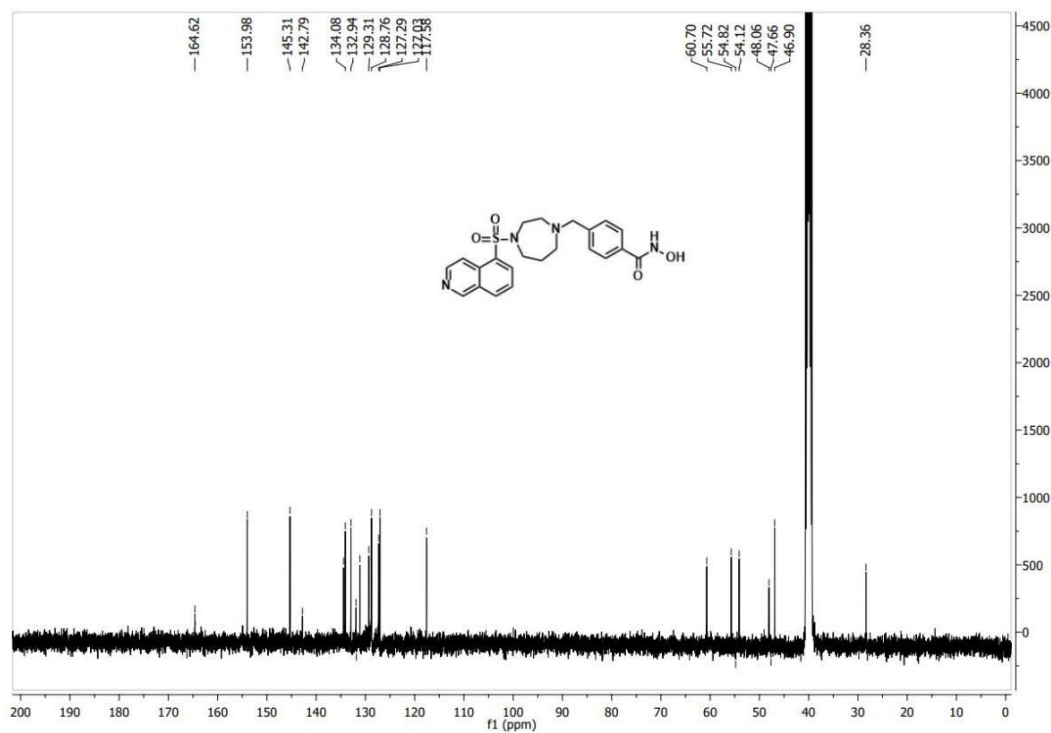


Slika P2.4. ¹³C NMR spektar C-22

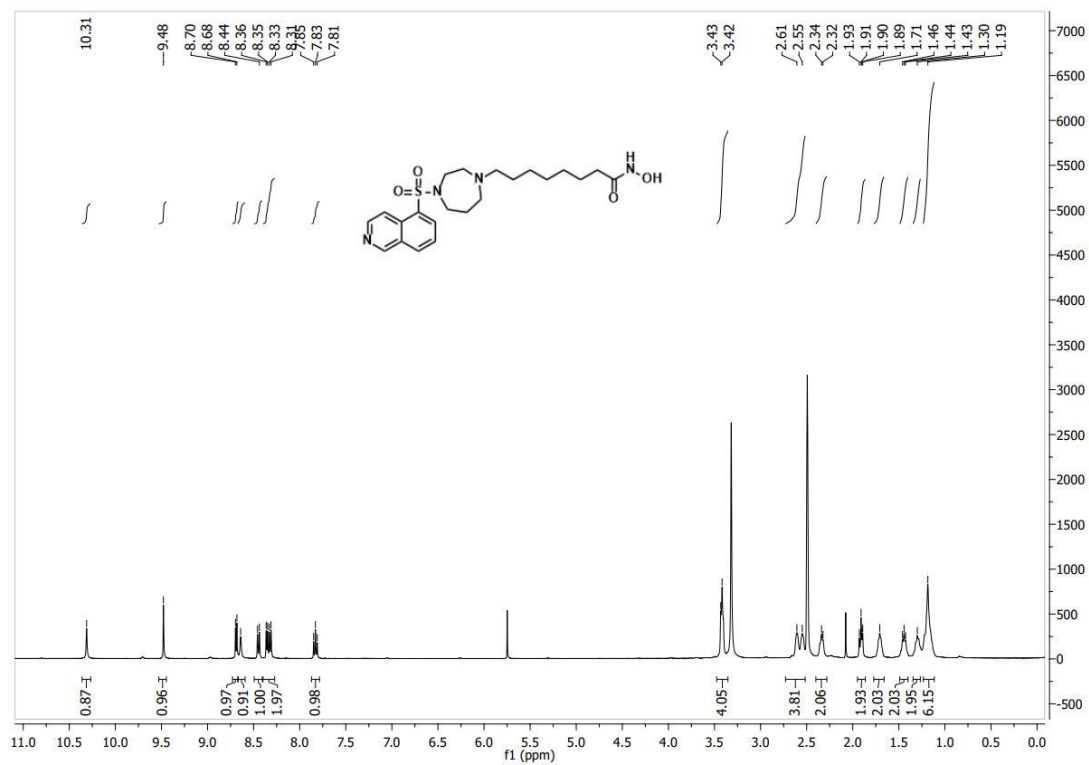
P3. ^1H , ^{13}C i maseni spektri najaktivnijih *multitarget* HDAC/ROCK inhibitora u ćelijskim ispitivanjima



