

Факултет Фармацеутски

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

01 број 2259/1-1
(Број захтева)Већу научних области медицинских наука
(Назив већа научне области коме се захтев упућује)10.09.2026.
(Датум)**ЗАХТЕВ**

за давање сагласности на одлуке о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и о именовању комисије за одбрану

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације:

КАНДИДАТ МЛАДЕН (ДЕЈАН) КОРАВОВИЋ
(име, име једног од родитеља и презиме)

студент докторских студија на студијском програму ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ СТУДИЈЕ, ФАРМАЦЕУТСКЕ НАУКЕ, ФАРМАЦЕУТСКА ХЕМИЈА

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и BET протеина“

из научне области: ФАРМАЦЕУТСКА ХЕМИЈА

Универзитет је дана 30.11.2021.године својим актом под бр. 02-01 број 61206-4569/2-21 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила:

„Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и BET протеина“

Име и презиме ментора : 1.Др сц. Владимир Савић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Органска хемија)
2.Др сц. Бојан Марковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Медицински факултет (Ужа научна област: Фармацеутска-медицинска хемија и структурна анализа)

Комисија за оцену докторске дисертације именована је на седници одржаној 14.05.2026.године одлуком факултета под бр. 01 бр.1078/2, у саставу:

Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
---------------------------------	-------	---------------	---------------------------------

1. Др сц. Катарина Николић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Фармацеутска-медицинска хемија и структурна анализа)
2. Др сц. Гордана Тасић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Органска хемија)
3. Др сц. Милена Ковачевић, доцент, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Фармакокинетика и клиничка фармакологија)
4. Др сц. Тајана Срдих-Рајић, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије (Ужа научна област: Експериментална онкологија)

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

Датум стављања извештаја Комисије и докторске дисертације на увид јавности: 18.06.2026.године.

Наставно-научно веће факултета усвојило је извештај Комисије за оцену докторске дисертације наследници одржаној дана 10.09.2026.године.

Комисија за одбрану докторске дисертације именована је на седници одржаној 14.05.2026.године

одлуком факултета под бр. 01 број 1078/2, у саставу:

Име и презиме члана комисије	звање	научна област	Установа у којој је запослен
1. <u>Др сц. Катарина Николић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Фармацеутска-медицинска хемија и структурна анализа)</u>			
2. <u>Др сц. Гордана Тасић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Органска хемија)</u>			
3. <u>Др сц. Милена Ковачевић, доцент, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Фармакокинетика и клиничка фармација)</u>			
4. <u>Др сц. Татјана Срдић-Рајић, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије (Ужа научна област: Експериментална онкологија)</u>			

Напомена: уколико је члан Комисије у пензији навести датум пензионисања.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

- Прилози:
1. Одлука Наставно-научног већа о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације и одлука о именовању Комисије за одбрану докторске дисертације
 2. Извештај Комисије о оцени докторске дисертације
 3. Примедбе на извештај Комисије о оцени докторске дисертације (уколико их је било) и мишљење Комисије о примедбама

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
11000 - БЕОГРАД
Ул. Војводе Степе 450.
01. број 2259/1
10.09.2026. године

На основу члана 28. Статута и предлога Комисије за последипломске студије – докторске студије, Наставно-научно веће Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета на седници одржаној 10.09.2026.године, донело је

О Д Л У К У

ПРИХВАТА СЕ позитиван извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације, кандидата **маг.фармације Коравовић Младена** под насловом: „**Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и BET протеина**“ и упућује Већу научних области медицинских наука на усвајање, а по добијеној писаној сагласности одобрава јавна одбрана пред Комисијом у саставу:

1. Др сц. Катарина Николић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Фармацеутска-медицинска хемија и структурна анализа)
2. Др сц. Гордана Тасић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Органска хемија)
3. Др сц. Милена Ковачевић, доцент, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет (Ужа научна област: Фармакокинетика и клиничка фармација)
4. Др сц. Татјана Срдић-Рајић, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије (Ужа научна област: Експериментална онкологија)

Универзитет је дана 30.11.2021.године својим актом бр.: 02-01 бр: 61206-4569/2-21 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

Кандидат маг. фарм. Младен Коравовић, објавио је резултате из ове докторске дисертације у једном раду категорије M21a и једном раду категорије M23 у међународним часописима са СЦИ листе:

1. **Koravovic, M.;** Mayasundari, A.; Tasic, G.; Keramatnia, F.; Stachowski, T.R.; Cui, H.; Chai, S.C.; Jonchere, B.; Yang, L.; Li, Y.; et al. From PROTAC to Inhibitor: Structure-Guided Discovery of Potent and Orally Bioavailable BET Inhibitors. Eur. J. Med. Chem. 2023, 251, 115246, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115246.

IF (2023) = 6,0; Chemistry, Medicinal (8/72) M21a

2. **Koravović, M.;** Kovačević, M.; Jovanović, M.; Tasić, G.; Mayasundari, A.; Nishiguchi, G.; Marković, B.; Ranković, Z.; Savić, V. Comparative in Silico/in Vitro Analysis of Pharmacokinetic Profiles of BET Inhibitors. J. Serbian Chem. Soc. 2025, 90, 837–856.

IF (2024) = 0,7; Chemistry, Multidisciplinary (201/239) M23

Одлуку доставити: кандидату, Универзитету, члановима комисије, декану, секретару, продекану за последипломске студије, менторима (проф др. Владимир Савић и проф др. Бојан Марковић), Одсеку за наставу и студентска питања, Одсеку за правне и опште послове, пословном секретару, председнику Комисије за последипломске студије – докторске студије (Проф. др Биљана Антонијевић) и архиви.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ФАРМАЦЕУТСКОГ
ФАКУЛТЕТА**

**Проф. др Наташа Богавац
Станојевић**

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ – ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА

КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКЕ СТУДИЈЕ – ДОКТОРСКЕ АКАДЕМСКЕ
СТУДИЈЕ

ПРЕДМЕТ: ИЗВЕШТАЈ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ ЗАВРШЕНЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Одлуком Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета 01. број 1078/2 донетој на седници одржаној 14.5.2026. именована је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата Младена Коравовића, магистра фармације, под називом „Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и BET протеина“, у следећем саставу:

- 1) Др сц. Катарина Николић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет (ужа научна област: Фармацеутска-медицинска хемија и структурна анализа)
- 2) Др сц. Гордана Тасић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет (ужа научна област: Органска хемија)
- 3) Др сц. Милена Ковачевић, доцент, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет (ужа научна област: Фармакокинетика и клиничка фармација)
- 4) Др сц. Татјана Срдић-Рајић, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије (ужа научна област: Експериментална онкологија)

Ментори докторске дисертације су др сц. Владимир Савић, редовни професор Катедре за органску хемију Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета (ужа научна област: Органска хемија), и др сц. Бојан Марковић, редовни професор Катедре за фармацеутску хемију Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета (ужа научна област: Фармацеутска-медицинска хемија и структурна анализа).

Комисија у наведеном саставу прегледала је докторску дисертацију и сачинила Извештај у складу са чланом 23. Правилника о докторским академским студијама Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета који подноси Наставно-научном већу.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
СЕКРЕТАРИЈАТ

Примљено: 12.06.2026.			
Срг. јед.	Број	Прилог	Вредност
01	107813		

1. ОСНОВНИ ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ И ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Кандидат: Младен Коравовић

Тренутно стручно/академско звање кандидата: магистар фармације

Установа: Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Наслов докторске дисертације: „Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и BET протеина“

Достављена електронска верзија дисертације садржи 263 стране у PDF формату. Основни текст је организован у седам нумерисаних поглавља: 1. Увод, 2. Циљеви истраживања, 3. Експерименти, 4. Резултати и дискусија, 5. Закључак, 6. Литература и 7. Прилози. Према нумерацији у тексту, дисертација садржи 66 слика, 36 табела и 39 шема.

На почетку достављене дисертације налазе се насловне стране на српском и енглеском језику, подаци о менторима и члановима Комисије за одбрану докторске дисертације, захвалница, сажетак на српском и енглеском језику, листа скраћеница и садржај.

2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉЕВИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Предмет дисертације јесте дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула усмерених на протеин топлотног шока 90 (енг. *Heat Shock Protein 90*, HSP90) и протеине са бромодоменом и екстра-терминалним доменом (енг. *Bromodomain and Extra-Terminal Domain Proteins*, BET протеине). Истраживање обухвата две истраживачке целине: а) развој молекула заснованих на стратегијама циљане деградације протеина, односно PROTAC (енг. *Proteolysis-Targeting Chimera*) и НуТ (енг. *Hydrophobic Tagging*) молекула усмерених на HSP90 и б) развој оптимизованих инхибитора мале молекулске масе усмерених на BET протеине.

Циљеви дисертације су следећи:

- дизајн и синтеза PROTAC и НуТ молекула усмерених на HSP90 користећи кристалографске податке и три класе лиганата за HSP90;
- биолошка и фармакокинетичка карактеризација синтетисаних молекула усмерених на HSP90, уз планирано механистичко испитивање најактивнијих једињења и процену одабраних физичко-хемијских и фармакокинетичких својстава;
- развој амида изведених из (+)-JQ1 као инхибитора BET протеина и процена њиховог везивања за бромодомене и ефеката у ћелијама;
- фармакокинетичка евалуација инхибитора BET протеина, укључујући *in vitro* профилисање, *in vivo* фармакокинетичку процену најактивнијег једињења, поређење *in silico* и *in vitro* параметара и кристалографска испитивања одабраних једињења.

3. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Дисертација је организована у седам поглавља и обухвата теоријски увод, дефинисање циљева, опис експерименталних поступака, приказ и дискусију резултата, закључке, литературу и прилоге. Структура дисертације омогућава праћење истраживачког тока, од концепта циљане деградације протеина и избора биолошких таргета, до синтезе, биолошке евалуације и фармакокинетичке процене испитиваних једињења.

Поглавље „Увод“ обухвата десет тематских целина. У њима су размотрени фармакологија традиционалних инхибитора, терапијски приступи изван класичне инхибиције, фармаколошки модели засновани на окупираности циљних протеина и на покретању догађаја који доводе до разградње циљних протеина, концепт циљане деградације протеина, убиквитин-протеазом систем, PROTAC молекули, молекулски лепкови, НуТ молекули, значај HSP90 и улога ВЕТ протеина као епигенетских регулатора.

Поглавље „Циљеви истраживања“ дефинише општи циљ и четири истраживачка циља која обухватају дизајн, синтезу и структурну евалуацију молекула усмерених на HSP90 и ВЕТ протеине, биолошку карактеризацију и фармакокинетичко профилисање.

Поглавље „Експерименти“ обухвата опис општих синтетичких и аналитичких поступака, дизајн и синтезу PROTAC молекула усмерених на HSP90 заснованих на три различита скелета, дизајн и синтезу НуТ молекула усмерених на HSP90 и једињења усмерених на ВЕТ протеине. У истом поглављу описани су TR-FRET (енг. *Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer*) тестови за испитивање везивања једињења за HSP90 α и бромодомене ВЕТ протеина, CTG (енг. *CellTiter-Glo*) тест вијабилности ћелија, тестови стабилности у плазми и физиолошком раствору пуферованом фосфатима, тест растворљивости, тест пропустљивости паралелне вештачке мембране (енг. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA), тест на Сасо-2 ћелијама, испитивање везивања за протеине плазме, испитивање микрозомалне стабилности, *in silico* и *in vivo* фармакокинетичко профилисање, процена селективности, анализа нивоа α -Мус Western blot анализом и кристалографска анализа. Сви молекули обухваћени дисертацијом дизајнирани су и синтетисани на Катедри за органску хемију Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета. Део експерименталног рада који се односи на физичко-хемијску, биолошку и фармакокинетичку карактеризацију молекула реализован је током истраживачког боравка кандидата у *St. Jude Children's Research Hospital* (Мемфис, САД) у оквиру Програма сарадње српске науке са дијаспором: ваучери за размену знања Фонда за науку Републике Србије (акроним: *DeSyHPRO*, евиденциони број: 6463913), као и кроз настављену научну сарадњу између наведених установа.

Поглавље „Резултати и дискусија“ подељено је на три главне целине: PROTAC молекуле усмерене на HSP90, НуТ молекуле усмерене на HSP90 и једињења усмерена на ВЕТ протеине. У оквиру овог поглавља приказани су резултати синтезе, биохемијских тестова, тестова на ћелијама и испитивања физичко-хемијских и фармакокинетичких параметара, као и интегрисана процена једињења.

Поглавље „Закључак“ садржи једанаест закључака који су груписани према истраживачким целинама. Наведено је да су истраживања усмерена на HSP90 пружила молекуле за будућа механистичка испитивања. Што се тиче истраживања усмерених на ВЕТ протеине, посебно је издвојено једињење (85) као водеће.

Поглавље „Литература“ садржи 458 нумерисаних библиографских јединица.

Поглавље „Прилози“ садржи одобрење за коришћење резултата добијених кроз сарадњу са *St. Jude Children's Research Hospital* и оригинални извештај о фармакокинетичком профилисању једињења **(85)** у *in vivo* условима.

4. ПРЕГЛЕД РЕЗУЛТАТА ПРЕДСТАВЉЕНИХ У ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

У делу истраживања посвећеном PROTAC молекулима усмереним на HSP90, дизајн је заснован на три класе полазних лиганада за HSP90: пироло[2,3-*d*]пиримидинском, тиено[2,3-*d*]пиримидинском и 4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-индазолском скелету. Дисертација показује да је пиролопиримидински скелет најбоље очувао снажно везивање за HSP90, као и да су једињења **(3)** и **(7)** показала најбоље одговоре у CTG тесту на MV4-11 ћелијској линији. Код тиенопиримидинске серије очувано везивање за HSP90 није било праћено подједнако снажном активношћу у ћелијама. У серији заснованој на тетрахидроиндазолу, бензамидни лиганд био је супериорнији у односу на бензонитрилну алтернативу. Међутим, повољнија физичко-хемијска и фармакокинетичка својства бензонитрилног инхибитора нису надокнадила губитак афинитета према HSP90. Узевши у обзир да PROTAC молекули нису испољили фенотипски образац који би јасно захтевао објашњење усмерено на деградацију, директна мерења деградације HSP90 *Western blot* методом нису изведена. Међутим, добијени резултати омогућавају идентификацију скелета и појединачних једињења погодних за будућа механистичка испитивања.

У делу истраживања посвећеном НуТ молекулима усмереним на HSP90 синтетисано је шест молекула заснованих на тетрахидроиндазолском скелету, уз коришћење адамантанског хидрофобног обележја и варирање полазног лиганда и линкера. Резултати су показали да је бензамидни лиганд погоднији од бензонитрилног аналога за очување везивања за HSP90. Једињење **(65)** издвојено је као најуспешнији представник ове серије, са субмикромоларним везивањем за HSP90 и најизраженијим одговором у CTG тесту међу НуТ молекулима. Ипак, ниједан НуТ молекул није показао профил који би оправдао даљу процену деградације HSP90 *Western blot* методом.

У делу рада посвећеном BET протеинима, кристалографска анализа PROTAC молекула **(71)** у комплексу са BRD2(BD2) послужила је као основа за дизајн амида изведених из (+)-JQ1. Додатне интеракције у близини амидног региона биле су полазиште за оптимизацију нових лиганада. Неколико хетероцикличних амида показало је повољније резултате везивања у односу на (+)-JQ1 и бирабресиб у TR-FRET тесту, а једињење **(85)** издвојено је као један од најпотентнијих лиганада за бромодомене у испитиваном скупу. Испитана је и селективност једињења **(85)**, где је показано да се везује за свих осам испитаних бромодомена BET протеина у наномоларном опсегу. Највећи афинитет утврђен је за BRD4(BD1), где је добијена K_D вредност од 0,4 nM. Додатно, једињење **(85)** је у MV4-11 ћелијама испољило очекивани ефекат снижења с-Мус. На нивоу фармакокинетичке процене, једињење **(85)** је показало веома повољан укупни профил, а *in vivo* тестирање на мишевима показало је низак клиренс након интравенске примене и високу оралну биорасположивост 60-70%. Ова *in vivo* фармакокинетичка испитивања обављена су услужно у компанији *Sai Life Sciences* (Хајдерабад, Индија) на основу уговора између ове компаније и *St. Jude Children's Research*

Hospital, а оригинални извештај о фармакокинетичком профилисању приложен је у дисертацији у Одељку 7.2. Компаративна анализа *in silico* и *in vitro* добијених фармакокинетичких параметара показала је да рачунарска предвиђања нису равномерно репродуковала експериментално добијене резултате. Предвиђања су била корисна као иницијални алат, док су тест на Сасо-2 ћелијама и испитивање микрозомалне стабилности били одлучујући за процену фармакокинетичке погодности једињења. Овакав интегрисани приступ довео је до избора једињења (85) за даљу *in vivo* евалуацију.

5. УПОРЕДНА АНАЛИЗА РЕЗУЛТАТА КАНДИДАТА СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

У делу истраживања посвећеном PROTAC молекулима усмереним на HSP90, најнепосредније поређење са литературом односи се на пироло[2,3-*d*]пиримидинску серију. *Liu* и сар. описали су PROTAC молекуле засноване на ВІВ021 као лиганду за HSP90 и издвојили ВР3 молекул као ефикасан деградер HSP90 у моделима карцинома дојке [1]. Пиролопиримидински PROTAC молекули (3) и (7) описани у дисертацији показали су недвосмислено очување везивања за HSP90, као и најизраженије одговоре у CTG тесту на MV4-11 ћелијама. Ови резултати су у складу са литературним подацима који показују да пиролопиримидински лиганд за HSP90 може бити погодан полазни елемент за дизајн PROTAC молекула усмерених ка овом протеину. Додатну потпору релевантности HSP90 као биолошког таргета PROTAC молекула пружају радови у којима су описани различити деградери HSP90. *Jiang* и сар. описали су X10g молекул као селективни деградер HSP90α у моделима карцинома дојке [2], док су *Wurnig* и сар. приказали развој првих деградера HSP90 заснованих на гелданамицину као природном инхибитору овог протеина [3]. У тумачењу потенцијалних ограничења PROTAC молекула који регрутују цереблон (CRBN), релевантан механистички контекст представља рад *Powell* и сар. у коме су описани молекули који индукују деградацију CRBN-а и омогућавају испитивање биологије ове Е3 лигазе [4]. Поред тога, у литератури су описани деградери који користе интерактом HSP90 за усмеравање других протеина ка деградацији, укључујући HEMTAC (енг. *HSP90-Mediated Targeting Chimeras*) и HIM-PROTAC (енг. *HSP90 Interactome-Mediated Proteolysis Targeting Chimera*) молекуле [5,6]. Ови подаци пружају механистички оквир за будућа испитивања PROTAC молекула усмерених на HSP90 који регрутују CRBN.

За НуТ молекуле усмерене на HSP90, литературна потпора односи се на концепт хидрофобног обележавања и на избор лиганада за HSP90. *Neklesa* и сар. су показали да мала хидрофобна група, попут адамантана, може да индукује деградацију протеина, чиме је експериментално установљен принцип хидрофобног обележавања [7]. Овај рад подржава избор адамантанског хидрофобног обележја као елемента НуТ молекула. Избор SNX-2112, као бензамидног лиганда за HSP90, заснован је на литературним подацима. *Zhao* и сар. одредили су кристалну структуру комплекса *N*-терминалног домена HSP90 и SNX-2112 и показали да се овај инхибитор смешта у АТП-везујући цеп HSP90 [8]. Осим тога, у дисертацији је директним експерименталним поређењем показано да су бензамидни НуТ молекули изведени из SNX-2112 били повољнији од бензонитрилних аналога изведених из инхибитора (37).

У делу истраживања усмереном на BET протеине, поређење са литературом је непосредније. *Min* и сар. описали су фенил-глутаримиде као алтернативне лиганде за CRBN у дизајну PROTAC молекула и приказали кристалографске податке за PROTAC молекул у комплексу са

BRD2(BD2) [9]. У дисертацији је овај структурни образац употребљен као полазиште за дизајн амида изведених из (+)-JQ1, при чему су резултати синтетисаних једињења поређени са (+)-JQ1 и бирабресибом као референтним инхибиторима. Развој потентних и орално биорасположивих инхибитора BET протеина изведених из (+)-JQ1 објављен је у оригиналном раду *Koravovic* и сар. [10]. Изведено је и поређење рачунарски предвиђених и експериментално одређених фармакокинетичких параметара. Софтвер *ADMETlab 2.0* је у литератури описан као интегрисана платформа за предвиђање физичко-хемијских, фармакокинетичких и токсиколошких својстава малих молекула [11], што подржава његову примену као алата за рано профилисање једињења. Компаративна *in silico/in vitro* анализа фармакокинетичких профила амида изведених из (+)-JQ1 објављена је у оригиналном раду *Koravović* и сар. [12].

1. Liu, Q.; Tu, G.; Hu, Y.; Jiang, Q.; Liu, J.; Lin, S.; Yu, Z.; Li, G.; Wu, X.; Tang, Y.; et al. Discovery of BP3 as an Efficacious Proteolysis Targeting Chimera (PROTAC) Degradation of HSP90 for Treating Breast Cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *228*, 114013, doi:10.1016/j.ejmech.2021.114013.
2. Jiang, Q.; Fu, M.; Tang, Y.; Li, G.; Tu, G.; Wu, X.; Wu, Q.; Huang, X.; Xu, J.; Liu, Y.; et al. Discovery of X10g as a Selective PROTAC Degradation of Hsp90 α Protein for Treating Breast Cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *260*, 115690, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115690.
3. Wurnig, S.; Vogt, M.; Hogenkamp, J.; Dienstbier, N.; Borkhardt, A.; Bhatia, S.; Hansen, F.K. Development of the First Geldanamycin-Based HSP90 Degradation. *Front. Chem.* **2023**, *11*, doi:10.3389/fchem.2023.1219883.
4. Powell, C.E.; Du, G.; Bushman, J.W.; He, Z.; Zhang, T.; Fischer, E.S.; Gray, N.S. Selective Degradation-Inducing Probes for Studying Cereblon (CRBN) Biology. *RSC Med. Chem.* **2021**, *12*, 1381–1390, doi:10.1039/D0MD00382D.
5. Li, Z.; Ma, S.; Zhang, L.; Zhang, S.; Ma, Z.; Du, L.; Li, M. Targeted Protein Degradation Induced by HEMTACs Based on HSP90. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 733–751, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01648.
6. Dong, J.; Ma, F.; Cai, M.; Cao, F.; Li, H.; Liang, H.; Li, Y.; Ding, G.; Li, J.; Cheng, X.; et al. Heat Shock Protein 90 Interactome-Mediated Proteolysis Targeting Chimera (HIM-PROTAC) Degrading Glutathione Peroxidase 4 to Trigger Ferroptosis. *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 16712–16736, doi:10.1021/acs.jmedchem.4c01518.
7. Neklesa, T.K.; Tae, H.S.; Schneekloth, A.R.; Stulberg, M.J.; Corson, T.W.; Sundberg, T.B.; Raina, K.; Holley, S.A.; Crews, C.M. Small-Molecule Hydrophobic Tagging-Induced Degradation of HaloTag Fusion Proteins. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 538–543, doi:10.1038/nchembio.597.
8. Zhao, D.; Xu, Y.-M.; Cao, L.-Q.; Yu, F.; Zhou, H.; Qin, W.; Li, H.-J.; He, C.-X.; Xing, L.; Zhou, X.; et al. Complex Crystal Structure Determination and in Vitro Anti-Non-Small Cell Lung Cancer Activity of Hsp90N Inhibitor SNX-2112. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, doi:10.3389/fcell.2021.650106.
9. Min, J.; Mayasundari, A.; Keramatnia, F.; Jonchere, B.; Yang, S.W.; Jarusiewicz, J.; Actis, M.; Das, S.; Young, B.; Slavish, J.; et al. Phenyl-Glutarimides: Alternative Cereblon Binders for the Design of PROTACs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 26663–26670, doi:10.1002/anie.202108848.
10. Koravovic, M.; Mayasundari, A.; Tasic, G.; Keramatnia, F.; Stachowski, T.R.; Cui, H.; Chai, S.C.; Jonchere, B.; Yang, L.; Li, Y.; et al. From PROTAC to Inhibitor: Structure-Guided Discovery of Potent and Orally Bioavailable BET Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *251*, 115246, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115246.
11. Xiong, G.; Wu, Z.; Yi, J.; Fu, L.; Yang, Z.; Hsieh, C.; Yin, M.; Zeng, X.; Wu, C.; Lu, A.; et al. ADMETlab 2.0: An Integrated Online Platform for Accurate and Comprehensive Predictions of ADMET Properties. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W5–W14, doi:10.1093/nar/gkab255.

12. Koravović, M.; Kovačević, M.; Jovanović, M.; Tasić, G.; Mayasundari, A.; Nishiguchi, G.; Marković, B.; Ranković, Z.; Savić, V. Comparative in Silico/in Vitro Analysis of Pharmacokinetic Profiles of BET Inhibitors. *J. Serbian Chem. Soc.* **2025**, *90*, 837–856.

6. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КАНДИДАТА

Рад у водећем међународном часопису категорије M21a

Koravović, M.; Mayasundari, A.; Tasic, G.; Keramatnia, F.; Stachowski, T.R.; Cui, H.; Chai, S.C.; Jonchere, B.; Yang, L.; Li, Y.; et al. From PROTAC to Inhibitor: Structure-Guided Discovery of Potent and Orally Bioavailable BET Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *251*, 115246, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115246.

IF (2023) = 6,0; област: *Chemistry, Medicinal* (8/72)

Радови у међународном часопису категорије M23

Koravović, M.; Marković, B.; Kovačević, M.; Rmandić, M.; Tasić, G. Protein Degradation Induced by PROTAC Molecules as an Emerging Drug Discovery Strategy: Survey. *J. Serbian Chem. Soc.* **2022**, *87*, 785–811, doi:10.2298/JSC211209027K.

IF (2024) = 1,0; област: *Chemistry, Multidisciplinary* (176/230)

Koravović, M.; Kovačević, M.; Jovanović, M.; Tasić, G.; Mayasundari, A.; Nishiguchi, G.; Marković, B.; Ranković, Z.; Savić, V. Comparative in Silico/in Vitro Analysis of Pharmacokinetic Profiles of BET Inhibitors. *J. Serbian Chem. Soc.* **2025**, *90*, 837–856.

IF (2024) = 0,7; област: *Chemistry, Multidisciplinary* (201/239)

Рад у водећем националном часопису категорије M51

Koravović, M.; Tasić, G.; Rmandić, M.; Marković, B. Photocontrollable PROTAC Molecules: Structure and Mechanism of Action. *Arh. Za Farm.* **2021**, *71*, 161–176, doi:10.5937/arhfarm71-30785.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)

Koravović, M.; Tasić, G.; Mayasundari, A.; Keramatnia, F.; Fischer, M.; Ranković, Z.; Savić, V. Sinteza i biološko profilisanje (+)-JQ1 amida kao BET inhibitora. *57. Savetovanje Srpskog hemijskog društva* **2021**, 86–86.

7. ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Научни допринос ове дисертације огледа се у систематичном повезивању дизајна, синтезе, биохемијске и ћелијске евалуације и фармакокинетичког профилисања малих органских молекула усмерених на HSP90 и BET протеине. Посебна вредност рада је у томе што резултати

нису тумачени искључиво кроз активност појединачних једињења, већ кроз односе између структуре, афинитета према циљном протеину, понашања у ћелијама и фармакокинетичких својстава.

У делу дисертације који се односи на HSP90, научни допринос се састоји у дефинисању ограничења и могућности примене PROTAC и НуТ молекула ка овом биолошком таргету. Испитивање више класа лиганата, различитих линкера и различитих стратегија дизајна омогућило је да се издвоје структурни елементи који повољно утичу на очување везивања за HSP90, али и да се покаже да очуван афинитет према овом протеину није сам по себи довољан за снажан ефекат у ћелијама. Такође, показано је да повољнија физичко-хемијска и фармакокинетичка својства полазног бензонитрилног лиганда за HSP90 не могу да надокнаде изражен губитак афинитета ка њему. Дисертација је пружила рационалне смернице за будући дизајн деградера HSP90 и истовремено јасно указала на молекуле погодне за даља механистичка испитивања.

У делу рада усмереном на BET протеине, научни допринос је изражен кроз коришћење сазнања добијених из одговарајућег PROTAC молекула за развој унапређених инхибитора. Кристалографски подаци о комплексу PROTAC молекула (**71**) са BRD2(BD2) искоришћени су као полазиште за дизајн амида изведених из (+)-JQ1, чиме је показано да информације о структури добијене у контексту деградера могу бити примењене у оптимизацији референтних инхибитора. Развој хетероцикличних амида омогућио је успостављање односа структуре и активности у којем су положаји хетероатома и интеракције у близини амидне функционалне групе били значајни за повећање потентности. Посебан научни значај има идентификација једињења (**85**) као водећег у серији амида изведених из (+)-JQ1. Ово једињење је показало снажно везивање за бромодомене BET протеина, активност у тестовима на ћелијским линијама, модулацију с-Мус у MV4-11 ћелијама, као и повољан фармакокинетички профил у *in vitro* и *in vivo* испитивањима. На тај начин дисертација показује да оптимизација инхибитора BET протеина не може да се заснива само на потентности у биохемијском тесту, већ захтева истовремено разматрање активности у ћелијама, пермеабилности, ефлукса, стабилности у плазми, микрозомалне стабилности и понашања једињења у живом организму. Додатни допринос дисертације представља критичка процена применљивости фармакокинетичких особина предвиђених *in silico* методом у развоју инхибитора BET протеина. Поређењем рачунарски предвиђених и експериментално одређених параметара показано је да рачунарски алати могу иницијално бити корисни, али да не могу заменити експериментално профилисање, посебно испитивање Сасо-2 пермеабилности и микрозомалне стабилности. Овакав закључак има практичан значај за планирање даљих истраживања, јер указује на потребу да се рачунарска предвиђања користе као помоћни, а не као одлучујући критеријум при избору једињења за даљу евалуацију.

У целини, научни допринос дисертације огледа се у интеграцији кристалографских података и вишеслојне биохемијске, биолошке и фармакокинетичке евалуације при развоју малих органских молекула усмерених на два терапијски релевантна протеина. У делу који се бави HSP90, дисертација пружа смернице и ограничења за будући развој PROTAC и НуТ молекула, укључујући формулисање механистичке хипотезе да ненамерна деплеција CRBN-а услед дејства PROTAC молекула усмерених на HSP90 који регрутују ову Е3 лигазу може представљати механизам који ограничава ефикасност деградације циљног протеина и компликује тумачење фенотипског одговора. У делу који се бави BET протеинима, допринос

се огледа у развоју амида изведених из (+)-JQ1 на основу кристалографских података, идентификацији једињења (85) као оптимизованог, потентног и орално биорасположивог водећег једињења на основу биохемијских, ћелијских и фармакокинетичких резултата, као и у анализи применљивости рачунарских фармакокинетичких предвиђања у односу на експериментално одређене параметре за ову серију једињења.

8. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Коришћењем програма *iThenticate* у Универзитетској библиотеци „Светозар Марковић“ у Београду извршена је провера оригиналности докторске дисертације кандидата маг. фарм. Младена Коравовића под насловом: „Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и BET протеина“ и да су са резултатом провере упознати чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације: др сц. Катарина Николић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет; др сц. Гордана Тасић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет; др сц. Милена Ковачевић, доцент, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет; др сц. Татјана Срдић-Рајић, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије.

Програм *iThenticate* је регистровао 5% поклапања са 12 извора. У свим изворима је сличност текста у тези са извором износила 1% или <1%, што је последица општих места и података.

У складу са Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, резултати провере указују на оригиналност наведене докторске дисертације (позитивна оцена), те се поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 10.6.2026.

Ментори:



Др сц. Владимир Савић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет



Др сц. Бојан Марковић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

9. ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ ЗА ОЦЕНУ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу стручне оцене научног садржаја, Комисија закључује да докторска дисертација кандидата Младена Коравовића, магистра фармације, садржи систематски приказано истраживање и представља оригинално и адекватно написано научно дело. Кандидат је успешно реализовао постављене циљеве истраживања, а резултати приказани у овој докторској дисертацији представљају значајан научни допринос у области Фармацеутске-медицинске хемије.

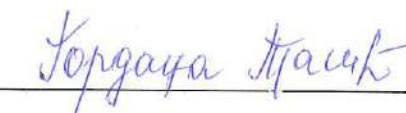
Резултати докторске дисертације публиковани су у пет библиографских јединица: једном раду у водећем међународном часопису категорије M21a, два рада у међународним часописима категорије M23, једном раду у водећем националном часопису категорије M51 и једном саопштењу са скупа националног значаја штампаном у изводу категорије M64.

На основу свега изложеног, Комисија **позитивно оцењује** докторску дисертацију кандидата Младена Коравовића под називом „Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и BET протеина“ и предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета да прихвати овај Извештај и упути га Већу научних области медицинских наука ради добијања сагласности за јавну одбрану докторске дисертације.

У Београду, 12.6.2026.



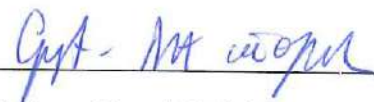
Др сц. Катарина Николић, редовни професор, председник Комисије
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет



Др сц. Гордана Тасић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет



Др сц. Милена Ковачевић, доцент
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет



Др сц. Тајана Срдић-Рајић, научни саветник
Институт за онкологију и радиологију Србије

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ - ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

ИЗВЕШТАЈ О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Поштовани,

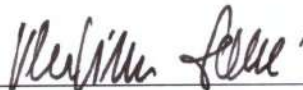
Обавештавамо Вас да је коришћењем програма *iThenticate* у Универзитетској библиотеци „Светозар Марковић“ у Београду завршена провера оригиналности докторске дисертације кандидата маг. фарм. Младена Коравовића под насловом: „Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и BET протеина“ и да су са резултатом провере упознати чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације: др сц. Катарина Николић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет; др сц. Гордана Тасић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет; др сц. Милена Ковачевић, доцент, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет; др сц. Татјана Срдић-Рајић, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије.

Програм *iThenticate* је регистровао 5% поклапања са 12 извора. У свим изворима је сличност текста у тези са извором износила 1% или <1% што је последица општих места и података.

У складу са Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, послати резултати провере указују на оригиналност наведене докторске дисертације (позитивна оцена), те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

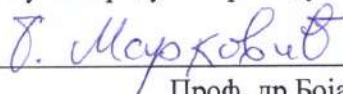
У Београду, 10.06.2026.

Ментори:



Проф. др Владимир Савић

Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет



Проф. др Бојан Марковић

Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

Dizajn, sinteza i biološka karakterizacija mali...

By: Mladen Koravović

As of: Jun 10, 2026 12:25:04 PM
100,931 words - 329 matches - 12 sources

Similarity Index

5%

Mode: Summary Report ▼

sources:

671 words / 1% - ProQuest

[Reason, Thomas. "Development and Application of a Halo-Spirolactonization Towards the Total Synthesis of Obtusallenes X and XI & Synthesis and Biological Investigation of Fatty Acid Metabolites in Ferroptosis.", Michigan State University](#)

641 words / 1% - Internet from 17-Apr-2014 12:00AM

www.freepatentsonline.com

617 words / 1% - from 04-Jun-2024 12:00AM

patents.justia.com

559 words / 1% - Crossref

[Marko Mitrović, Francesco Aleksy Greco, Yiliam Cruz García, Aleksandar Lučić et al. "Click. Screen. Degrade. A Miniaturized D2B Workflow for Rapid PROTAC Discovery", Journal of Medicinal Chemistry, 2026](#)

553 words / 1% - ProQuest

[Bendale, Hersh. "Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Taxane Based Anticancer Agents", State University of New York at Stony Brook, 2025](#)

377 words / < 1% match - Internet from 22-Nov-2021 12:00AM

patents.patnap.com

235 words / < 1% match - ProQuest

[Yang, Langxuan. "Boron-Mediated Transition-Metal Catalyzed Selective Synthesis of Diverse Alkenes.", University of Washington](#)

117 words / < 1% match - Crossref

[Jingyu Zhang, Jinxin Che, Xiaomin Luo, Mingfei Wu et al. "Structural Feature Analyzation Strategies toward Discovery of Orally Bioavailable PROTACs of Bruton's Tyrosine Kinase for the Treatment of Lymphoma", Journal of Medicinal Chemistry, 2022](#)

108 words / < 1% match - Crossref

[Junli Huang, Zeli Ma, Xiaopeng Peng, Zichao Yang et al. "Discovery of Novel Potent and Fast BTK PROTACs for the Treatment of Osteoclasts-Related Inflammatory Diseases", Journal of Medicinal Chemistry, 2024](#)

56 words / < 1% match - ProQuest

[Posz, Jarett Michael. "Developing Methods to Access Saturated Boron-Based Building Blocks.", Indiana University](#)

55 words / < 1% match - Crossref Posted Content

["Diseño, síntesis, estudios de acoplamiento molecular y evaluación biológica de nuevos compuestos inhibidores de la vía de señalización Hedgehog.", Pontificia Universidad Catolica de Chile, 2019](#)

52 words / < 1% match - Crossref

[Christian Steinebach, Aleša Bricelj, Arunima Murgai, Izidor Sosič et al. "Leveraging Ligand Affinity and Properties: Discovery of Novel Benzamide-Type Cereblon Binders for the Design of PROTACs", Journal of Medicinal Chemistry, 2023](#)

paper text:

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ Младен Д. Коравовић ДИЗАЈН, СИНТЕЗА И БИОЛОШКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА МАЛИХ ОРГАНСКИХ МОЛЕКУЛА КОЈИ ИНДУКУЈУ ДЕГРАДАЦИЈУ HSP90 И BET ПРОТЕИНА докторска дисертација Београд, 2026. UNIVERSITY OF BELGRADE FACULTY OF PHARMACY Mladen D. Koravovic DESIGN, SYNTHESIS, AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SMALL ORGANIC MOLECULES THAT INDUCE DEGRADATION OF HSP90 AND BET PROTEINS Doctoral Dissertation Belgrade, 2026 Ментори: _____ Др сц. Владимир Савић, редовни професор Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет _____ Др сц. Бојан Марковић, редовни професор Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет Чланови Комисије за одбрану докторске дисертације: _____ Др сц. Катарина Николић, редовни професор, председник Комисије Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет _____ Др сц. Гордана Тасић, ванредни професор Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет _____ Др сц. Милена Ковачевић, доцент Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет _____ Др сц. Татјана Срдић-Рајић, научни саветник Институт за онкологију и радиологију Србије Датум одбране докторске дисертације: _____ ЗАХВАЛНИЦА Желео бих да изразим искрену захвалност својим менторима, др сц. Владимиру Савићу и др сц. Бојану Марковићу, на стручном усмеравању, драгоценим саветима и несебичној помоћи током израде ове докторске дисертације. Њихова подршка, критичко сагледавање резултата и сугестије током писања значајно су допринели обликовању и коначном изгледу овог рада. Посебну захвалност дугујем др сц. Гордани Тасић на помоћи у стицању и усавршавању

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
-Комисији за последипломске студије – докторске академске студије-

ИЗЈАВА

Изјављујемо да ниједан део докторске дисертације под називом „Дизајн, синтеза и биолошка карактеризација малих органских молекула који индукују деградацију HSP90 и BET протеина“ није урађен у здравственој установи.