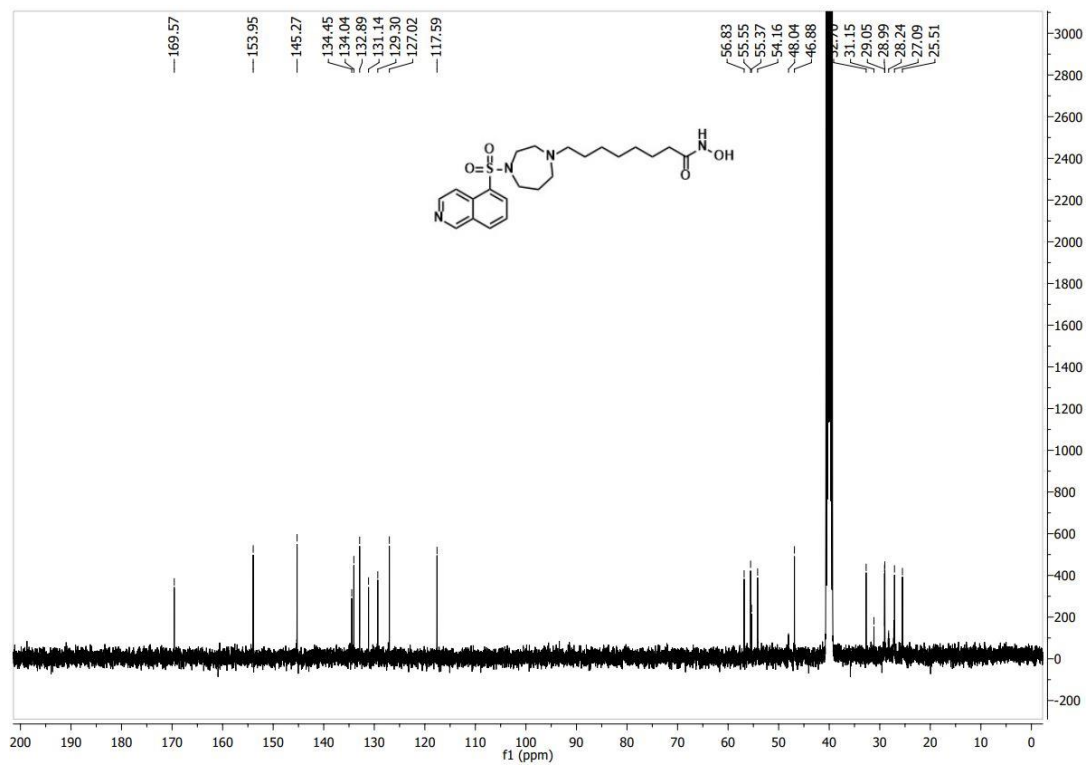
Slika P3.1. ^1H NMR spektar C-8.



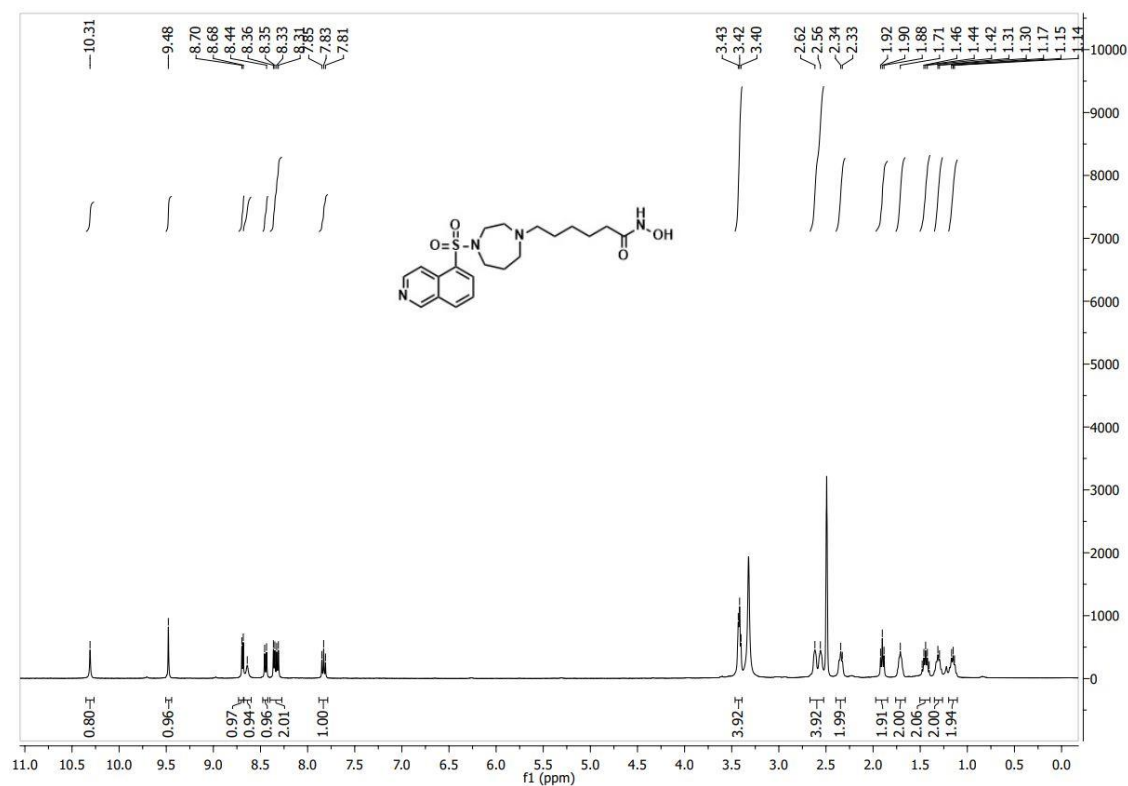
Slika P3.2. ^{13}C NMR spektar C-8.



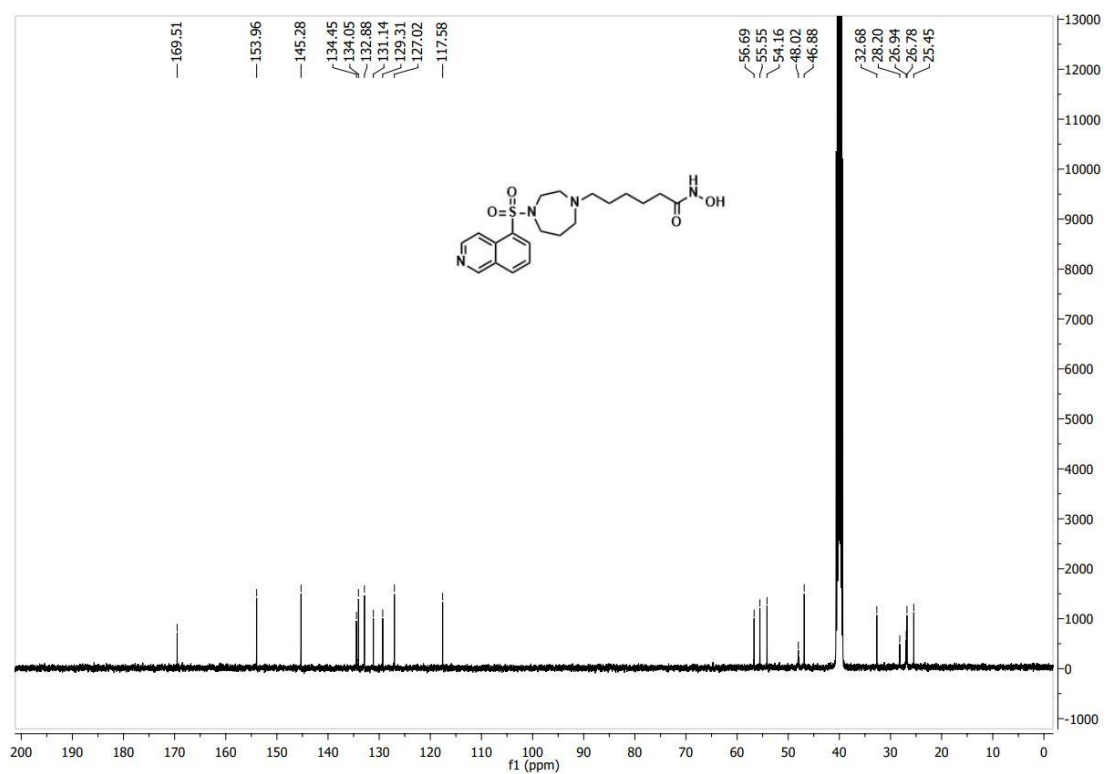
Slika P3.3. ^1H NMR spektar C-9.