Један део експерименталног рада који се односи на *in vitro* физичко-хемијску, биолошку и фармакокинетичку карактеризацију молекула реализован је током истраживачког боравка кандидата у Department of Chemical Biology and Therapeutics у St. Jude Children's Research Hospital (Мемфис, САД) у оквиру Програма сарадње српске науке са дијаспором: ваучери за размену знања Фонда за науку Републике Србије (акроним: DeSyHPRO, евиденциони број: 6463913), као и кроз настављену научну сарадњу између наведених установа.

У Београду, 12.06.2026.

Младен Коравовић, докторанд

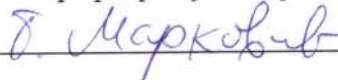


ментори:

проф. др Владимир Савић



проф. др Бојан Марковић



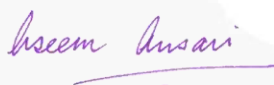
December 5, 2025

AUTHORIZATION FOR USE OF COLLABORATIVE RESEARCH DATA IN DOCTORAL DISSERTATION

This statement confirms that Mladen Koravovic, PhD candidate at the University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, collaborated with researchers at St. Jude Children's Research Hospital, Department of Chemical Biology & Therapeutics, throughout his doctoral studies. His research included both work conducted during his visit to St. Jude and data generated through continued scientific collaboration between St. Jude and the University of Belgrade – Faculty of Pharmacy.

I hereby authorize the inclusion of the collaboratively generated research results – specifically physicochemical, ADME, and biological characterization of PROTAC and HyT molecules targeting HSP90, as well as JQ1-derived BET inhibitors – in his doctoral dissertation. This authorization is provided to satisfy the requirement of the University of Belgrade – Faculty of Pharmacy regarding the use of research data obtained through work conducted abroad or obtained through international collaboration.

I confirm that, to the best of my knowledge, the inclusion of these data in the dissertation does not violate any confidentiality obligations or institutional restrictions.



Aseem Z. Ansari

R. J. Ulrich Endowed Chair,
Chair, Department of Chemical Biology and Therapeutics
St. Jude Children's Research Hospital <https://www.stjude.org/ansari>

Founder & Director,
Khorana Program & S. N. Bose Program (Winstep Forward: www.winstepforward.org)



Research paper

From PROTAC to inhibitor: Structure-guided discovery of potent and orally bioavailable BET inhibitors



Mladen Koravovic^{a,1}, Anand Mayasundari^{b,1}, Gordana Tasic^a, Fatemeh Keramatnia^b, Timothy R. Stachowski^b, Huarui Cui^c, Sergio C. Chai^b, Barbara Jonchere^d, Lei Yang^b, Yong Li^b, Xiang Fu^b, Ryan Hiltenbrand^e, Leena Paul^f, Vibhor Mishra^e, Jeffery M. Klco^e, Martine F. Roussel^d, William CK. Pomerantz^c, Marcus Fischer^b, Zoran Rankovic^{b,**}, Vladimir Savic^{a,*}

^a University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Organic Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11221, Belgrade, Serbia

^b Department of Chemical Biology & Therapeutics, St. Jude Children's Research Hospital, 262 Danny Thomas Place, Memphis, TN, 38105, USA

^c Department of Chemistry, University of Minnesota, 207 Pleasant Street SE, Minneapolis, MN, 55455, United States

^d Department of Tumour Cell Biology, St. Jude Children's Research Hospital, 262 Danny Thomas Place, Memphis, TN, 38105, USA

^e Department of Pathology, St. Jude Children's Research Hospital, 262 Danny Thomas Place, Memphis, TN, 38105, USA

^f Department of Developmental Neurobiology, St. Jude Children's Research Hospital, 262 Danny Thomas Place, Memphis, TN, 38105, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
BET inhibitors
JQ1
Amides

ABSTRACT

An X-ray structure of a CLICK chemistry-based BET PROTAC bound to BRD2(BD2) inspired synthesis of JQ1 derived heterocyclic amides. This effort led to the discovery of potent BET inhibitors displaying overall improved profiles when compared to JQ1 and birabresib. A thiadiazole derived **1q** (SJ1461) displayed excellent BRD4 and BRD2 affinity and high potency in the panel of acute leukaemia and medulloblastoma cell lines. A structure of **1q** co-crystalised with BRD4-BD1 revealed polar interactions with the AZ/BC loops, in particular with Asn140 and Tyr139, rationalising the observed affinity improvements. In addition, exploration of pharmacokinetic properties of this class of compounds suggest that the heterocyclic amide moiety improves drug-like features. Our study led to the discovery of potent and orally bioavailable BET inhibitor **1q** (SJ1461) as a promising candidate for further development.

1. Introduction

Histones are positively charged proteins that enable cells to pack and protect DNA molecules via interactions of lysine residues with acidic phosphate moieties of DNA creating chromatin [1,2]. Stability of this complex can be affected by acetylation of the ε-amino functionality of lysine, a transformation that eliminates basicity of this group and prevents its involvement in the ionic bond formation with the phosphates [3–5]. A consequence of the acetylation is a loss of DNA-histone contacts and formation of a complex with weak interactions which consequently promotes gene expression. One of the major mechanisms of chromatin activation involves recognition of N-acetyl lysine residue at the N-terminal tails of histones by the Bromo- and Extra-Terminal domain (BET)

family of proteins [6–8]. Four members of this family have been described to date: BRD2, BRD3, BRD4 and BRDT [9–14]. The structure of BET proteins comprises of two bromodomains (BD1 and BD2), an extraterminal domain (ET) and a C-terminal domain (CTD) [15]. The BDs are hydrophobic regions created by four α-helices (Z, A, B and C) and two loops (ZA and BC) and can recognise N-acetyl residue in histones and other proteins [16]. The ET domain is involved in recruitment of various components of the transcriptional complexes while CTD, present only in BRD4 and BRDT, interact with positive elongation factor (p-TEFb) [17,18]. BET proteins are involved in various pathophysiological processes, but particularly important is their role in cancer development [19–21]. In recent years a range of BET inhibitors have been described in the literature (Fig. 1) [22–25].

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: zoran.rankovic@stjude.org (Z. Rankovic), vladimir.savic@pharmacy.bg.ac.rs (V. Savic).

¹ Contributed equally to this work.

The first amongst them was diazepine derivative **1a** known as JQ1, now widely used as a tool in studying BET biology [26]. JQ1 displaces BRD4 from chromatin and induces differentiation, G1 cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells such as human-derived NUT midline carcinoma [27]. However, the compound's short half-life in vivo prevented its progression into clinical studies [28]. On the other hand, its amide derivative known as birabresib, **1c**, entered clinical trial demonstrating dose-proportional exposure, favourable safety profile and activity in NMC [29]. Our interest in BET inhibitors sparked from an X-ray structure of a CLICK chemistry-based BET PROTAC bound to BRD2(BD2) revealing novel ligand-protein interactions. This observation followed by an optimization effort described here led to the discovery of potent BET inhibitors displaying overall improved profiles when compared to JQ1 and birabresib.

2. Results and discussion

2.1. Background of the study

Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) have received considerable attention in recent years as a promising novel paradigm in drug discovery [30–38]. Our interest in developing novel BET-PROTACs led us to the discovery of a series of CLICK-based degraders such as **7** (Fig. 2) that displayed significantly increased affinity in BRD2 TR-FRET assay compared to parent JQ1 **1a** and related PROTACs such as dBET1 **8** (Fig. 2) [39–41].

This finding suggests that the side chain of the click PROTAC forms additional interactions resulting in improved BRD affinity. Indeed, the crystal structure of CLICK-PROTAC **7** in complex with BRD2/BD2 that we previously generated (PDB: 6WWB) showed several additional interactions with the protein compared to JQ1, which included a water-bridged hydrogen bond network between NH-amide/Asn429 and CO-amide/Leu381, and hydrogen bonding between the amide triazole/His433 (Fig. 3A) [39]. The electron density around the thalidomide part of ligand **7** was weak and its role is not clear. The crystal structure generally revealed that the network of H-bonds created by **7** is similar to **1a** (JQ1) in the corresponding region except JQ1 is lacking an interaction with Leu381 (Fig. 3B) (PDB:3ONI) [26]. Similarly to **1a**, **1c** (birabresib) in complex with related BRD4 (PDB: 5WMD) adopts an analogous conformation with the key interactions involving the amide

functionality (Fig. 3C) [42]. Here the H-bonding network is more complex and includes water-mediated H-bonds with Leu92, Asn140, and with a non-conserved Asp144 in lieu of His433 in BRD2. The phenol moiety of **1c** that is projecting towards the solvent may be important for balancing other properties of this ligand. All three ligands maintain H-bonding with the conserved Tyr386 via a water molecule. These results suggest the critical role of the triazole moiety in improving the affinity of the PROTAC ligand towards BRD2/BD2.

2.2. Chemistry

To explore and further leverage these novel interactions, we synthesised several JQ1 amide derivatives and compared their properties with the parent inhibitor as well as with a more potent birabresib **1c** (Table 1). Our focus was on substituents that can probe the subpocket occupied by the 1,2,3-triazole in **7**. Consequently, majority of compounds contained heterocyclic substituents with the potential to create H-bonding interactions. All amides were synthesised from the appropriate acid **9** and amine using either HATU or DEPBT as coupling reagent in presence of DIPEA as base and in DMF as solvent, Scheme 1. The amides were isolated by column chromatography in 20–95% yields.

2.3. BRD2/BRD4 binding assay

Binding affinity of the synthesised amides were determined in TR-FRET assay against BRD4 and BRD2 proteins, as shown in Table 1. For both proteins BD2 seems to be more sensitive towards the ligands with several compounds showing sub-nanomolar activity and better potency than JQ1 **1a** or birabresib **1c**. In general, majority of compounds possessing a heterocyclic ring within the amide moiety showed higher affinity to BRD2 than the parent JQ1 **1a** or birabresib **1c**. Interestingly, glycine ester derivative **1m** (IC₅₀ BRD2/BD1 3.4 nM), also showed a high affinity in this assay, possibly having the ester group engaged with the protein in a similar, bioisosteric fashion to five membered heterocycles [43,44]. This is well exemplified by comparing the activities of **1m** (IC₅₀ BRD2/BD1 3.4 nM) and oxazole derivative **1i** (IC₅₀ BRD2/BD1 9.2 nM). Derivatives with the benzyl type of structure, **1d-f**, **1h**, **1i** and **1k**, were less potent than the most active thiadiazole **1q** (IC₅₀ BRD2/BD1 1.6 nM) with the shorter amide chain. Notably, structurally similar to **1q**, thiazole derivative **1o** (IC₅₀ BRD2/BD1 10.9 nM)

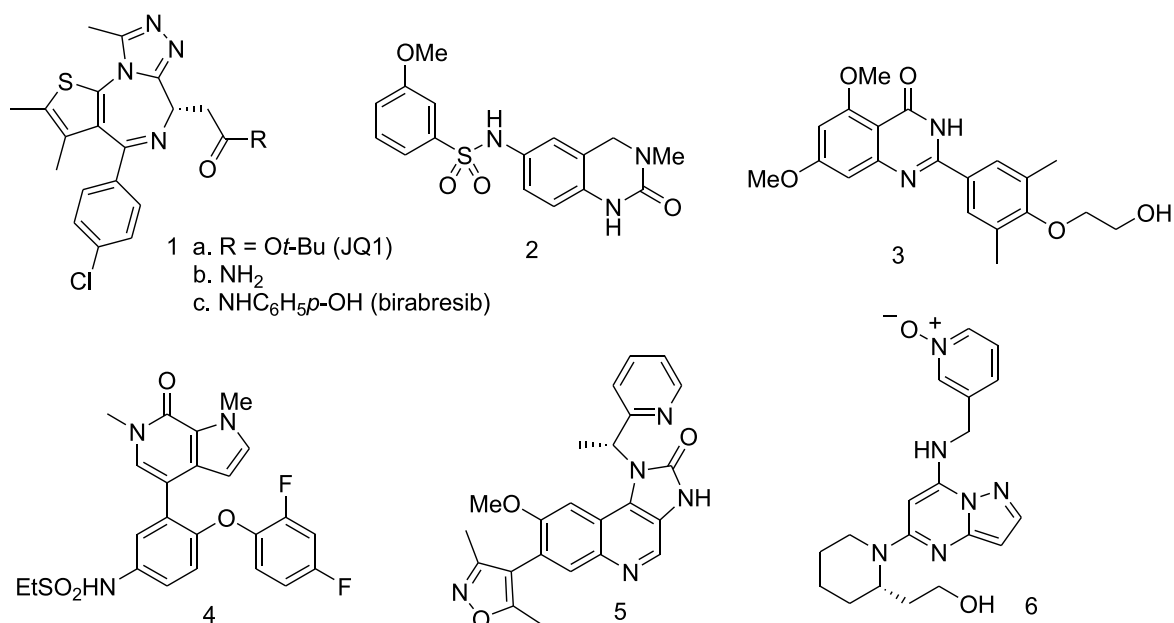


Fig. 1. Selected BET inhibitors reported in the literature.

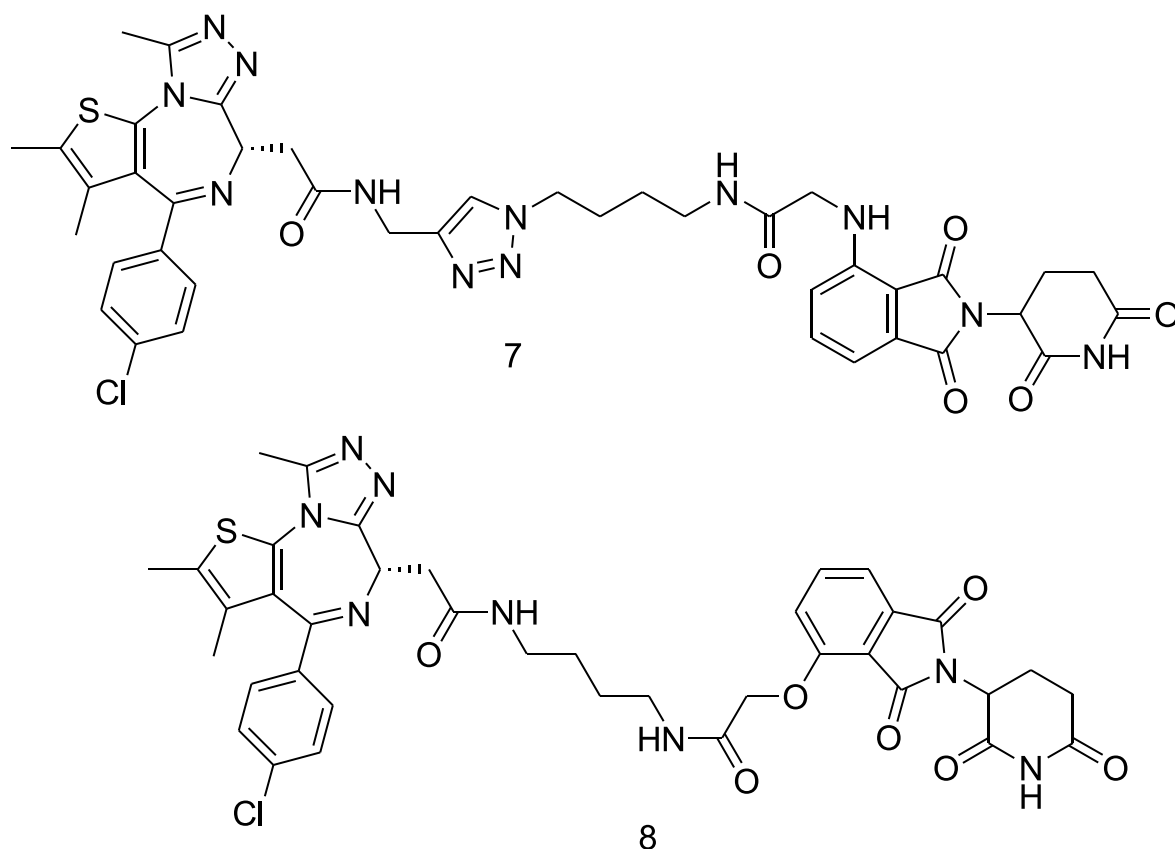
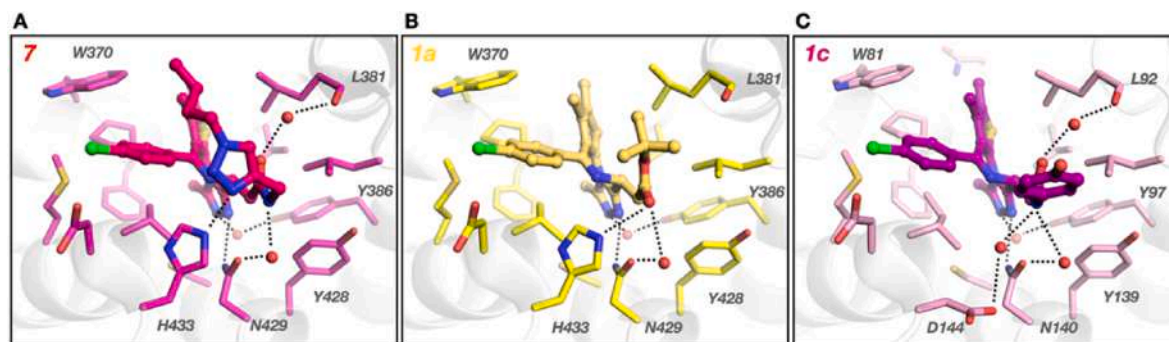


Fig. 2. JQ1 derived PROTAC compounds.

Fig. 3. Comparison of ligand binding modes of BET family members. Crystal structure of BRD2/BD2 in complex with (A) **7** (magenta, PDB: 6WWB) and (B) JQ1, **1a**, (yellow, PDB: 3ONI). (C) Crystal structure of birabresib, **1c**, bound to BRD4/BD1 (purple, PDB: 5WMD). Hydrogen bonds are shown as dotted lines.

demonstrated lower affinity suggesting significance of an additional nitrogen or perhaps better positioning for the H-bonding interacting group. Surprisingly, we did not observe a difference between **1k** (IC₅₀ BRD2/BD1 16.3 nM) and the N-deleted analogue **1g** (IC₅₀ BRD2/BD1 21.7 nM). This may suggest that positioning of heteroatom in the amide moiety is important for the affinity. A similar trend was observed in the BRD4 assay. Derivative **1q** (IC₅₀ BRD4/BD1 6.5 nM) was amongst the most active compounds with isoxazole **1h** (IC₅₀ BRD4/BD1 5.7 nM) having comparable activity and glycine derivative **1m** (IC₅₀ BRD4/BD1 2.8 nM) being even slightly more potent.

Overall, several of our most active compounds described above performed better in both BRD4 and BRD2 binding assays than JQ1 **1a** or birabresib **1c** (Table 1).