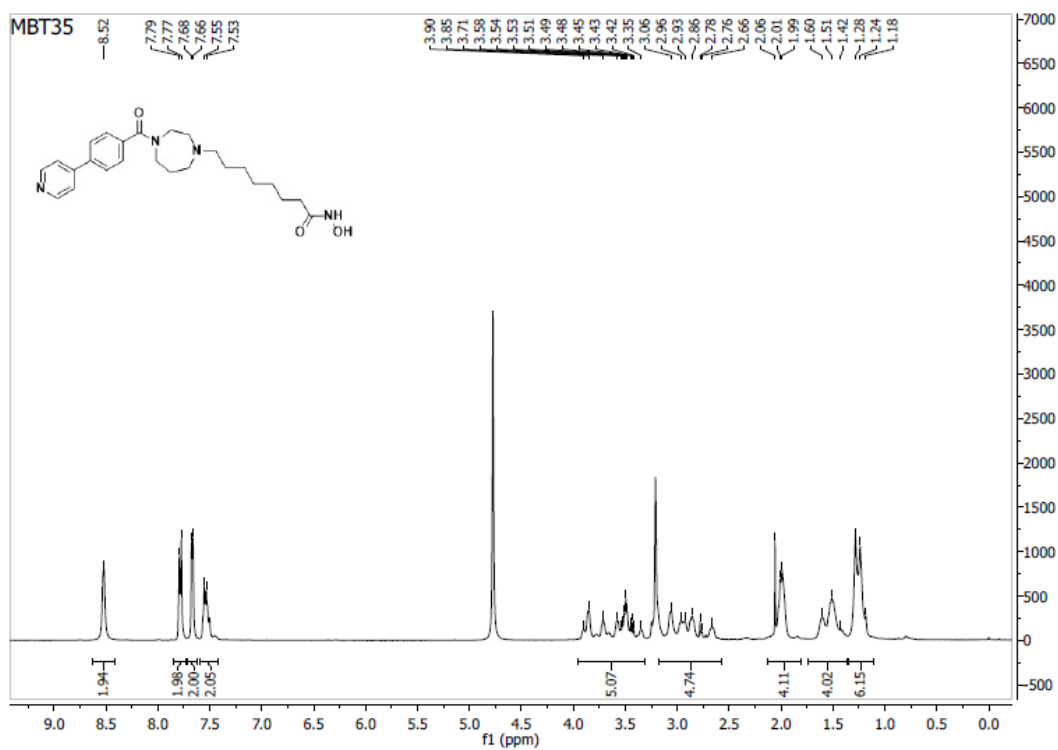
Slika P3.4. ^{13}C NMR spektar C-9.



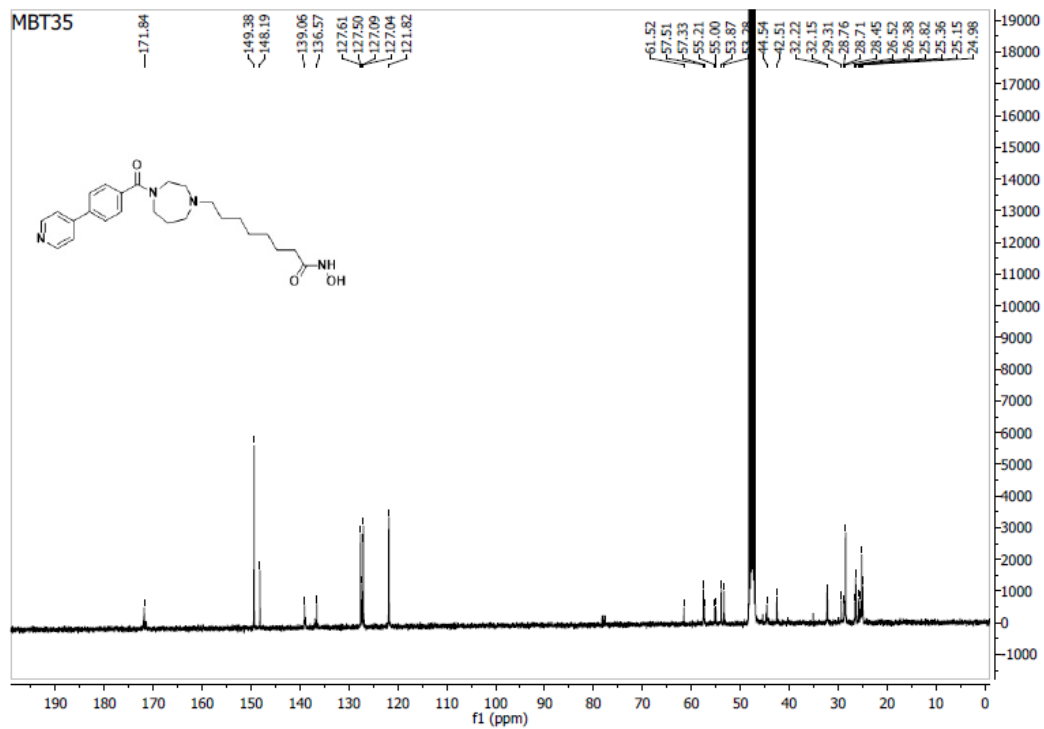
Slika P3.5. ^1H NMR spektar C-10



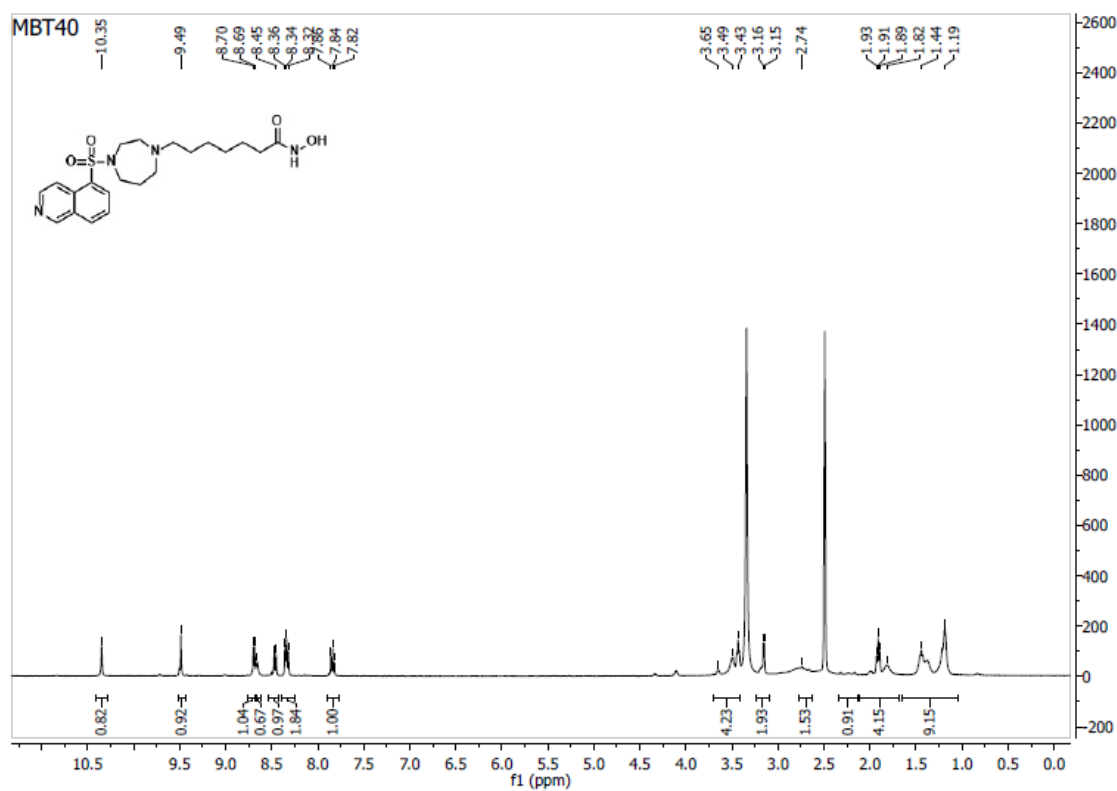
Slika P3.6. ^{13}C NMR spektar C-10.



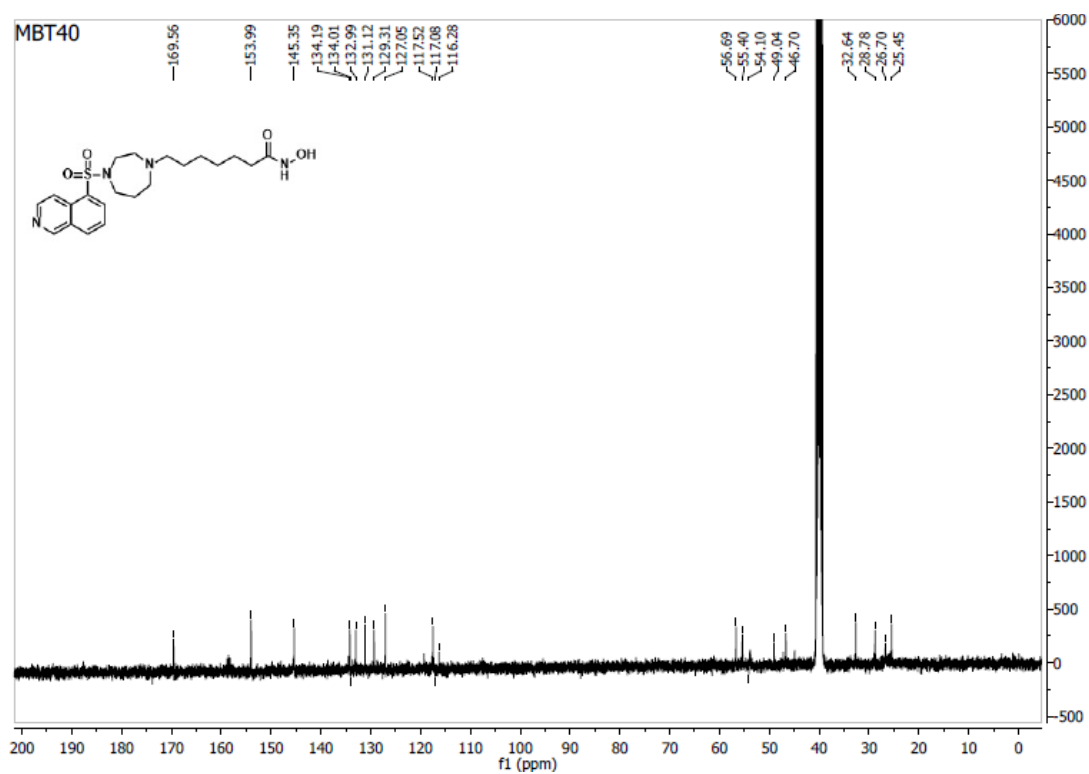
Slika P3.7. ¹H NMR spektar C-35.