2.4. Cell-based assay

Encouraging initial results prompted further profiling of the synthesised amides in cancer cell viability assays. The cell line selection was influenced by our general focus on high risk paediatric cancers such as acute leukaemia (MV4-11, NALM-16, MOLM-13) and medulloblastoma (HDMB03, D283), the two leading causes of childhood cancer death. (Table 2). Cells were treated with compounds over 72 h, and their viability was assessed using the CellTiter-Glo assay kit (Promega). The IC₅₀ values were determined by the proprietary software Robust Investigation of Screening Experiments (RISE), developed in house on the Pipeline Pilot platform (Biovia, v. 17.2.0) [45]. Medulloblastoma cells HDMB03 showed high sensitivity towards **1i** (IC₅₀ 1.0 nM) and **1q** (IC₅₀ 6.6 nM), which were very potent in biochemical assays as well. Compound **1i** was ~90-fold and ~130-fold more toxic than JQ1 **1a** (IC₅₀ 90.3 nM) and birabresib **1c** (IC₅₀ 134.3.3 nM), respectively. It is also

Table 1
Potency of the JQ1 amide derivatives.^a

compound	1, NHR	IC ₅₀ [μM] ^b BRD4 (BD1) BRD4(BD2)	IC ₅₀ [μM] ^b BRD2 (BD1)BRD2(BD2)		
1a (JQ1)	—	0.0482	0.0132	0.0285	0.0095
1c (birabresib)		0.1810	0.0098	0.0587	0.0032
1d		0.0790	0.0013	0.0086	0.0018
1e		1.4127	0.0261	0.6396	0.1616
1f		0.0823	0.0006	0.0176	0.0030
1g		0.7251	0.0003	0.0217	0.0002
1h		0.0057	0.0002	0.0031	0.0001
1i		0.0104	0.0003	0.0092	0.0001
1j		0.0346	0.0065	0.0321	0.0096
1k		0.0405	0.0007	0.0163	0.0003
1l		0.1058	0.0004	0.1467	0.0003
1m		0.0028	0.0001	0.0034	0.0001
1n		0.0212	0.0033	0.0222	0.0025
1o		0.5138	0.0016	0.0109	0.0026
1p		0.7401	0.0600	0.2529	0.0505
1q (SJ1461)		0.0065	0.0002	0.0016	0.0001

^a See Supporting Information for SD values.^b TR-FRET assay.

worth noting that heterocyclic amides **1o** (IC₅₀ 4.6 nM) and **1d** (IC₅₀ 3.8 nM) showed >20-fold better potency than **1a** or **1c**. Leukaemia cells NALM16 displayed similar sensitivity towards **1i** (IC₅₀ 0.8 nM) and **1q** (IC₅₀ 3.6 nM), while birabresib **1c** (IC₅₀ 14.0 nM) demonstrated ~15-fold lower potency than **1i**. Additional heterocyclic amides such as

1d (IC₅₀ 7.3 nM) or **1o** (IC₅₀ 6.4 nM) also showed significant potency against this cell line supporting generally observed trend for the JQ1 heterocyclic amide derivatives. A similar tendency was observed in other cell lines, although, with less significant differences in activity of the most active amides **1i/1q** and JQ1 **1a**/birabresib **1c** (Table 2). Glycine derivative **1m** showed differences between the results obtained in two assay formats. Specifically, **1m** showed considerably higher affinity in TR-FRET assay (IC₅₀ BRD2/BD1 3.4 nM, IC₅₀ BRD4/BD1 2.8 nM) compared to its activity in cell-based assays (IC₅₀ 9.9–359.2 nM). Similar trends were obtained with other two amino acid amide analogues **1l** and **1j**. The observed lower potency in the cell-based assays might indicate susceptibility of the amino acid derive amides to hydrolytic transformations affecting activity of these compounds.

Based on overall properties compound **1q** was selected as a lead compound and progressed to BROMOscan™ profiling, where it showed high affinity for all BET isoforms (Fig. S2). Furthermore, the lead compound **1q** effect on MYC was assessed in MV4-11 cell line by immunoblotting. In this study **1q** showed a very similar profile to JQ1 and birabresib. After 6 h incubation at 100 nM concentration of **1q** MYC protein abundance were reduced to around 50%, while at 1 μM concentration of **1q** MYC protein levels were down to 22% (Fig. S3/4).

2.5. Structural studies

Given the promising activity of JQ-derived heterocyclic amide analogues we set to explore interactions of these derivatives with BRD proteins in more detail. We solved the X-ray crystal structures of two of our compounds, **1k** and **1q**, bound to BRD4/BD1 (Fig. 4a-b). At resolutions of 1.05 Å with **1k** (PDB: 7RN2) and 1.18 Å with **1q** (PDB: 7RMD) the electron density for placement of the ligand is unambiguous (Fig. S5). Analysis of the binding mode shows that both **1k** and **1q** occupy the same position in the active site of BRD4/BD1 as JQ1 **1a** and birabresib **1c**, Fig. 4c-d. In all cases, the conserved diazepine fragment is located deep in the pocket and H-bonds with Tyr97 through a water molecule. The amide substituents, pyridine in **1k** and thiadiazole in **1q**, are oriented in the same area of the binding pocket as the ester moiety in JQ1 **1a** or the amide fragment of birabresib **1c** and interact with ZA and BC loop residues. Like **1a/1c**, **1k** and **1q** H-bond directly with the amide NH moiety of Asn140 in the BC loop. Although **1k** and **1q** both contain a triazole functionality, the amide substituents are oriented orthogonally to one another and thus interact with the CO moiety of Asn140 in different ways. The conserved water bridging the H-bond with Asn140-CO binds to the secondary amide in **1k** but interacts with the thiadiazole nitrogen of **1q**. This allows the pyridine nitrogen of **1k** to interact with a second water creating an additional H-bond with Asn140-CO like in JQ1 **1a** and birabresib **1c**. This second water-mediated H-bond involves Asp144 as well, which **1q** lacks. Yet, **1q** contains a unique interaction where the thiadiazole interacts with Tyr139 in the BC loop, again through a water-mediated H-bond. Another water-mediated H-bond bridges the amide carbonyl in **1k** to the backbone oxygen of Leu92 in the ZA loop and is also observed in birabresib **1c**. This interaction requires two waters in **1q** and is missing in JQ1 **1a**. The variability in water

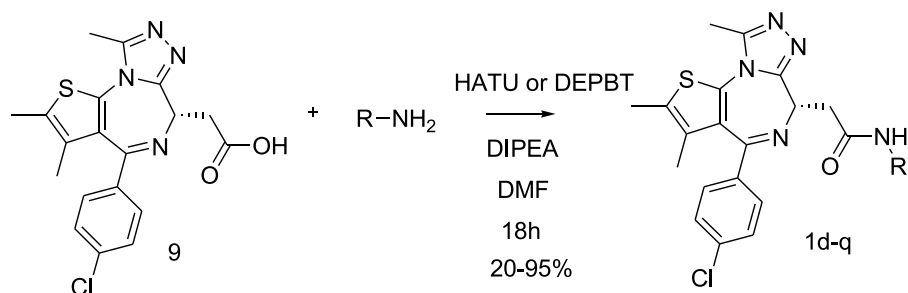
**Scheme 1.** Synthesis of amide derivatives.

Table 2Cell lines studies of the amide derivatives.^a

amide	HDMB03, IC50, uM	D283, IC50, uM	NALM16, IC50, uM	MOLM-13, IC50, uM	MV-4-11, IC50, uM
1a (JQ1)	0.0903	0.0609	0.0189	0.0247	0.099
1c (birabresib)	0.1343	0.0669	0.0140	0.0112	0.022
1d	0.0038	0.9645	0.0073	0.0035	0.253
1e	0.0407	0.2275	0.0145	0.0110	0.059
1f	0.3589	0.7892	0.0938	0.0526	0.143
1g	0.6190	0.5763	0.4524	0.3857	0.729
1h	0.0173	0.0252	0.0121	0.0147	0.032
1i	0.0010	0.0187	0.0008	0.0022	0.018
1j	1.2443	2.9340	0.7914	0.2002	1.138
1k	0.2630	0.2280	0.0148	0.0089	0.444
1l	9.3408	>8.8486	>8.8486	2.4027	3.055
1m	0.3592	0.3374	0.0164	0.0099	0.297
1n	0.0427	0.4132	0.0071	0.0088	0.033
1o	0.0046	0.1493	0.0064	0.0220	0.040
1p	0.2546	0.7492	0.1723	0.3189	0.182
1q (SJ1461)	0.0066	0.0562	0.0036	0.0102	0.020

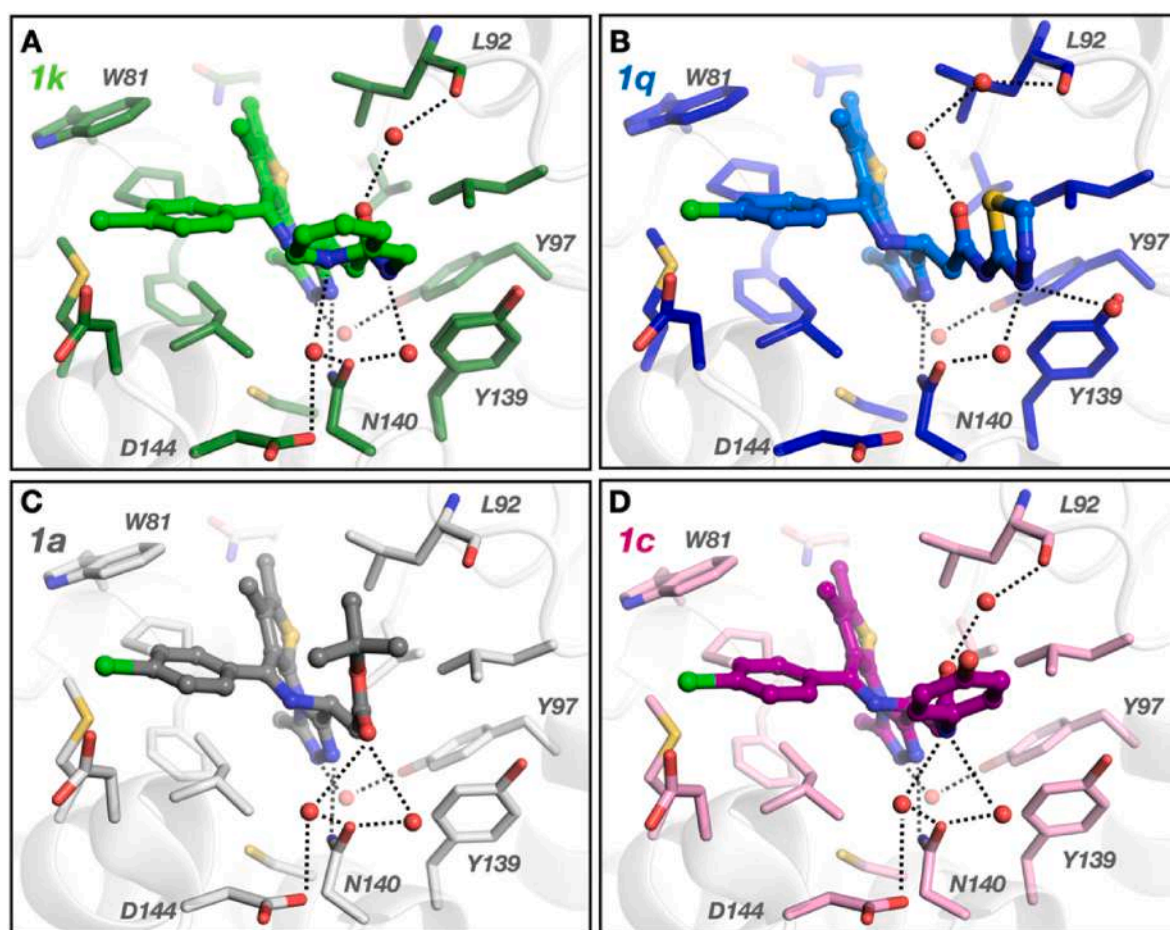
^a See supporting information for full data.

Fig. 4. High-resolution structures of JQ1 derivatives bound to BRD4(BD1). (A) **1k** interacts with Asn140, Asp144, and Leu92 (PDB: 7RN2). (B) **1q** interacts with Asn140 and Tyr139 (PDB: 7RMD). (C) JQ1 **1a** (PDB: 3MXF) interacts with Asn140 and Asp144. (D) birabresib **1c** (PDB: 5WMD) interacts with Asn140, Asp144, and Leu92. Dotted lines represent hydrogen bonds and red spheres represent ordered water molecules. Ligand electron densities are shown in [SI Fig S2](#).

placement between **1q**, **1a**, and **1c/1k** is most likely a consequence of the orientation of the analogues. This suggests that the amide group is critical for high affinity but also demonstrates that additional important H-bonding interactions are possible by the amide substituent. It is also worth noting that all these additional contacts are created on the rim of the BD binding pocket towards the solvent. Therefore, this provides opportunity to further derivatise the amide moiety to optimise, for example, physico-chemical properties without diminishing binding

affinity.

2.6. Physico-chemical and ADME studies

Upon demonstrating the beneficial effect of the heterocyclic substituent for the anti-tumour cell activity of JQ1 derivatives, we sought to determine how this moiety influences their drug-like properties ([Table 3](#), and Supporting Information) [46]. Solubility for the

compounds was established in phosphate buffer solution after 18h incubation period at room temperature (Table 3) [47]. Concentration of dissolved compounds was measured by UV spectrometry. The solubility of heterocyclic amides was found to be generally greater than that of JQ1 **1a** (37.5 μ M) or birabresib **1c** (23.4 μ M), with triazole **1e** (80.8 μ M) being the most soluble. The solubility of pyridine derivative **1k** (72.5 μ M), was comparable to **1e**, whereas thiadiazole derivative **1q** (12.0 μ M), showed lower solubility than its derivatives, including JQ1 **1a** and birabresib **1c**. Next, we evaluated permeability of the amides using parallel artificial membrane permeability (PAMPA) and Caco2 assays [48,49]. PAMPA assay was performed in parallel with compounds dissolved in DMSO and further diluted with phosphate buffer solutions. Donor and acceptor plates were analysed by UV spectrometry after incubation period of 0.5h. The results outlined in Table 3 suggested that the presence of polar NH/OH bond slowed down permeation of compounds (**1d**, 2.1; **1n** 20.8; **1j**, 0; **1l**, 0.5 $\times 10^{-6}$ cm/s) through the nonpolar PAMPA membrane while the heterocycle ring seemed to have a balanced effect. Lead compound **1q** (534.0 $\times 10^{-6}$ cm/s) demonstrated good permeability, while the compounds with lipophilic amide groups showed the highest permeation (**1a** >1800, **1g** 1797.1; **1p** > 1800 $\times 10^{-6}$ cm/s). In Caco2 assay we observed low permeability for the above mentioned NH/OH derivatives while **1h** (P_{app} 150.34 nm/s), **1k** (P_{app} 98.4 nm/s) and **1q** (P_{app} 66.5x nm/s) performed better than others. Compared to the heterocyclic amides birabresib **1c** (P_{app} 221.6 nm/s) showed better permeability in Caco 2 than PAMPA assay. Interestingly, whereas some of the analogues such as **1f** and **1e** were subjects of a high efflux, lead compound **1q** displayed low efflux ratio in the Caco2 assay.

Plasma protein binding of a drug or a studied compound is important pharmacokinetic parameter as it can be often related to their efficacy [50]. Lower level of protein binding makes larger proportion of the drug/compound available to reach the biological target. Our experiments to determine this factor were performed using Rapid Equilibrium Dialysis (RED) Assay (Table 3). The results suggested high level of binding for all heterocyclic amides (>90%) including JQ1 **1a** and birabresib **1c**. With the current set of compounds, we did not observe significant changes in this parameter with variations of the heterocyclic ring. Human plasma stability experiments were performed by incubating the compounds for up to 48h followed by LC-MS/MS analysis. Majority of the compounds showed excellent stability including derivative **1q** (100%), Table 3. Finally, we investigated metabolic stability of the synthesised amides in human microsomes (Table 3) [51]. Amongst the amide derivatives lead compound **1q** ($t_{1/2}$ 3.2h) showed moderate metabolic stability while pyridine derivative **1k** ($t_{1/2}$ 0.1h) and benzyl derivative **1g** ($t_{1/2}$ 0.1h) were subjects of rapid metabolic

transformation. Notably, the human microsome stability of lead compound **1q** was also better than that of JQ1 **1a** ($t_{1/2}$ 0.4h) or birabresib **1c** ($t_{1/2}$ 1.7h).

2.7. In vivo pharmacokinetic studies

The promising overall properties of **1q** warranted its progression into in vivo pharmacokinetic studies [52]. This was carried out in female CD1 mice following a single intravenous (at 1 mg/kg) and oral administration (at 3 mg/kg and at 10 mg/kg). Blood samples were collected over a time course and they were analysed by LC-MS/MS method. The critical pharmacokinetic parameters are outlined in Table 4, Fig. 5.

Compound **1q** showed low plasma clearance ($Cl = 10.6$ mL/min/kg) and volume of distribution typical of non-basic compounds ($V_{ss} = 0.8$ L/kg), with elimination half-life of 1.5h. Subsequent P.O. experiments performed with 3 mg/kg and 10 mg/kg doses suggested good absorption (T_{max} 1hr and 0.5hr, respectively) and high bioavailability (Table 4).

3. Conclusion

A follow up on an observation from our CLICK-derived BET-PRO-TACs program led to the discovery of JQ1-derived amides with overall properties comparable or better to those of JQ1 and currently clinically studied birabresib. Biochemical assay demonstrated >20-fold better potency of thiadiazole derived **1q** (SJ1461) towards BRD4/BRD2, while investigation in a panel of cancer cell lines suggested particular sensitivity of HDMB03 towards oxazole **1i** (~130- fold more potent than birabresib **1c**). Initially studied pharmacokinetic parameters of the amides are comparable to those of birabresib **1c** but the drawback for **1c** is the potentially toxicophoric *p*-aminophenol as constitutional part of its structure. Analysis of the crystal structure of BRD4(BD1)-**1q/1k** provided an insight into the protein-ligand interactions revealing novel contacts that can be exploited for improving activity of JQ1 derivatives. The heterocyclic moiety was also shown to project towards the solvent implicitly suggesting potential route to optimise physicochemical properties of the studied compounds. The overall in vitro/vivo properties of SJ1461 makes this compound promising candidate for further exploration.

4. Experimental

All experimental procedures are delineated in Supporting Information.

Table 3
Physico-chemical and ADME properties of the JQ1 derived amides.^a

amide	Solubility (pH 7.4, μ M)	PAMPA ^b (10^{-6} cm/s)	Caco2 A/B (nm/s)	Caco2 B/A (nm/s)	Efflux Ratio	PB (%)	PS ^c ($t_{1/2}$, h)	MS ($t_{1/2}$, h)
1a	37.5	ULOQ	64.0	46.7	0.7	99.2	ULOQ	0.4
1c	23.4	315.1	221.6	485.4	2.2	97.3	ULOQ	1.7
1f	65.7	0.0	9.2	311.2	34.0	98.5	ULOQ	0.5
1d	57.4	2.1	2.5	28.0	11.2	94.8	ULOQ	0.6
1g	34.1	1797.1	42.2	44.5	1.1	98.7	ULOQ	0.1
1e	80.8	14.0	6.2	246.5	39.9	97.5	ULOQ	0.5
1h	56.9	274.5	150.3	777.9	5.2	93.5	ULOQ	0.4
1k	72.5	177.5	98.4	568.4	5.8	97.2	ULOQ	0.1
1n	76.1	20.8	7.0	83.3	11.9	86.9	ULOQ	3.2
1m	63.3	231.3	63.8	307.3	4.8	91.0	15.8	1.1
1i	62.0	97.2	30.4	297.4	9.8	94.1	ULOQ	5.8
1o	12.41	544.8	19.1	41.1	2.2	98.2	ULOQ	1.1
1j	68.4	0.0	7.7	14.2	1.8	92.7	24.7	4.7
1l	66.4	0.5	4.5	7.8	1.7	85.6	ULOQ	11.3
1p	1.9	ULOQ	5.7	13.8	2.4	99.6	ULOQ	0.3
1q	12.0	534.0	66.5	180.1	2.7	97.2	ULOQ	3.2

^a See supporting information for full data; PAMPA: Parallel artificial membrane permeability assay; Caco2: human colorectal adenocarcinoma cells permeability assay; PB: human plasma binding; PS: human plasma stability; MS: metabolic stability (human microsomes).