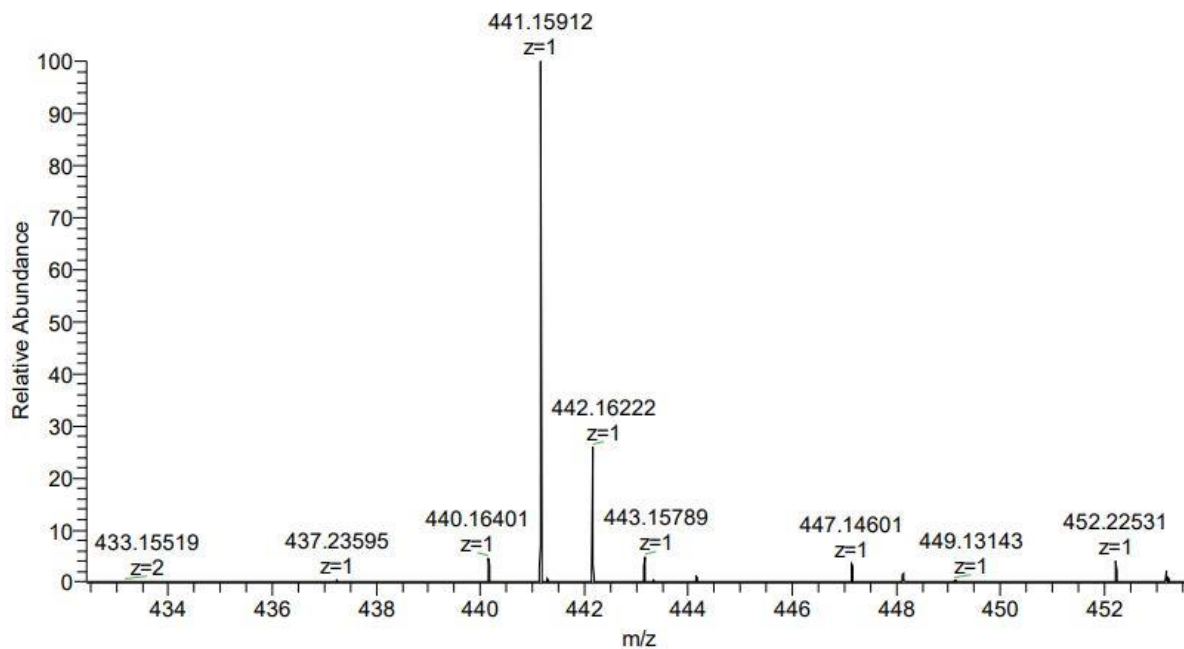
Slika P3.8. ¹³C NMR spektar C-35.