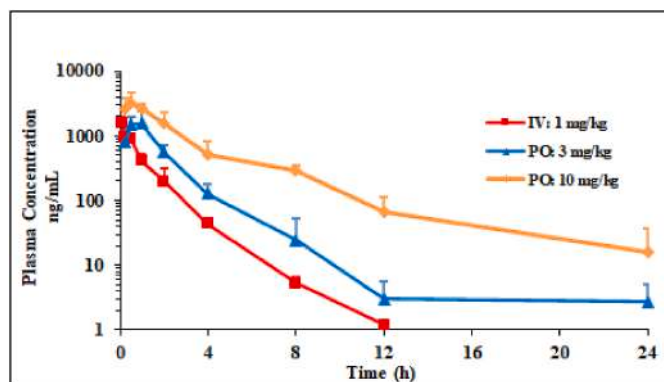
^b ULOQ on the PAMPA value indicates compound quantification was upper the limit of quantification ($>1800 \times 10^{-6}$ cm/s).

^c ULOQ on the PS value indicates compound quantification was upper the limit of quantification (>100 h).

Table 4In vivo pharmacokinetic studies for **1q**.

Route	Dose (mg/kg)	T _{max} (h)	C ₀ /C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (hr*ng/mL)	T _{1/2} (hr)	CL/CL _F (mL/min/kg)	V _{ss} /V _z F (L/kg)	F (%)
IV	1	NA	1931.3	1567.1	1.5	10.6	0.8	NA
PO	3	1.00	1555.3	3275.4	3.9	15.2	5.2	70
PO	10	0.50	3155.6	9473.0	3.9	17.5	6.0	60

T_{max}: the time to achieve the highest concentration of drug in the blood; C_{max}: maximal concentration of drug; AUC: area under the curve; T_{1/2}: elimination half-life; CL: clearance; V_{ss}: volume of distribution; F: bioavailability.

**Fig. 5.** Plasma concentration of **1q** over 24h period.

Author contributions

MK, synthesis, data collection and analysis, manuscript writing and revision. AM, synthesis, study design and coordination, data collection and analysis, manuscript writing and revision. GT, synthesis, data analysis, manuscript revision, FK, data collection and analysis. TRS, structural biology, manuscript writing and revision. HC, provided reagents. LY, data collection and analysis. YL, data collection and analysis. XF, data collection and analysis. SC, data collection and analysis. BJ, data collection. RH, data collection. LP, data collection and analysis. VM, data collection and analysis. WCKP, provided reagents. MFR, supervision, medulloblastoma cell lines data generation and analysis, manuscript writing and revision. JMK, supervision, ALL cell lines data generation and analysis, manuscript writing and revision. MF, supervision, data analysis, structural biology, manuscript writing and revision. ZR, conceived the study, supervision, data analysis, manuscript writing and revision. VS, supervision, data analysis, manuscript writing and revision.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: ZR, MF, WCKP reports financial support was provided by ALSAC. VS reports financial support was provided by The Science Fund of The Republic of Serbia.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgment

This work was supported by ALSAC and R35GM142772 (to MF), and R35GM140837 (to WCKP). Crystallographic data were collected at Southeast Regional Collaborative Access Team (SER-CAT) 22-ID beamline at the Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory. SER-CAT is supported by its member institutions, and equipment grants (S10_RR25528, S10_RR028976 and S10_OD027000) from the National

Institutes of Health. Use of the Advanced Photon Source was supported by the U. S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, under Contract No. W-31-109-Eng-38. This research was also supported by the Science fund of the Republic of Serbia: program, Diaspora; Grant no: 6463913; Acronym DeSyHPRO and by the Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia, Grant Agreement with University of Belgrade-Faculty of Pharmacy No: 451-03-9/2021-14/200161.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115246>.

References

- [1] L.S. Hnilica, *Structure and Biological Functions of Histones*, first ed., CRC Press, Boca Raton, 2017.
- [2] C. Shen (Ed.), *Histones: Class, Structure and Function*, first ed., Nova Science Pub Inc, New York, 2012.
- [3] C.Y. Lee, P.A. Grant, in: S.D. McCullough, D.C. Dolinoy (Eds.), Chapter 1-1 - Role of Histone Acetylation and Acetyltransferases in Gene Regulation, *Toxicopigenetics*, Academic Press, 2019, pp. 3–30, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812433-8.00001-0>.
- [4] L. Verdone, E. Agricola, M. Caserta, E. Di Mauro, Histone acetylation in gene regulation, *Brief. Func. Genomics*. 5 (2006) 209–221, <https://doi.org/10.1093/bfpg/ell028>.
- [5] K. Struhl, Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms, *Genes Dev.* 12 (1998) 599–606.
- [6] F.A. Romero, A.M. Taylor, T.D. Crawford, V. Tsui, A. Cote, S. Magnuson, Disrupting acetyl-lysine recognition: progress in the development of bromodomain inhibitors, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 1271–1298, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01514>.
- [7] T. Umehara, Y. Nakamura, M.K. Jang, K. Nakano, A. Tanaka, K. Ozato, B. Padmanabhan, S. Yokoyama, Structural basis for acetylated histone H4 recognition by the human BRD2 bromodomain, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 7610–7618, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.062422>.
- [8] S. Mujtaba, L. Zeng, M.-M. Zhou, Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain, *Oncogene* 26 (2007) 5521–5527, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210618>.
- [9] M.P. Schwalm, S. Knapp, BET bromodomain inhibitors, *Curr. Opin. Biol. Sci.* 68 (2022), 102148, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.102148>.
- [10] A. Stathis, F. Bertoni, BET proteins as targets for anticancer treatment, *Cancer Discov.* 8 (2018) 24–36, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0605>.
- [11] B. Padmanabhan, S. Mathur, R. Manjula, S. Tripathi, Bromodomain and extra-terminal (BET) family proteins: new therapeutic targets in major diseases, *J. Biosci.* 41 (2016) 295–311, <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9600-6>.
- [12] V. Sahai, A.J. Redig, K.A. Collier, F.D. Eckerd, H.G. Munshi, Targeting BET bromodomain proteins in solid tumors, *Oncotarget* 7 (2016) 53997–54009, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9804>.
- [13] Y. Taniguchi, The bromodomain and extra-terminal domain (BET) family: functional anatomy of BET paralogous proteins, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1849, <https://doi.org/10.3390/ijms17111849>.
- [14] H.A. Ali, Y. Li, A.H.M. Bilal, T. Qin, Z. Yuan, W. Zhao, A comprehensive review of BET protein biochemistry, physiology, and pathological roles, *Front. Pharmacol.* 13 (2022) article 818891, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.818891>.
- [15] M.T. Werner, H. Wang, N. Hamagami, S.C. Hsu, J.A. Yano, A.J. Stonestrom, V. Behera, Y. Zong, J.P. Mackay, G.A. Blobel, Comparative structure-function analysis of bromodomain and extraterminal motif (BET) proteins in a gene-complementation system, *J. Biol. Chem.* 295 (2020) 1898–1914, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010679>.
- [16] E. Ferri, C. Petosa, C.E. McKenna, Bromodomains: structure, function and pharmacology of inhibition, *Biochem. Pharmacol.* 106 (2016) 1–18, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.005>.
- [17] S. Aiyer, G.V.T. Swapna, L.-C. Ma, G. Liu, J. Hao, G. Chalmers, B.C. Jacobs, G. T. Montelione, M.J. Roth, A common binding motif in the ET domain of BRD3 forms polymorphic structural interfaces with host and viral proteins, *Structure* 29 (2021) 886–898.e6, <https://doi.org/10.1016/j.str.2021.01.010>.

- [18] B.L. Crowe, R.C. Larue, C. Yuan, S. Hess, M. Kvaratskhelia, M.P. Foster, Structure of the Brd4 ET domain bound to a C-terminal motif from γ -retroviral integrases reveals a conserved mechanism of interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113 (2016) 2086, <https://doi.org/10.1073/pnas.1516813113>. –2091.
- [19] T. Shorstova, W.D. Foulkes, M. Witcher, Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents, *Br. J. Cancer* 124 (2021) 1478–1490, <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01321-0>.
- [20] J. Sarnik, T. Poplawski, P. Tokarz, BET proteins as attractive targets for cancer therapeutics, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021), 11102, <https://doi.org/10.3390/ijms222011102>.
- [21] P. Trojer, Targeting BET bromodomains in cancer, *Annu. Rev. Cell Biol.* 6 (2022) 313–336, <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-070120-103531>.
- [22] M.P. Schwalm, S. Knapp, BET bromodomain inhibitors, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 68 (2022), 102148, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.102148>.
- [23] L. Feng, G. Wang, Y. Chen, G. He, B. Liu, J. Liu, C.-M. Chiang, L. Ouyang, Dual-target inhibitors of bromodomain and extra-terminal proteins in cancer: a review from medicinal chemistry perspectives, *Med. Res. Rev.* 42 (2022) 710–743, <https://doi.org/10.1002/med.21859>.
- [24] J. Chen, P. Tang, Y. Wang, J. Wang, C. Yang, Y. Li, G. Yang, F. Wu, J. Zhang, L. Ouyang, Targeting bromodomain-selective inhibitors of BET proteins in drug discovery and development, *J. Med. Chem.* 65 (2022) 5184–5211, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01835>.
- [25] Y. Fu, Y. Zhang, H. Sun, Progress in the development of domain selective inhibitors of the bromo and extra terminal domain family (BET) proteins, *Eur. J. Med. Chem.* 226 (2021), 113853, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113853>.
- [26] P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W.B. Smith, O. Fedorov, E.M. Morse, T. Keates, T.T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M.R. McKeown, Y. Wang, A.L. Christie, N. West, M.J. Cameron, B. Schwartz, T.D. Heightman, N. La Thangue, C.A. French, O. Wiest, A.L. Kung, S. Knapp, J.E. Bradner, Selective inhibition of BET bromodomains, *Nature* 468 (2010) 1067–1073, <https://doi.org/10.1038/nature09504>.
- [27] G. Jiang, W. Deng, Y. Liu, C. Wang, General mechanism of JQ1 in inhibiting various types of cancer, *Mol. Med. Rep.* 21 (2020) 1021–1034, <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.10927>.
- [28] F. Li, K.R. MacKenzie, P. Jain, C. Santini, D.W. Young, M.M. Matzuk, Metabolism of JQ1, an inhibitor of bromodomain and extra terminal bromodomain proteins, in human and mouse liver microsomes, *Biol. Reprod.* 103 (2020) 427–436, <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa043>.
- [29] J. Lewin, J.-C. Soria, A. Stathis, J.-P. Delord, S. Peters, A. Awada, P.G. Aftimos, M. Bekradda, K. Rezaei, Z. Zeng, A. Hussain, S. Perez, L.L. Siu, C. Massard, Phase Ib trial with birabresib, a small-molecule inhibitor of bromodomain and extraterminal proteins, in patients with selected advanced solid tumors, *J. Clin. Oncol.* 36 (2018) 3007–3014, <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.2292>.
- [30] K. Li, C.M. Crews, PROTACs: past, present and future, *Chem. Soc. Rev.* 51 (2022) 5214–5236, <https://doi.org/10.1039/D2CS00193D>.
- [31] M. Bekes, D.R. Langley, C.M. Crews, PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue, *Nat. Rev. Drug Discov.* 21 (2022) 181–200, <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00371-6>.
- [32] V. Nemecek, M.P. Schwalm, S. Müller, S. Knapp, PROTAC degraders as chemical probes for studying target biology and target validation, *Chem. Soc. Rev.* 51 (2022) 7971–7993, <https://doi.org/10.1039/D2CS00478J>.
- [33] X. Sun, H. Gao, Y. Yang, M. He, Y. Wu, Y. Song, Y. Tong, Y. Rao, PROTACs: great opportunities for academia and industry, *Signal Transduct. Targeted Ther.* 4 (2019) 1–33, <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0101-6>.
- [34] R.P. Wurz, K. Dellamaggiore, H. Dou, N. Javier, M.-C. Lo, J.D. McCarter, D. Mohl, C. Sastri, J.R. Lipford, V.J. Cee, A “click chemistry platform” for the rapid synthesis of bispecific molecules for inducing protein degradation, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 453–461, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01781>.
- [35] Y. Huang, H. Yokoe, A. Kaiho-Soma, K. Takahashi, Y. Hirasawa, H. Morita, F. Ohtake, N. Kanoh, Design, synthesis, and evaluation of trivalent PROTACs having a functionalization site with controlled orientation, *Bioconjugate Chem.* 33 (2022) 142–151, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00490>.
- [36] N. Ohoka, G. Tsuji, T. Shoda, T. Fujisato, M. Kurihara, Y. Demizu, M. Naito, Development of small molecule chimeras that recruit AhR E3 ligase to target proteins, *ACS Chem. Biol.* 14 (2019) 2822–2832, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00704>.
- [37] N.J. Henning, A.G. Manford, J.N. Spradlin, S.M. Brittain, E. Zhang, J.M. McKenna, J.A. Tallarico, M. Schirle, M. Rape, D.K. Nomura, Discovery of a covalent FEM1B recruiter for targeted protein degradation applications, *J. Am. Chem. Soc.* 144 (2022) 701–708, <https://doi.org/10.1021/jacs.1c03980>.
- [38] K.-H. Chan, M. Zengerle, A. Testa, A. Ciulli, Impact of target warhead and linkage vector on inducing protein degradation: comparison of bromodomain and extra-terminal (BET) degraders derived from triazolodiazepine (JQ1) and tetrahydroquinoline (I-BET726) BET inhibitor scaffolds, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 504–513, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01912>.
- [39] J. Min, A. Mayasundari, F. Keramatnia, B. Jonchere, S.W. Yang, J. Jarusiewicz, M. Actis, S. Das, B. Young, J. Slavish, L. Yang, Y. Li, X. Fu, S.H. Garrett, M.-K. Yun, Z. Li, S. Nithianantham, S. Chai, T. Chen, A. Shelat, R.E. Lee, G. Nishiguchi, S. W. White, M.F. Roussel, P.R. Potts, M. Fischer, Z. Rankovic, Phenyl-glutarimides: alternative cereblon binders for the design of PROTACs, *Angew. Chem. Int. Ed.* 133 (2021) 26663–26670, <https://doi.org/10.1002/ange.202108848>.
- [40] G.E. Winter, D.L. Buckley, J. Paulk, J.M. Roberts, A. Souza, S. Dhe-Paganon, J. E. Bradner, Selective target protein degradation via phthalimide conjugation, *Science* 348 (2015) 1376–1381, <https://doi.org/10.1126/science.aab1433>.
- [41] G. Xue, K. Wang, D. Zhou, H. Zhong, Z. Pan, Light-induced protein degradation with photocaged PROTACs, *J. Am. Chem. Soc.* 141 (2019) 18370–18374, <https://doi.org/10.1021/jacs.9b06422>.
- [42] H.G. Ozer, D. El-Gamal, B. Powell, Z.A. Hing, J.S. Blachly, B. Harrington, S. Mitchell, N.R. Grieselhuber, K. Williams, T.-H. Lai, L. Alinari, R.A. Baiocchi, L. Brinton, E. Baskin, M. Cannon, L. Beaver, V.M. Goettl, D.M. Lucas, J.A. Woyach, D. Sampath, A.M. Lehman, L. Yu, J. Zhang, Y. Ma, Y. Zhang, W. Spevak, S. Shi, P. Severson, R. Shellooe, H. Carias, G. Tsang, K. Dong, T. Ewing, A. Marimuthu, C. Tantoy, J. Walters, L. Sanftner, H. Rezaei, M. Nespi, B. Matusow, G. Habets, P. Ibrahim, C. Zhang, E.A. Mathé, G. Bollag, J.C. Byrd, R. Lapalombella, BRD4 profiling identifies critical chronic lymphocytic leukemia oncogenic circuits and reveals sensitivity to PLX51107, a novel structurally distinct BET inhibitor, *Cancer Discov.* 8 (2018) 458–477, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0902>.
- [43] N.A. Meanwell, Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 2529–2591, <https://doi.org/10.1021/jm1013693>.
- [44] A. Hoshi, T. Sakamoto, J. Takayama, M. Xuan, M. Okazaki, T.L. Hartman, R. W. Buckheit, C. Pannecouque, M. Cushman, Systematic evaluation of methyl ester bioisosteres in the context of developing alkenylarylmethanes (ADAMs) as non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) for anti-HIV-1 chemotherapy, *Bioorg. Med. Chem.* 24 (2016) 3006–3022, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.010>.
- [45] E. Ward, C. DeSantis, A. Robbins, B. Kohler, A. Jemal, Childhood and adolescent cancer statistics, 2014, *CA Cancer J. Clin.* 64 (2014) 83–103, <https://doi.org/10.3322/caac.21219>.
- [46] L. Di, E. Kerns, *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*, second ed., Academic Press, Amsterdam; Boston, 2016.
- [47] L. Di, P.V. Fish, T. Mano, Bridging solubility between drug discovery and development, *Drug Discov* 17 (2012) 486–495, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.11.007>.
- [48] G. Ottaviani, S. Martel, P.-A. Carrupt, Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3948–3954, <https://doi.org/10.1021/jm060230+>.
- [49] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 4–17, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- [50] T. Bohnert, L.-S. Gan, Plasma protein binding: from discovery to development, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 2953–2994, <https://doi.org/10.1002/jps.23614>.
- [51] P. Baranczewski, A. Stańczak, K. Sundberg, R. Svensson, A. Wallin, J. Jansson, P. Garberg, H. Postlind, Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development, *Pharmacol. Rep.* 58 (2006) 453–472.
- [52] O. Pelkonen, M. Turpeinen, H. Raunio, In vivo-in vitro-in silico pharmacokinetic modelling in drug development: current status and future directions, *Clin. Pharmacokinet.* 50 (2011) 483–491, <https://doi.org/10.2165/11592400-000000000-00000>.



J. Serb. Chem. Soc. 90 (7–8) 837–856 (2025)
JSCS–5424

Comparative *in silico/in vitro* analysis of pharmacokinetic profiles of BET inhibitors

MLADEN KORAVOVIĆ^{1*}, MILENA KOVAČEVIĆ^{2**}, Marija JOVANOVIĆ²,
GORDANA TASIĆ¹, ANAND MAYASUNDARI³, GISELE NISHIGUCHI³,
BOJAN MARKOVIĆ⁴, ZORAN RANKOVIĆ^{3,5} and VLADIMIR SAVIĆ¹

¹Department of Organic Chemistry, University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia, ²Department of Pharmacokinetics and Clinical Pharmacy, University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia, ³Department of Chemical Biology and Therapeutics, St. Jude Children's Research Hospital, 262 Danny Thomas Place, Memphis, TN, 38105, USA, ⁴Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia and ⁵Centre for Protein Degradation, Institute of Cancer Research, 15 Cotswold Road, Sutton, London, SM2 5NG, UK

(Received 11 December 2024, revised 18 May, accepted 15 June 2025)

Abstract: Pharmacokinetic limitations are a common cause of drug development failure, making early-stage profiling essential to mitigate financial risks and guide compound optimization. The computational tools capable of predicting pharmacokinetic properties offer a valuable resource for the prioritizing of candidates during early discovery phases. This study provides a comparative analysis of *in silico* and *in vitro* pharmacokinetic profiles of bromodomain and extraterminal domain (BET) inhibitors (BIs), focusing on sixteen (+)-JQ1-derived compounds we previously synthesized. Using ADMETlab 2.0 software, we predicted key absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) parameters and compared them with experimentally determined data. Strong correlations were observed for plasma protein binding, whereas notable discrepancies were identified in permeability and clearance values. Additionally, the analysis underscores the role of CYP3A4 as a critical enzyme in the metabolism of several BIs. These findings demonstrate the utility of computational tools like ADMETlab 2.0 for early pharmacokinetic profiling while highlighting the need for validation and refinement of predictive models. This work provides valuable insights into the pharmacokinetics of BIs and supports the integration of computational and experimental approaches in drug discovery.

Keywords: (+)-JQ1; ADME analysis; ADMETlab 2.0; drug development.

*,** Corresponding authors. E-mail: (*)mladen.koravovic@pharmacy.bg.ac.rs;
(**)milena.kovacevic@pharmacy.bg.ac.rs
<https://doi.org/10.2298/JSC241211042K>

INTRODUCTION

The challenges related to pharmacokinetics frequently contribute to the failure of drug development, emphasizing the importance of early evaluation and refinement of these properties during drug discovery. In the context of drug development, particularly for orally administered agents like bromodomain and extraterminal domain (BET) inhibitors, the desirable pharmacokinetic properties include: high intestinal absorption and permeability to ensure sufficient bioavailability; moderate to high metabolic stability to avoid rapid degradation; balanced plasma protein binding to ensure the adequate free (unbound) drug concentration and avoid the potential variability related to the albumin concentration; optimal volume of distribution, indicating the ability to reach the target tissues, including those with poor blood supply; reasonable half-life to maintain the therapeutic plasma levels without frequent dosing; and the low potential for drug-drug interactions, especially via cytochrome P450 (CYP450) enzymes like CYP3A4. For BET inhibitors (BIs) targeting systemic or central nervous system (CNS) malignancies, additional desirable features include blood–brain barrier (BBB) penetration and resistance to P-glycoprotein (P-gp)-mediated efflux, which can hinder CNS drug delivery. These criteria guide early-stage screening to prioritize candidates likely to exhibit effective and safe pharmacological profiles *in vivo*.

The computational tools, such as ADMETlab 2.0, enable the prediction of absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) properties, offering valuable insights for drug design.¹ Building on our previous research,² this study evaluates the pharmacokinetics of (+)-JQ1-derived, BIs using a combination of *in silico* and *in vitro* approaches.

The BET protein family, comprising BRD2, BRD3, BRD4 and BRDT, plays a crucial role in transcriptional regulation by recognizing the acetylated lysine residues on chromatin.^{3–5} These proteins are implicated in various diseases, making them attractive therapeutic targets. BIs have shown efficacy in hematological malignancies such as acute myeloid leukemia,⁷ multiple myeloma⁸ and diffuse large B-cell lymphoma,⁹ as well as in solid tumors including triple-negative breast cancer,¹⁰ glioblastoma¹¹ and NUT midline carcinoma.¹² Beyond oncology, BET inhibition is being explored in inflammatory and autoimmune disorders such as systemic lupus erythematosus¹³ and rheumatoid arthritis¹⁴ and even in fibrotic diseases¹⁵ and cardiovascular conditions.¹⁶ The wide range of potential indications highlights the clinical relevance of pharmacokinetically optimizing BIs for both systemic and tissue-targeted therapies. Among the BIs, (+)-JQ1 has shown remarkable preclinical efficacy across numerous disease models.¹⁷ However, its limited pharmacokinetic properties have posed challenges for clinical application.¹⁸

To address these limitations, our group has developed a series of potent (+)-JQ1-derived amides.² Expanding on this work, we utilized ADMETlab 2.0 to predict the pharmacokinetic profiles of these novel compounds and compared the

computational predictions with experimental data to identify correlations. These findings enhance the understanding of Bis' pharmacokinetics, facilitating the development of next-generation BIs and enabling the selection of promising candidates for further evaluation. This study systematically correlates *in silico* and *in vitro* ADME results for BIs, offering a comprehensive pharmacokinetic discussion that integrates computational predictions with experimental findings.

The chemical structures of the studied BIs are presented in Fig. 1.

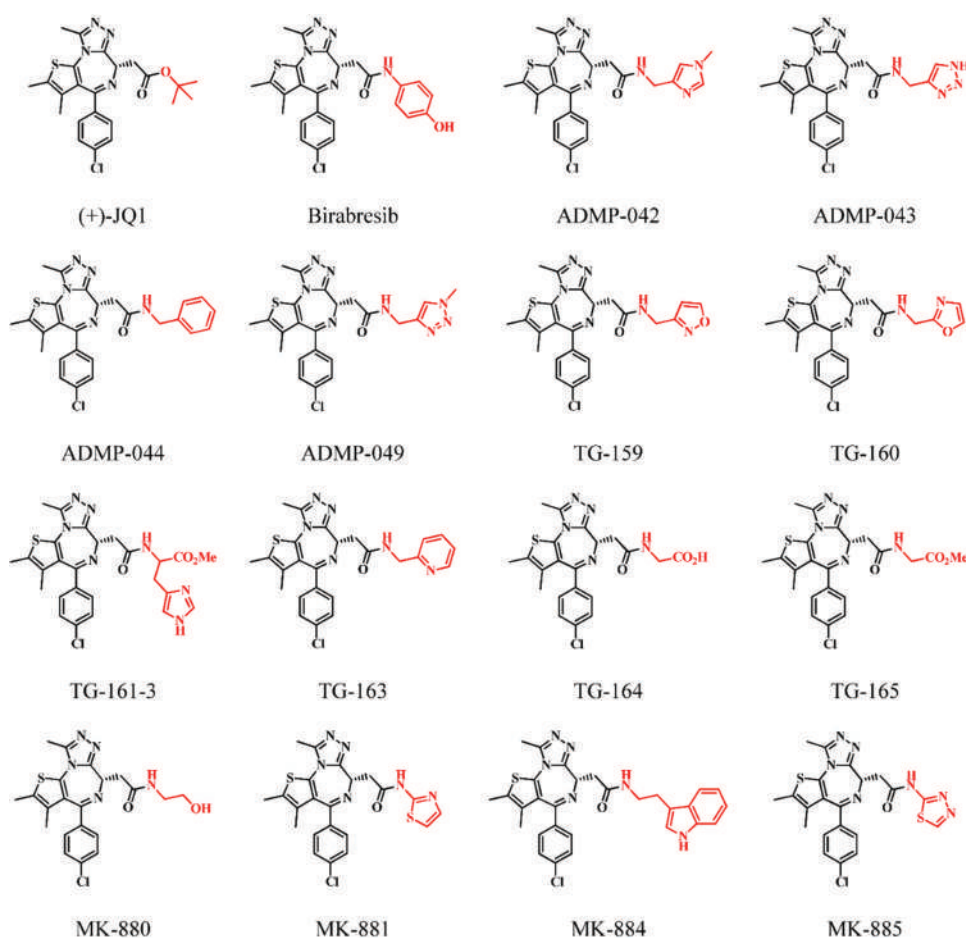


Fig. 1. Chemical structures of the studied (+)-JQ1-derived BIs (parts of molecules marked in red indicate structural differences among the studied BIs).

MATERIALS AND METHODS

In this study, ADMETlab 2.0 was used to predict the ADMET properties of previously characterized BIs *in vitro*.² This platform utilizes a comprehensive ADMET database for predicting various pharmacokinetic and toxicological parameters using QSAR models built from

288,967 chemicals.^{1,19} The predictions are based on six modelling algorithms: random forests (RF), support vector machine (SVM), recursive partitioning regression (RP), partial least square (PLS), naive Bayes (NB) and decision tree (DT).¹ ADMETlab 2.0 includes 17 physicochemical properties, 13 medicinal chemistry properties, 23 ADME properties, 27 toxicity endpoints and 8 toxicophore rules (751 substructures).²⁰ The structures of BIs were drawn using ChemDraw Ultra 12.0, with SMILES input and output retrieved as .csv files. ADMETlab 2.0 was chosen for its accuracy and large database,^{1,20} providing the comprehensive pharmacokinetic predictions that align with the study's needs.

Additionally, MarvinSketch 4.1.13 was used to predict ionization and logD values. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 28.0. The strength and the direction of association between ADMETlab 2.0 output and experimental data were evaluated using bivariate Spearman's correlation, with Spearman's rank correlation coefficients (ρ) and p values reported. Correlation interpretation followed these criteria: $\rho \geq 0.700$ (strong), $0.400 \leq \rho < 0.700$ (moderate) and $\rho < 0.400$ (weak).²¹ The correlations were also assessed using the Wilcoxon signed-rank test, and the results were visualized with box-and-whisker plots. Pharmacokinetic parameters were represented by median values and interquartile ranges (IQRs).

A sample of sixteen compounds was selected to balance dataset robustness with detailed analysis. This structurally diverse set allows evaluation of pharmacokinetic properties and their relationship to structural variation. The focused nature of the study provides detailed data for further research.

To ensure the clarity and the consistency throughout this study, we introduce a specific notation: results obtained through computational predictions, referred to as *in silico*, are denoted with the superscript "IS" (e.g., predicted pharmacokinetic parameter^{IS}). Similarly, the results derived from experimental assays, referred to as *in vitro*, are denoted with the superscript "IV" (e.g., measured pharmacokinetic parameter^{IV}). This notation is applied consistently throughout the text to provide a clear and immediate distinction between the two types of datasets. However, in tables where the data are already explicitly classified into *in silico* and *in vitro* groups, the superscripts "IS" and "IV" are omitted to maintain visual simplicity.

RESULTS AND DISCUSSION

Absorption

A total of seven pharmacokinetic parameters relevant for absorption were predicted using ADMETlab 2.0: three parameters predicting the extent of absorption – *HIA prob.*^{IS}, *F(20%)*^{IS} and *F(30%)*^{IS}, two parameters predicting the permeability – *Caco-2 perm.*^{IS} and *MDCK perm.*^{IS}, and two parameters predicting whether the studied BIs act as P-gp substrates or inhibitors – *P-gp sub.*^{IS} and *P-gp inh.*^{IS}, respectively. The obtained *in silico* and *in vitro* results regarding absorption are presented in Tables I and II.

Heatmap is based on an *in silico* empirical decision. The cells marked in green, yellow or red denote excellent, medium or poor results, respectively.²²

The extent of the human intestinal absorption (*HIA*) was reported through the probabilities (*HIA prob.*^{IS} values) of the tested compounds to have *HIA* below 30 %. Hence, the lower the *HIA prob.*^{IS}, the higher the intestinal absorption. These probabilities ranged from 0.004 to 0.047. Thirteen out of sixteen tested candidates had *HIA prob.*^{IS} below 0.010, appropriate for orally administered drugs. The

compound MK-881 showed the best *HIA prob.*^{IS} of 0.004, similar to birabresib as the reference drug. Interestingly, the lowest value of intestinal absorption was predicted for (+)-JQ1, whose *HIA prob.*^{IS} was as high as 0.047.

TABLE I. Absorption-related *in silico* results

Compound	<i>HIA prob.</i> ^a	<i>F</i> (20%) ^b	<i>F</i> (30%) ^c	<i>Caco-2 perm.</i> ^d	<i>Caco-2 perm. calc.</i> , nm s ⁻¹	<i>MDCK perm.</i> ^e , nm s ⁻¹	<i>P-gp sub.</i> ^f	<i>P-gp inh.</i> ^g
(+)-JQ1	0.047	0.002	0.022	-4.475	334.97	215.99	0.006	0.001
Birabresib	0.004	0.001	0.001	-4.787	163.31	187.98	0.714	0.001
ADMP-042	0.007	0.001	0.218	-4.656	220.80	268.83	0.812	0
ADMP-043	0.007	0.001	0.002	-4.826	149.28	171.63	0.992	0
ADMP-044	0.005	0.001	0.001	-4.703	198.15	182.99	0.033	0.002
ADMP-049	0.018	0.002	0.009	-4.590	257.04	263.26	0.860	0
TG-159	0.007	0.001	0.001	-4.616	242.10	195.39	0.243	0
TG-160	0.006	0.001	0.001	-4.615	242.66	259.52	0.129	0
TG-161-3	0.006	0.001	0.003	-4.718	191.43	171.08	0.989	0
TG-163	0.005	0.001	0.001	-4.672	212.81	235.96	0.043	0.001
TG-164	0.008	0.001	0.001	-4.793	161.06	246.16	0.685	0.001
TG-165	0.014	0.002	0.004	-4.587	258.82	255.60	0.606	0.001
MK-880	0.005	0.002	0.002	-4.512	307.61	276.85	0.730	0
MK-881	0.004	0.001	0.002	-4.696	201.37	253.39	0.285	0
MK-884	0.006	0.001	0.009	-5.026	94.19	164.93	0.430	0.034
MK-885	0.005	0.001	0.002	-4.712	194.09	277.64	0.936	0

^aThe output values, ranging between 0 and 1, represent the probability that the compound has human intestinal absorption < 30 %. ^bThe output values, ranging between 0 and 1, represent the probability that the compound has bioavailability < 20 %. ^cThe output values, ranging between 0 and 1, represent the probability that the compound has bioavailability < 30 %. ^dOptimal is > -5.15. ^eLow permeability: < 20 nm s⁻¹; medium permeability: 20–200 nm s⁻¹; high permeability: > 200 nm s⁻¹. ^fThe output values, ranging between 0 and 1, represent the probability that the compound is a P-glycoprotein substrate. ^gThe output values, ranging between 0 and 1, represent the probability that the compound is a P-glycoprotein inhibitor

The last two parameters used to predict the extent of absorption were *F*(20%)^{IS} – the probability of a drug having oral bioavailability below 20 % and *F*(30%)^{IS} – the probability of a drug having oral bioavailability below 30 %. As for the previous parameter, lower probability values denote higher oral bioavailability. The range of *F*(20%)^{IS} values (0.001–0.002) was narrow, thus not particularly informative for comparing the compounds, although it did suggest that the studied compounds have very low probabilities of exhibiting bioavailabilities below 20 %. In contrast to *F*(20%)^{IS}, *F*(30%)^{IS} highlighted ADMP-042 as the compound with the highest predicted value, indicating the greatest probability of having bioavailability below 30 % among the studied BIs. The extent of the human intestinal absorption (HIA) was reported through the probabilities (*HIA prob.*^{IS} values) of the tested compounds to have HIA below 30 %. Hence, the lower the *HIA prob.*^{IS}, the higher the intestinal absorption. These probabilities ranged from 0.004 to 0.047. Thirteen out of sixteen tested candidates had *HIA prob.*^{IS} below 0.010,

appropriate for orally administered drugs. The compound MK-881 showed the best *HIA prob.*^{IS} of 0.004, similar to birabresib as the reference drug. Interestingly, the lowest value of intestinal absorption was predicted for (+)-JQ1, whose *HIA prob.*^{IS} was as high as 0.047.

TABLE II. *In vitro* permeability data from PAMPA and Caco-2 assay; Avg. *P* – average permeability; Avg. *P*_{app} A–B – average apparent permeability coefficient from apical to basolateral side; Avg. *P*_{app} B–A – average apparent permeability coefficient from basolateral to apical side; *ER* – efflux ratio; *R* – recovery; *SD* – standard deviation

Compound	PAMPA		Caco-2 permeability assay		
	Avg. <i>P</i> ± <i>SD</i> , 10 ⁻⁶ cm s ⁻¹	<i>R</i> ± <i>SD</i> / %	Avg. <i>P</i> _{app} A–B± <i>SD</i> nm s ⁻¹	Avg. <i>P</i> _{app} B–A± <i>SD</i> , nm s ⁻¹	<i>ER</i>
(+)-JQ1	> 1800	59.52±16.79	63.97±11.63	46.67±12.91	0.73
Birabresib	315.13±23.20	95.20±1.42	221.60±67.35	485.39±142.68	2.19
ADMP-042	0	44.20±6.33	9.16±0.39	311.21±92.63	33.96
ADMP-043	2.09±0.68	23.68±1.17	2.50±0.41	28.03±8.54	11.20
ADMP-044	1797.07±277.74	71.66±11.23	42.20±14.58	44.51±13.17	1.05
ADMP-049	14.04±3.37	32.25±2.47	6.17±3.15	246.45±133.88	39.93
TG-159	274.52±41.45	65.06±1.82	150.34±40.42	777.89±185.65	5.17
TG-160	97.17±7.28	61.69±1.68	30.39±7.46	297.37±55.89	9.79
TG-161-3	0	33.64±0.78	7.74±10.38	14.18±5.75	1.83
TG-163	177.45±20.63	74.32±3.59	98.37±9.55	568.43±106.65	5.78
TG-164	0.54±0.93	8.52±0.26	4.51±0.95	7.81±5.20	1.73
TG-165	231.31±53.54	47.45±5.58	63.76±8.53	307.31±35.59	4.82
MK-880	20.80±1.19	31.11±1.22	6.98±0.95	83.32±15.08	11.94
MK-881	544.83±34.50	80.49±1.47	19.10±12.38	41.09±8.55	2.15
MK-884	>1800	90.51±N/D	5.69±1.43	13.79±7.81	2.42
MK-885	533.96±237.40	91.83±4.43	66.46±26.53	180.11±54.68	2.71

The predicted Caco-2 permeability was reported through *Caco-2 perm.*^{IS} with a subsequent calculation to derive *Caco-2 perm. calc.*^{IS}. All candidates showed an acceptable *Caco-2 perm.*^{IS} since all values were greater than –5.15. The compound MK-884 showed the poorest *Caco-2 perm.*^{IS}, followed by ADMP-043 and TG-164, whereas (+)-JQ1 showed the best *Caco-2 perm.*^{IS}. The set of *in silico*- (*Caco-2 perm. calc.*^{IS}, Table I) and *in vitro*-obtained results (Avg. *P*_{app} A–B^{IV}, Table II) regarding Caco-2 permeability were compared through the Wilcoxon signed-ranked test (Fig. S-1A of the Supplementary material to this paper). The median value regarding predicted Caco-2 permeability notably surpassed that determined through *in vitro* assessment with the respective values of 207.09 nm s⁻¹ (*IQR* 170.34–253.44 nm s⁻¹) and 24.74 nm s⁻¹ (*IQR* 6.37–65.84 nm s⁻¹). Thus, the direct comparison between *in silico*- and *in vitro*-obtained Caco-2 permeability results demonstrated a statistically significant difference (*p* < 0.001). A bar plot with paired data (Fig. S-1B of the Supplementary material) provides a visual representation that more effectively highlights the relationship between *in silico* and *in*

vitro results, offering a clearer perspective on their degree of alignment. In general, all BIs exhibited higher predicted Caco-2 permeabilities compared to those determined *in vitro*.

MDCK permeability was predicted as well and reported through *MDCK perm.^{IS}*. Based on this parameter, the studied compounds were classified as medium (0.2×10^{-5} – 2×10^{-5} cm s⁻¹) or high permeable (above 2×10^{-5} cm s⁻¹). Ten candidates, including (+)-JQ1, had high, whereas six candidates, including birabresib, had medium predicted MDCK permeabilities.

The final two predicted parameters, *P-gp sub.^{IS}* and *P-gp inh.^{IS}*, keep to absorption and predict whether the tested BIs perform as substrates or inhibitors of P-gp, respectively. Tested compounds differed significantly in terms of being P-gp substrates, having *P-gp sub.^{IS}* values from 0.006 to 0.989. This variability might affect drug distribution and therefore requires attention. The highest probability of being a P-gp inhibitor was predicted for MK-884, with *P-gp inh.^{IS}* of 0.034. In contrast, other candidates showed substantially lower *P-gp inh.^{IS}* comparable to birabresib or (+)-JQ1. Interestingly, nine candidates had *P-gp inh.^{IS}* equal to zero.