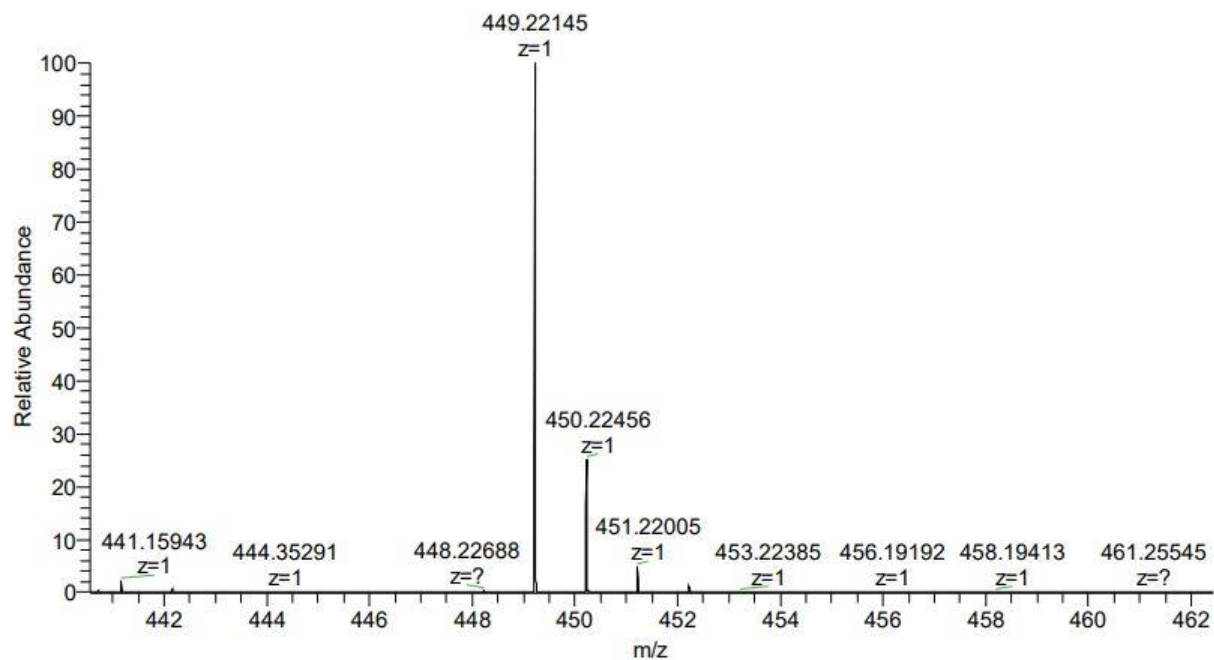
Slika P3.9. ^1H NMR spektar C-40.



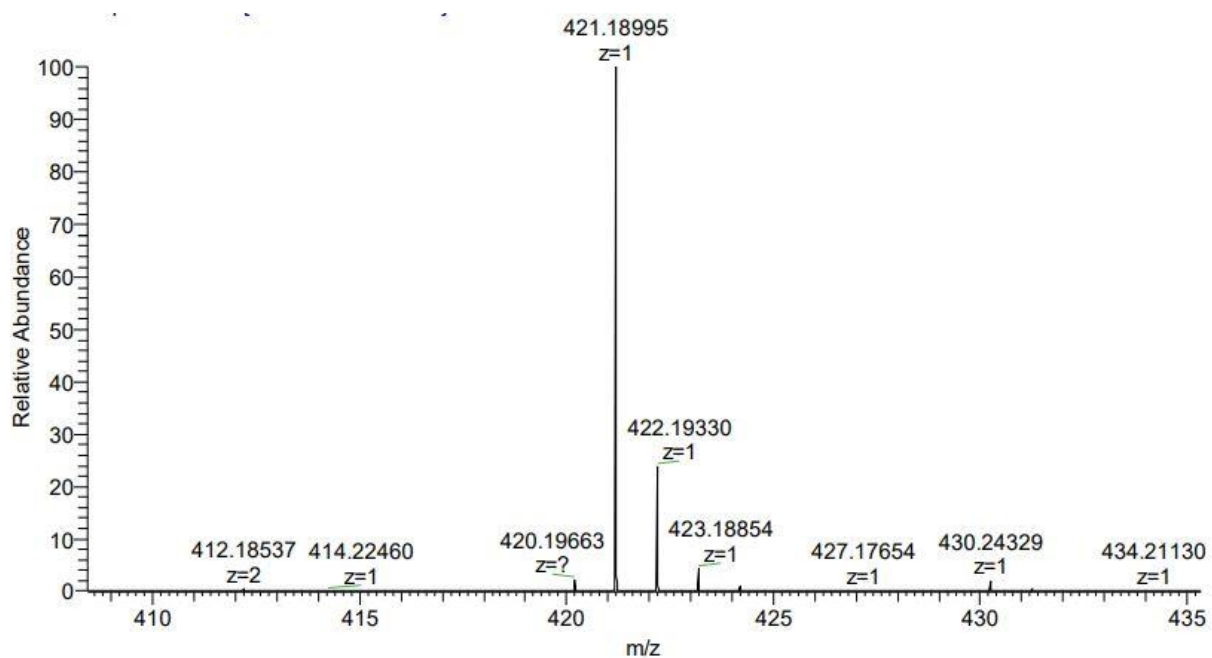
Slika P3.10. ^{13}C NMR spektar C-40.



Slika P3.11. Maseni spektar visoke rezolucije C-8.



Slika P3.12. Maseni spektar visoke rezolucije C-9.



Slika P3.13. Maseni spektar visoke rezolucije C-10.