In vitro assessment of absorption of the studied BIs was performed *via* PAMPA and Caco-2 permeability assay.² A notable dispersion of results was observed, signifying substantial variability in permeabilities of the tested compounds. PAMPA reported the highest permeability for ADMP-044, approximately six times higher than for birabresib. Also, high permeabilities were observed for MK-881 and MK-885, followed by birabresib. Only four compounds (MK-881, MK-884, MK-885 and birabresib) had recovery (*R*) above 80 %.

Table S-I of the Supplementary material provides a detailed overview of the statistical correlations between *in silico*- and *in vitro*-assessed pharmacokinetic parameters relevant to absorption. Moderate negative correlations were noted between *HIA prob.^{IS}* and PAMPA results, *P-gp sub.^{IS}* and Avg. *P^{IV}*, and *P-gp inh.^{IS}* and *ER^{IV}*.

Distribution

The pharmacokinetic parameters relevant for distribution include BBB penetrability (*BBB pen.^{IS}*), plasma protein binding (*PPB^{IS}* and *PPB^{IV}*), volume of distribution (*V_d^{IS}*) and unbound fraction (*F_u^{IS}*). The results obtained from ADMETlab 2.0 and *in vitro* assessments are presented in Table III.

The predicted BBB penetrability showed high values ranging from 0.808 to 0.992, with birabresib having a probability of 0.923. The lowest *BBB pen.^{IS}* was estimated for compound TG-164, likely due to its higher hydrophilicity resulting from the presence of a free carboxylic acid. Despite the high values being marked in red according to the ADMETlab 2.0's empirical decision, BBB penetrable BIs are generally desirable for certain CNS diseases.²³

TABLE III. Representation of *in silico*- and *in vitro*-obtained results regarding distribution; Heatmap is based on an *in silico* empirical decision. Cells marked in green or red denote excellent or poor results, respectively;²² V_d – volume of distribution; F_u – unbound fraction; SD – standard deviation

Compound	<i>In silico</i> -obtained results				<i>In vitro</i> -obtained results
	<i>BBB pen.</i> ^a	<i>PPB</i> ^b , %	V_d ^c / L kg ⁻¹	F_u ^d / %	<i>PPB</i> ± <i>SD</i> , %
(+)-JQ1	0.987	93.97	1.419	9.76	99.15±0.03
Birabresib	0.923	96.10	1.17	5.97	97.27±0.15
ADMP-042	0.904	82.36	1.674	26.74	98.53±0.40
ADMP-043	0.940	91.87	1.683	13.73	94.77±0.32
ADMP-044	0.991	94.89	0.933	11.07	98.68±0.14
ADMP-049	0.931	91.08	1.686	20.18	97.54±0.04
TG-159	0.971	93.59	1.239	11.02	93.45±0.45
TG-160	0.981	86.44	1.030	23.21	94.08±0.57
TG-161-3	0.937	77.41	1.105	28.23	92.68±0.71
TG-163	0.984	90.26	1.238	17.14	97.21±0.24
TG-164	0.808	85.37	0.876	15.73	85.57±2.50
TG-165	0.992	86.02	1.478	22.58	91.03±1.46
MK-880	0.985	79.77	1.607	24.88	86.90±0.67
MK-881	0.985	91.96	1.136	11.16	98.24±0.14
MK-884	0.983	95.93	1.210	6.92	99.59±0.03
MK-885	0.983	93.57	1.248	7.87	97.22±0.37

^aThe output values, ranging between 0 and 1, represent the probability that the compound is blood-brain barrier penetrable. ^bOptimal is ≤90 %. ^cOptimal is from 0.04 to 20 L kg⁻¹. ^dLow is <5 %, medium is 5–20 % and high is >20 %

The *in vitro* experiments revealed higher affinities for 14 out of 16 tested compounds compared to *in silico* predictions. The Wilcoxon signed-rank test (Fig. S-2A of the Supplementary material) showed a statistically significant difference ($p < 0.001$) between PPB^{IS} and PPB^{IV} , with median values of 91.47 % (IQR 85.69–93.78 %) and 97.21 % (IQR 92.87–98.46 %), respectively. A bar plot with paired data (Fig. S-2B of the Supplementary material) visually depicts the relationship between *in silico* and *in vitro* results, providing a more intuitive understanding of their degree of alignment.

The V_d^{IS} ranged between 0.876 and 1.686 L kg⁻¹, with TG-164 predicted to have the lowest V_d^{IS} . ADMP-049 demonstrated the highest V_d^{IS} , despite not being classified among the most lipophilic compounds.

Table S-I provides a comprehensive representation of the statistical correlations between *in silico*- and *in vitro*-assessed pharmacokinetic parameters relevant to distribution. Moderate positive correlation was observed between $BBB pen.^{IS}$ and Avg. P^{IV} . Additionally, PPB^{IS} exhibited strong positive correlations with both Avg. P^{IV} and R^{IV} . Moderate positive correlations were also found between *in silico*- and *in vitro*-assessed plasma protein binding values, as well as

between V_d^{IS} and ER^{IV} . Notably, a strong negative correlation was identified between F_u^{IS} and Avg. P^{IV} , while F_u^{IS} and R^{IV} demonstrated a moderate negative correlation.

Metabolism and excretion

In silico evaluation of metabolism included predicting the probabilities of the BIs being substrates or inhibitors of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4. Results are shown in Table IV.

TABLE IV. Probabilities of the studied bis being cyp450 substrates and/or inhibitors; the output values, ranging between 0 and 1, represent the probability that the compound is cytochrome P450 substrate and/or inhibitor

Compound	CYP1A2		CYP2C9		CYP2C19		CYP2D6		CYP3A4	
	Sub.	Inh.	Sub.	Inh.	Sub.	Inh.	Sub.	Inh.	Sub.	Inh.
(+)-JQ1	0.943	0.098	0.115	0.837	0.909	0.635	0.019	0.040	0.959	0.458
Birabresib	0.952	0.173	0.728	0.890	0.744	0.495	0.078	0.399	0.960	0.665
ADMP-042	0.933	0.170	0.057	0.371	0.748	0.251	0.055	0.008	0.956	0.863
ADMP-043	0.889	0.186	0.085	0.430	0.708	0.209	0.032	0.010	0.952	0.662
ADMP-044	0.864	0.143	0.177	0.900	0.856	0.643	0.077	0.069	0.958	0.861
ADMP-049	0.916	0.136	0.066	0.327	0.912	0.228	0.060	0.007	0.956	0.646
TG-159	0.668	0.144	0.096	0.791	0.858	0.391	0.068	0.014	0.956	0.862
TG-160	0.671	0.126	0.067	0.746	0.852	0.382	0.071	0.011	0.957	0.768
TG-161-3	0.893	0.094	0.072	0.669	0.637	0.252	0.014	0.177	0.960	0.932
TG-163	0.626	0.144	0.121	0.639	0.873	0.311	0.070	0.010	0.956	0.863
TG-164	0.377	0.113	0.762	0.095	0.829	0.114	0.073	0.013	0.949	0.079
TG-165	0.644	0.129	0.084	0.448	0.876	0.262	0.071	0.008	0.959	0.750
MK-880	0.778	0.164	0.115	0.232	0.856	0.156	0.057	0.007	0.957	0.450
MK-881	0.979	0.378	0.648	0.821	0.844	0.590	0.043	0.104	0.961	0.799
MK-884	0.961	0.197	0.740	0.942	0.773	0.847	0.076	0.649	0.960	0.956
MK-885	0.979	0.581	0.442	0.686	0.690	0.459	0.021	0.125	0.963	0.833

The predicted metabolic pathway predominantly involves CYP3A4, as all compounds appear to be good substrates for this enzyme. In addition, CYP1A2 was expected to have a significant contribution to metabolic transformations, with most compounds showing high probabilities of being CYP1A2 substrates. However, TG-164 exhibited distinct behaviour, with a lower probability of being a CYP1A2 substrate (0.377) and a much higher probability of being a CYP2C9 substrate (0.762) compared to other BIs. Interestingly, apart from TG-164, all studied BIs seem to be potential inhibitors of CYP3A4. This is an important information for considering potential drug-drug interactions.

Table V presents the pharmacokinetic parameters relevant to elimination: clearances (CL^{IS} and CL_{int}^{IV}) and half-lives ($t_{1/2}^{prob.IS}$, $t_{1/2}^{calc.IS}$ and $t_{1/2}^{IV}$).

CL^{IS} values ranged from 0.851 to 3.344 mL min⁻¹ kg⁻¹. The highest values were reported for (+)-JQ1 (3.291 mL min⁻¹ kg⁻¹) and TG-161-3 (3.344 mL min⁻¹ kg⁻¹), whereas CL^{IS} for birabresib was predicted to be 1.365 mL min⁻¹ kg⁻¹.

TABLE V. Clearances and half-lives of the studied compounds; Heatmap is based on an *in silico* empirical decision. Cells marked in green, yellow, or red denote excellent, medium, or poor results, respectively;²² CL – total clearance; $t_{1/2}$ – half-life; CL_{int} – intrinsic clearance; SD – standard deviation

Compound	<i>In silico</i> -obtained results			<i>In vitro</i> -obtained results	
	CL^a mL min ⁻¹ kg ⁻¹	$t_{1/2} prob.^b$	$t_{1/2} calc. / h$	$CL_{int} /$ mL min ⁻¹ kg ⁻¹	$t_{1/2} \pm SD / h$
(+)-JQ1	3.291	0.117	4.98	51.21	0.41 ± 0.01
Birabresib	1.365	0.172	9.90	12.33	1.69 ± 0.08
ADMP-042	2.352	0.442	8.22	42.52	0.49 ± 0.03
ADMP-043	1.419	0.359	13.70	35.87	0.58 ± 0.02
ADMP-044	1.687	0.105	6.39	329.76	0.06 ± 0.00
ADMP-049	2.708	0.199	7.20	38.79	0.54 ± 0.02
TG-159	1.406	0.184	10.18	60.09	0.35 ± 0.01
TG-160	1.589	0.219	7.49	3.60	5.78 ± 0.47
TG-161-3	3.344	0.434	3.82	4.40	4.72 ± 0.59
TG-163	1.538	0.191	9.30	229.14	0.09 ± 0.01
TG-164	0.851	0.465	11.89	1.84	11.29 ± 2.41
TG-165	1.620	0.307	10.54	19.23	1.08 ± 0.03
MK-880	1.851	0.300	10.03	6.52	3.19 ± 0.13
MK-881	1.562	0.120	8.40	18.86	1.10 ± 0.11
MK-884	2.644	0.108	5.29	79.26	0.26 ± 0.03
MK-885	1.246	0.103	11.57	6.52	3.19 ± 0.13

^aHigh is >15 mL min⁻¹ kg⁻¹, moderate is 5–15 mL min⁻¹ kg⁻¹, and low is <5 mL min⁻¹ kg⁻¹. ^bThe output values, ranging between 0 and 1, represent the probability that the compound has half-life >3 h

The calculated values ranged from 3.82 h (TG-161-3) to 11.89 h (TG-164). Birabresib had $t_{1/2} calc.^{IS}$ of 9.90 h, while it was 4.98 h for (+)-JQ1. In general, the calculated half-lives were greater than those experimentally assessed. In line with this, the Wilcoxon signed-rank test (Fig. S-3A of the Supplementary material) showed a statistically significant difference ($p < 0.001$) between half-lives obtained *in silico* and *in vitro*. The corresponding median values are 8.85 h (*IQR* 6.59–10.45 h) and 0.83 h (*IQR* 0.36–3.19 h). A bar plot with paired data (Fig. S-3B) provides a visual representation that simplifies and makes the understanding of calculated and *in vitro*-assessed half-lives more straightforward. The best agreement was observed for TG-164 (11.89 and 11.29 h, respectively), and very good agreement was noted for TG-160 and TG-161-3.

As already described, a metabolic stability assay using human liver microsomes was employed to assess intrinsic clearances (CL_{int}^{IV}) of the studied BIs.² The obtained results were as follows: ten compounds showed high CL_{int}^{IV} , while three compounds had moderate CL_{int}^{IV} (birabresib, MK-880, MK-885). These

molecules might be considered to have appropriate metabolic stability. By contrast, compounds showing low metabolic stability (*i.e.*, having very high CL_{int}^{IV}) had quite short $t_{1/2}^{IV}$, which ultimately makes them unsuitable for further investigation (ADMP-044 and TG-163).

Table S-I provides a detailed representation of the statistical correlations between pharmacokinetic parameters relevant to metabolism and excretion, obtained from both *in silico* and *in vitro* studies. Summarily, $t_{1/2}^{prob.IS}$ showed strong negative correlations with both Avg. P^{IV} and R^{IV} and a moderate negative correlation with PPB^{IV} . On the other hand, $t_{1/2}^{calc.IS}$ showed a moderate negative correlation with PPB^{IV} .

This study assessed the pharmacokinetic properties of BIs derived from (+)-JQ1 using *in silico* predictions from ADMETlab 2.0, which were subsequently compared with *in vitro* data. An effective *in silico* model would streamline the optimization of Bis' structures and facilitate the selection of candidates for further development, reducing the need for extensive experimental efforts. ADMETlab 2.0 was chosen for its comprehensive database and proven accuracy in predicting ADME properties.^{1,20} While some discrepancies were noted between the predictions and experimental results, the tool still offered valuable insights. These differences highlight the challenges in accurately modelling pharmacokinetics computationally and emphasize the need to validate predictions with experimental data. Rather than detracting from ADMETlab 2.0's utility, the findings suggest areas for improvement in predictive models. The study focused on sixteen structurally diverse compounds, providing a detailed comparison and forming the basis for future research with larger datasets.

Absorption

Newly synthesized BIs are intended for oral administration in contemporary anticancer therapy, requiring sufficient intestinal permeability. A moderate negative correlation was observed between $HIA^{prob.IS}$ (indicating the likelihood of human intestinal absorption being below 30 %) and PAMPA-obtained *in vivo* results (Avg. P^{IV} and R^{IV}). This relationship reflects the shared focus of both methods on gut wall permeability: $HIA^{prob.IS}$ predicts the likelihood of absorption through the gut wall using a computational model, while PAMPA experimentally assesses passive permeability across a lipid membrane in an *in vivo* setting. The observed correlation aligns with the expectation that compounds predicted to have poor absorption by $HIA^{prob.IS}$ are also less likely to exhibit high passive permeability in the PAMPA assay.

In contrast, no significant correlation was found between $F(20\%)^{IS}$ or $F(30\%)^{IS}$ and PAMPA-obtained *in vivo* results (Avg. P^{IV} and R^{IV} , Table S-I). This discrepancy arises from the distinct scope of these methods. Unlike $HIA^{prob.IS}$,

which exclusively evaluates gut wall absorption, $F(20\%)^{IS}$ and $F(30\%)^{IS}$ incorporate presystemic metabolic processes, such as metabolism occurring in the gut wall or liver, to provide a broader estimate of a compound's efficiency in reaching systemic circulation. The absence of correlation with PAMPA-obtained *in vivo* results, which do not account for metabolism, highlights the differences in these methods' focus. Consequently, the moderate negative correlation between $HIA_{prob.}^{IS}$ and Avg. P^{IV} and R^{IV} reflects their mutual emphasis on gut wall permeability. In contrast, the lack of correlation between $F(20\%)^{IS}$ or $F(30\%)^{IS}$ and Avg. P^{IV} and R^{IV} underscores the influence of presystemic metabolism on these broader pharmacokinetic predictions.

No significant correlation was found between *in silico*-predicted and *in vitro*-assessed Caco-2 permeability (Fig. S-1A, Table S-I). This suggests that the *in silico* model may not fully capture the complexity of the *in vitro* conditions, which involve multiple biological processes, such as transporter interactions and efflux mechanisms, that are difficult to simulate accurately. High $P_{app} A-B^{IV}$ values may suggest good permeability, but many BIs exhibited undesirable ER^{IV} s over 3 (Table II), indicating potential active efflux involvement that could significantly impact bioavailability. These findings highlight the limitations of relying solely on *in silico* predictions for permeability assessment, as they may overlook critical biological factors influencing drug absorption. The further refinement of predictive models, considering transporter activity and efflux mechanisms, could help improve their alignment with experimental results and enhance their use in early drug development phases.

No correlation was found between Caco-2 permeability assay obtained Avg. $P_{app} A-B^{IV}$ and MDCK $perm.^{IS}$. The Caco-2 assay assesses intestinal absorption using cells derived from human colon adenocarcinoma, forming tight junctions and mimicking intestinal epithelium characteristics.²⁴ The alternative cell-based permeability assay employs MDCK cells. These exhibit rapid growth and differentiation, significantly shortening the duration of *in vitro* transport studies. Using MDCK cells in permeability-based assays offers an appealing substitute to Caco-2 cells, enabling the enhanced throughput and the expedited completion of transport studies for novel compounds.²⁵ The lack of correlation between *in vitro* assessment of Caco-2 permeability and *in silico* prediction of MDCK permeability could be due to differences in their origins, membrane composition, metabolic activity, and transporter expression.²⁶

A negative correlation between $P-gp_{sub.}^{IS}$ and Avg. P^{IV} (Table S-I) is due to the physicochemical properties of P-gp substrates, which are typically larger, more polar, and have multiple hydrogen bond donors and acceptors.²⁷ These properties hinder passive diffusion across lipid membranes, which PAMPA measures. Thus, PAMPA assesses passive permeability, which is inversely related to P-gp substrate recognition traits.

PAMPA showed variability in Avg. P^{IV} and R^{IV} values among BIs (Table II). The highest absorption was observed for (+)-JQ1, birabresib, ADMP-044, MK-881, MK-884 and MK-885, likely due to their high log D values (Table S-II of the Supplementary material). Combining PAMPA and Caco-2 permeability assay results (Table II) suggests these BIs exhibit favorable permeabilities, with minimal ionization at physiological pH, except for TG-164 (Table S-II).

A negative correlation was observed between $P\text{-gp inh.}^{IS}$ and ER^{IV} (Table S-I), suggesting that compounds more likely to inhibit P-gp tend to have lower ER^{IV} s. In other words, substances that inhibit P-gp-mediated efflux may lead to reduced ER^{IV} s in the Caco-2 permeability assay. This could be due to P-gp inhibitors blocking efflux activity, thereby decreasing the active drug efflux in the Caco-2 assay. Thus, higher $P\text{-gp inh.}^{IS}$ values may result in lower ER^{IV} s. It can be hypothesized that the studied BIs reduce their efflux by inhibiting P-gp.

While no statistically significant correlation between $P\text{-gp sub.}^{IS}$ and ER^{IV} was observed (Table S-I), a trend was noted wherein some compounds with higher $P\text{-gp sub.}^{IS}$ values also exerted higher ER^{IV} values. For instance, as shown in Tables I and II, the compounds such as ADMP-042, ADMP-043, ADMP-049 and MK-880, which exhibited higher $P\text{-gp sub.}^{IS}$ values (0.812, 0.992, 0.860 and 0.730, respectively), were also associated with elevated, double-digit ER^{IV} values (33.96, 11.20, 39.93 and 11.94, respectively). This observation aligns with the hypothesis that the substrates of P-gp may exhibit increased efflux, as reflected by higher ER^{IV} s. However, this relationship was not strong enough to be conclusive. Notably, phase I/II clinical trials have confirmed that new BIs are P-gp substrates but still show favourable absorption rates after oral administration.^{28–32} This discordance suggests that additional factors, beyond P-gp substrate status, influence BIs' absorption.