Biografija autora

Milan Beljkaš je rođen 26.09.1996. u Pljevljima, Crna Gora. Osnovu školu i gimnaziju je završio u Pljevljima, nakon čega je upisao Farmaceutski fakultet, Univerziteta u Beogradu. Tokom svog studiranja Milan je 2016, 2017, 2018. i 2019. godine dobijao Godišnju nagradu najboljim studentima Farmaceutskog fakulteta. Nagrađen je i od strane Univerziteta u Beogradu kao najbolji student generacije Farmaceutskog fakulteta koji je diplomirao u školskoj 2019/2020. godini. Tokom studiranja je obavljao funkciju edukativnog koordinatora u okviru Studentske organizacije Farmaceutskog fakulteta (BPSA) i učestvovao na brojnim kongresima u organizaciji NAPS-a (Nacionalna Asocijacija Studenata Farmacije-Srbija) i EPSA-e (Evropska Asocijacija Studenata Farmacije). Za vrhunski doprinos u oblastima farmacije i medicinske biohemije dodeljena mu je nagrada Ivan Berkeš od strane Društva medicinskih biohemičara Srbije. Tema njegovog naučno-istraživačkog i završnog rada je „Molekularno modelovanje, sinteza i ispitivanje antimigratornih i antiinvazivnih osobina novih derivata 1-benzhidrilnog piperazina" koji je od strane Fonda Nenada M.Kostića proglašen kao najbolji iz oblasti hemijskih nauka. Nakon završetka integriranih studija, završio je staž u apoteci i upisao doktorske akademske studije na Farmaceutskoj hemiji, Farmaceutski fakultet - Univerziteta u Beogradu, gdje je trenutno i zaposlen kao istraživač-saradnik. Tokom doktorskih studija Milan je boravio na Pasterovom Institutu u Parizu u dva navrata sprovodeći dio svojih istraživanja. Takođe, dio disertacije je odradio tokom jednomjesečnog boravka na Hemijskom Institutu u Tartuu, Estonija. Učesnik je brojnih evropskih škola i konferencija iz oblasti kancera, kompjuterske i medicinske hemije u okviru kojih je predstavio rezultate svojih istraživanja. Njegov istraživački rad je usmjeren ka razvoju novih terapijskih pristupa u tretmanu tumora, dizajnu i sintezi novih potencijalnih antineoplastika i ispitivanjima njihovih bioloških efekata na različitim tumorskim ćelijama i enzimskim testovima. U okviru dosadašnjeg naučno-istraživačkog angažovanja je objavio sedam radova, i to: 1 rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrijednosti (M21a), 4 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21) i 2 rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22).

Spisak radova koji čine dio doktorske disertacije

Beljkaš, M.; Ruzic, D.; Djuric, A.; Vuletic, A.; Tchiche, G. N.; Jallet, C.; Cadet-Daniel, V.; Arimondo, P. B.; Santibanez, J. F.; Srdic-Rajic, T.; Nikolic, K.; Oljagic, S.; Petkovic, M. Pioneering First-in-Class HDAC-ROCK Inhibitors as Potential Multitarget Anticancer Agents. *Future Medicinal Chemistry* **2025**, 17(4), 393–407. <https://doi.org/10.1080/17568919.2025.2459589>. (M22, Chemistry, Medicinal (32/60), IF₂₀₂₃=3,2)

Beljkaš, M.; Petkovic, M.; Vuletic, A.; Djuric, A.; Santibanez, J.F.; Srdic-Rajic, T.; Nikolic, K.; Oljagic, S. Development of Novel ROCK Inhibitors via 3D-QSAR and Molecular Docking Studies: A Framework for Multi-Target Drug Design. *Pharmaceutics* **2024**, 16, 1250. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16101250>. (M21, Pharmacology and Pharmacy (45/274), IF₂₀₂₃=4,9)

Beljkaš, M.; Ilic, A.; Cebzan, A.; Radovic, B.; Djokovic, N.; Ruzic, D.; Nikolic, K.; Oljagic, S. Targeting Histone Deacetylases 6 in Dual-Target Therapy of Cancer. *Pharmaceutics* **2023**, 15, 2581. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112581>. (M21, Pharmacology and Pharmacy (45/274), IF₂₀₂₃=4,9).

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Milan Beljkaš

Broj indeksa: 9/20

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Određivanje strukture farmakofore, dizajn, sinteza i *in vitro* ispitivanje dualnih inhibitora histon deacetilaza (HDAC) i Rho-vezanih protein kinaza (ROCK)

- 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, 02.06.2025.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Milan Beljkaš

Broj indeksa: 9/2020

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada: Određivanje strukture farmakofore, dizajn, sinteza i *in vitro* ispitivanje dualnih inhibitora histon deacetilaza (HDAC) i Rho-vezanih protein kinaza (ROCK)

Mentori:

- 1) Prof. dr Slavica Oljačić, vanredni profesor na Katedri za farmaceutsku hemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
- 2) Prof. dr Miloš Petković, vanredni profesor na Katedri za organsku hemiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**. Dozvoljavam da se objave moji lični podaci u vezi sa dobijanjem 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, 02.06.2025.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković” da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Određivanje strukture farmakofore, dizajn, sinteza i *in vitro* ispitivanje dualnih inhibitora histon deacetilaza (HDAC) i Rho-vezanih protein kinaza (ROCK)

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao 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.

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, 02.06.2025.

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.