Distribution

The distribution phase is responsible for delivering a drug to its site of action. For BIs, BBB penetration is crucial, particularly for CNS tumor treatments. Based on $BBB pen.^{IS}$ values (Table III), all studied BIs, including TG-164 (despite its ionized carboxylic acid at physiological pH; Table S-II), are likely to cross the BBB, which in some cases might be desirable as birabresib has been investigated for recurrent glioblastoma multiforme.²³ A moderate positive correlation was observed between $BBB pen.^{IS}$ and Avg. P^{IV} (Table S-I), suggesting that higher passive permeability, as assessed by PAMPA, is associated with an increased probability of BBB penetration. This correlation likely reflects the overlapping physico-chemical properties required for both processes, such as optimal lipophilicity and molecular size. While passive permeability is an important determinant, other mechanisms such as active transport may also influence BBB penetration. For instance, TG-164's predicted BBB penetration, despite its ionized carboxylic acid

moiety at physiological pH, could be attributed to its amide-bound glycine group, which might facilitate LAT-1-mediated transport, similar to what is observed with levodopa.³³

The plasma protein binding plays a critical role in drug distribution. Based on PPB^{IS} values (Table III), ten out of sixteen BIs exhibited high plasma protein binding (more than 90 %), with the highest PPB^{IS} (96.10 %) predicted for birabresib. Generally, greater lipophilicity corresponds to higher plasma protein binding, as hydrophobic compounds preferentially bind to plasma proteins for transport. This relationship was supported by strong positive correlations between PPB^{IS} and both Avg. P^{IV} and R^{IV} (Table S-I), indicating that lipophilic compounds tend to exhibit higher permeability and recovery in the PAMPA assay as well as greater protein binding. Conversely, strong and moderate negative correlations were observed between F_u^{IS} and Avg. P^{IV} , and between F_u^{IS} and R^{IV} , respectively, suggesting that lower unbound fractions are associated with higher permeability and recovery. This highlights the interplay between lipophilicity, protein binding, and permeability. Additional factors, such as acid-base properties and specific protein interactions, should also be considered.

A moderate positive correlation was observed between *in silico*-predicted and *in vitro*-assessed plasma protein binding values using bivariate Spearman's correlation, indicating that the *in silico* model effectively captures relative trends in plasma protein binding among the studied compounds. However, the significant differences between the two datasets, as identified by the Wilcoxon signed-rank test (Fig. S-2A), suggest some systematic discrepancies in their central tendencies. This implies that while the *in silico* model is useful for ranking compounds based on the relative plasma protein binding values, further refinement is needed to enhance its predictive accuracy for absolute values.

The volume of distribution describes the apparent distribution extent of drugs within the body.³⁴ ADMETlab 2.0 predictions place V_d^{IS} values within the optimal range (0.04–20 L kg⁻¹),²² specifically from 0.876 to 1.686 L kg⁻¹. Predicted V_d^{IS} values exceeded the total body water (0.5–0.6 L kg⁻¹),³⁵ suggesting high tissue affinity. Multiplying V_d^{IS} values by 70 kg indicates distribution between 61 and 118 L. A moderate positive correlation was observed between V_d^{IS} and ER^{IV} , suggesting that higher efflux activity, often associated with tissue partitioning, may contribute to greater apparent distribution volumes. For example, TG-164 had a V_d^{IS} of 0.876 L kg⁻¹, which is linked to its low log D , likely due to the free carboxylic acid moiety (Fig. 1). However, its high probability of BBB penetration may be attributed to active transport mechanisms, as discussed earlier, potentially involving its amide-bound glycine group facilitating LAT-1-mediated transport. ADMP-049 had the highest V_d^{IS} (1.686 L kg⁻¹), despite its low log D (1.72; Table III and Table S-II). Overall, predicted V_d^{IS} values align with those from first-in-human BI studies, which report steady-state V_d^{IS} values of approximately 70 L.^{36,37}

Metabolism and excretion

ADMETlab 2.0 predicts the probabilities of compounds being substrates or inhibitors of CYP450 isoenzymes, including CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4 (Table IV). It was predicted that CYP3A4, CYP1A2 and CYP2C19 are dominant in the metabolism of the tested BIs, and that these compounds are also likely CYP3A4 and CYP2C9 inhibitors. These insights are valuable for guiding the future research into (+)-JQ1-derived BIs. The genetic polymorphism of CYP450, particularly CYP2C19,³⁸ can significantly affect drug exposure and clinical outcomes, which is important as CYP2C19 is predicted to play a major role in BI metabolism (Table IV).

Selecting the optimal BI is challenging due to *in silico* results' inability to predict competition among CYP450 isoenzymes for a given compound. Nonetheless, these results align with findings that CYP3A4 is key in producing (+)-JQ1 metabolites *in vitro*.¹⁸ Apart from its role in hepatic clearance, CYP3A4 also participates in first-pass metabolism in the gut, potentially reducing bioavailability, which could apply to the studied BIs.³⁹ The detailed metabolic profiling of the studied BIs might identify active metabolites; for example, molibresib forms two active metabolites via CYP3A4.⁴⁰ Evaluating BIs for CYP450 inhibition or induction is crucial for assessing drug-drug interactions. All BIs, except TG-164, were predicted to inhibit CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4.

Elimination of the compounds studied was evaluated through CL^{IS} , $t_{1/2}^{prob.IS}$ and $t_{1/2}^{calc.IS}$ (Table V). No correlation was found between CL^{IS} and CL_{int}^{IV} , as intrinsic clearance reflects intrinsic organ clearance independent of blood flow or binding.⁴¹ Similarly, there was no correlation between $t_{1/2}^{prob.IS}$ or $t_{1/2}^{calc.IS}$ and $t_{1/2}^{IV}$, potentially due to a non-hepatic component of clearance, such as renal elimination. These discrepancies highlight that calculated half-lives might not fully capture *in vivo* dynamics. Despite these limitations, *in silico* predictions provide a basis for designing new (+)-JQ1-derived BIs.

Based on the comparative analysis of *in silico* and *in vitro* pharmacokinetic profiles, metabolic stability appears to be the most limiting factor for many of the studied BIs. Several compounds exhibited high CL_{int}^{IV} and short $t_{1/2}^{IV}$ values (Table V), suggesting the rapid hepatic metabolism that could compromise systemic exposure and therapeutic efficacy. Notably, metabolism appears to be mediated by multiple CYP450 isoenzymes, especially CYP3A4, which is involved in both hepatic and intestinal first-pass metabolism, as well as CYP1A2, CYP2C9 and CYP2C19 (Table IV). This broad CYP450 involvement raises concerns not only about fast clearance but also about potential drug-drug interactions, especially in polypharmacy contexts like oncology. While some BIs demonstrated promising absorption and distribution profiles, their advancement into preclinical development may be hindered unless metabolic pathways are optimized through structural modifications or formulation strategies. Thus, metabolism – and the complexity of

CYP450-mediated biotransformation – is currently the most critical pharmacokinetic barrier for further development of these compounds.

Among the tested BIs, (+)-JQ1, ADMP-042, ADMP-049, TG-161-3 and MK-884 were predicted to have significantly higher CL^{IS} than birabresib, indicating rapid elimination (Table V). Other BIs, excluding TG-164, had CL^{IS} values comparable to birabresib. MK-880 and MK-885, alongside birabresib, showed moderate CL_{int}^{IV} values, making them suitable for further development. Compounds with low metabolic stability, such as ADMP-044 and TG-163, exhibited high CL_{int}^{IV} and short half-lives (3–6 min), limiting their potential for further research.⁴² Conversely, highly stable compounds like TG-160, TG-161-3 and TG-164 demonstrated relatively long *in vivo* half-lives.

Taking into account the balance of absorption, distribution, metabolism, and excretion parameters, our data suggest that MK-880 and MK-885, along with the reference compound birabresib, are the most promising candidates for further investigation. These compounds exhibited moderate CL_{int}^{IV} values (Table V), indicating acceptable metabolic stability, and had favorable plasma protein binding (Table III), adequate permeability (Tables I and II), and appropriate V_d^{IS} values (Table III). MK-885, in particular, showed a favorable balance between *in silico* and *in vitro* data, including high passive permeability (Table II), moderate $t_{1/2}^{IV}$ values (Table V) and a manageable CYP450 interaction profile (Table IV). Although CYP3A4 involvement was predicted, the overall interaction profile does not suggest an unmanageable risk of drug-drug interactions. While the compounds such as TG-160 and TG-164 demonstrated prolonged $t_{1/2}^{IV}$ (Table V), other limitations – such as high *ER* observed for TG-160 or low permeability (Table II) and high ionization (Table S-II) of TG-164 – may reduce their immediate suitability. Therefore, from a pharmacokinetic standpoint, MK-880 and MK-885 offer the most balanced profiles, supporting their prioritization in further preclinical development.

CONCLUSIONS

This study provides a comprehensive analysis of the pharmacokinetic profiles of (+)-JQ1-derived BIs, expanding on prior work. By comparing *in silico* and *in vitro* data, we evaluated the efficacy of ADMETlab 2.0 as a screening tool for these compounds. This is the first study to explore *in silico/in vitro* correlations for the pharmacokinetics of newly synthesized (+)-JQ1-derived BIs. Our findings revealed a moderate negative correlation between $HIA\ prob.^{IS}$ and PAMPA-obtained *in vivo* results (Avg. P^{IV} and R^{IV}) (Table S1), while a moderate positive correlation was observed for plasma protein binding despite statistically significant differences (Fig. S-2A). Both approaches indicated the plasma protein binding values above 90 % for most compounds (Table III). The predictions of interactions with CYP450 isoenzymes were instrumental in understanding the potential of

drug-drug interactions (Table IV). While discrepancies between CL^{IS} and CL_{int}^{IV} (Table V) were observed, these were reasonable, given the insight CL_{int}^{IV} offers into hepatic clearance. Overall, most compounds exhibited favorable pharmacokinetic characteristics, with MK-880 and MK-885 standing out alongside birabresib for their superior CL_{int}^{IV} values.

We emphasized the importance of integrating *in silico* predictions with experimental data to achieve a more complete understanding of pharmacokinetic profiles. The combination of these approaches enables researchers to validate and refine predictive models, ensuring reliable data applicable to real-world drug development. Early-stage ADME screening, as demonstrated through ADMETlab 2.0, is essential for identifying promising candidates and accelerating their progression through the drug development process. However, the discrepancies between *in silico* and *in vitro* results highlight the need for further refinement of computational predictions.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Additional data and information are available electronically at the pages of journal website: <https://www.shd-pub.org.rs/index.php/JSCS/article/view/13160>, or from the corresponding author on request.

Acknowledgements. This work was supported by the Science Fund of the Republic of Serbia through Program DIASPORA (Grant No. 6463913, acronym: DeSyHPRO) and by the Ministry of Science, Technological Development, and Innovation of the Republic of Serbia through two Grant Agreements with the University of Belgrade – Faculty of Pharmacy (Nos. 451-03-65/2024-03/200161 and 451-03-66/2024-03/200161). We extend our gratitude to ALSAC and St. Jude Children's Research Hospital for their support. Our thanks go to the patients, their families, and the staff at our institution. Special thanks to the Analytical Technologies Center at the Department of Chemical Biology & Therapeutics for generating the *in vitro* ADME data.

ИЗВОД

КОМПАРАТИВНА АНАЛИЗА ФАРМАКОКИНЕТИЧКИХ ПРОФИЛА ВЕТ ИНХИБИТОРА: УВИД ИЗ *IN SILICO* И *IN VITRO* ПОДАТАКА

МЛАДЕН КОРАВОВИЋ¹, МИЛЕНА КОВАЧЕВИЋ², МАРИЈА ЈОВАНОВИЋ², ГОРДАНА ТАСИЋ¹, ANAND MAYASUNDARI³, GISELE NISHIGUCHI³, БОЈАН МАРКОВИЋ⁴, ЗОРАН РАНКОВИЋ⁵ и ВЛАДИМИР САВИЋ¹

¹Капелла за органску хемију, Универзитет у Београду – Фармацеушки факултет, Војводе Силеје 450, 11221 Београд, ²Капелла за фармакокинетику и клиничку фармацију, Универзитет у Београду – Фармацеушки факултет, Војводе Силеје 450, 11221 Београд, ³Department of Chemical Biology and Therapeutics, St. Jude Children's Research Hospital, 262 Danny Thomas Place, Memphis, TN, 38105, USA,

⁴Капелла за фармацеушку хемију, Универзитет у Београду – Фармацеушки факултет, Војводе Силеје 450, 11221 Београд и ⁵Centre for Protein Degradation, Institute of Cancer Research, 15 Cotswold Road, Sutton, London, SM2 5NG, UK

Фармакокинетичка ограничења представљају чест узрок неуспеха у развоју лекова, што чини рану процену фармакокинетичког профила кључном за смањење финансијског ризика и усмеравање оптимизације једињења. Рачунарски алати способни да предвиђају фармакокинетичке особине представљају драгоцен ресурс за одређивање приоритета

кандидата у раним фазама откривања лекова. Ова студија пружа компаративну анализу *in silico* и *in vitro* фармакокинетичких профила ВЕТ (енг. *bromodomain and extraterminal domain*) инхибитора, са посебним освртом на шеснаест једињења изведених из (+)-JQ1 које смо претходно синтетисали. Коришћењем софтверске платформе ADMETLab 2.0, предвиђени су кључни параметри апсорпције, дистрибуције, метаболизма и екскреције (АДМЕ), који су затим упоређени са експериментално добијеним подацима. Уочена је јака корелација у вези са везивањем за плазматске протеине, док су значајна одступања примећена код вредности пермеабилности и клиренса. Анализа, такође, наглашава улогу ензима CYP3A4 као кључног фактора у метаболизму неколико ВЕТ инхибитора. Добијени резултати потврђују корисност рачунарских алата попут ADMETLab 2.0 у раној фармакокинетичкој процени, али и указују на потребу за валидацијом и додатним унапређењем предиктивних модела. Ово истраживање пружа драгоцене увиде у фармакокиетику ВЕТ инхибитора и подржава интеграцију рачунарских и експерименталних приступа у процесу откривања лекова.

(Примљено 11. децембра 2024, ревидирано 18. маја, прихваћено 15. јуна 2025)

REFERENCES

1. J. Dong, N.-N. Wang, Z.-J. Yao, L. Zhang, Y. Cheng, D. Ouyang, A.-P. Lu, D.-S. Cao, *J. Cheminformatics* **10** (2018) 29 (<http://dx.doi.org/10.1186/s13321-018-0283-x>)
2. M. Koravovic, A. Mayasundari, G. Tasic, F. Keramatnia, T. R. Stachowski, H. Cui, S. C. Chai, B. Jonchere, L. Yang, Y. Li, X. Fu, R. Hiltenbrand, L. Paul, V. Mishra, J. M. Klcó, M. F. Roussel, W. CK. Pomerantz, M. Fischer, Z. Rankovic, V. Savic, *Eur. J. Med. Chem.* **251** (2023) 115246 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115246>)
3. C. Dhalluin, J. E. Carlson, L. Zeng, C. He, A. K. Aggarwal, M.-M. Zhou, *Nature* **399** (1999) 491 (<http://dx.doi.org/10.1038/20974>)
4. S.-Y. Wu, C.-M. Chiang, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 13141 (<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R700001200>)
5. N. Zaware, M.-M. Zhou, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26** (2019) 870 (<http://dx.doi.org/10.1038/s41594-019-0309-8>)
6. P. Filippakopoulos, S. Knapp, *Nat. Rev. Drug Discov.* **13** (2014) 337 (<http://dx.doi.org/10.1038/nrd4286>)
7. M. Dawson, E. M. Stein, B. J. P. Huntly, A. Karadimitris, M. Kamdar, C. Fernandez de Larrea, M. J. Dickinson, P. S.-H. Yeh, N. Daver, A. Chaidos, M. S. Tallman, R. Jiménez, T. Horner, J. Baron, J. Brennan, G. Ferron-Brady, Y. Wu, N. Karpnich, B. Kremer, A. Dhar, G. Borthakur, *Blood* **130** (2017) 1377 (http://dx.doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.1377.1377)
8. K. Ramasamy, A. Nooka, H. Quach, M. Htut, R. Popat, M. Liedtke, S. A. Tuchman, J. Laubach, C. Gasparetto, A. Chanan-Khan, M. Hertzberg, M. deMario, E. Nueesch, E. Chesne, I. Franjkovic, K. Lechner, M. Kornacker, H. J. Cho, *Blood Cancer J.* **11** (2021) 1 (<http://dx.doi.org/10.1038/s41408-021-00545-w>)
9. V. Moreno, M. Vieito, J. M. Sepulveda, V. Galvao, T. Hernández-Guerrero, B. Doger, O. Saavedra, C. Carlo-Stella, J.-M. Michot, A. Italiano, M. Magagnoli, C. Carpio, A. Pinto, R. Sarmiento, B. Amoroso, I. Aronchik, E. Filvaroff, B. Hanna, X. Wei, Z. Nikolova, I. Braña, *Nat. Commun.* **14** (2023) 1359 (<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-36976-1>)
10. P. G. Aftimos, M. Oliveira, K. Punie, V. Boni, E. P. Hamilton, A. Gucalp, P. D. Shah, M. J. de Miguel, P. Sharma, L. Bauman, E. Campeau, S. Attwell, M. Snyder, K. Norek, E. Johnson, M. H. Silverman, S. Lakhotia, S. M. Domchek, J. K. Litton, M. E. Robson, *J. Clin. Oncol.* **40** (2022) 1023 (http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.1023)

11. M. C. Garrett, T. Carnwath, R. Albano, Y. Zhuang, C. A. Behrmann, M. Pemberton, F. Barakat, R. Lober, M. Hoeprich, A. Paravati, M. Reed, H. Spry, D. Woo, E. O'Brien, B. VanCauwenbergh, J. Perentesis, R. Nasser, M. Medvedovic, D. R. Plas, *PLOS One* **20** (2025) e0306846 (<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0306846>)
12. S. A. Piha-Paul, C. L. Hann, C. A. French, S. Cousin, I. Braña, P. A. Cassier, V. Moreno, J. S. de Bono, S. D. Harward, G. Ferron-Brady, O. Barbash, A. Wyce, Y. Wu, T. Horner, M. Annan, N. J. Parr, R. K. Prinjha, C. L. Carpenter, J. Hilton, D. S. Hong, N. B. Haas, M. C. Markowski, A. Dhar, P. J. O'Dwyer, G. I. Shapiro, *JNCI Cancer Spectros.* **4** (2020) pkz093 (<http://dx.doi.org/10.1093/jncics/pkz093>)
13. S. Wei, Y. Sun, H. Sha, *Int. Immunopharmacol.* **29** (2015) 314 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.10.036>)
14. D. Shankar, G. Merchand-Reyes, N. J. Buteyn, R. Santhanam, H. Fang, K. Kumar, X. Mo, L. P. Ganesan, W. Jarjour, J. P. Butchar, S. Tridandapani, *Int. J. Mol. Sci.* **24** (2023) 7623 (<http://dx.doi.org/10.3390/ijms24087623>)
15. S. Kaneshita, T. Kida, M. Yoshioka, K. Nishioka, M. Raje, A. Sakashita, A. Hirano, T. Sagawa, A. Kasahara, T. Inoue, K. Fujioka, H. Nagahara, M. Wada, M. Kohno, J. W. Strovel, S. Fletcher, E. Ashihara, Y. Kawahito, *Pulm. Pharmacol. Ther.* **70** (2021) 102057 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2021.102057>)
16. S. Costantino, E. Gorica, S. A. Mohammed, M. Telesca, A. Mongelli, M. Herwig, S. Ambrosini, F. Ruschitzka, N. Hamdani, F. Paneni, *Eur. Heart J.* **45** (2024) ehae666.3756 (<http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehae666.3756>)
17. P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W. B. Smith, O. Fedorov, E. M. Morse, T. Keates, T. T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M. R. McKeown, Y. Wang, A. L. Christie, N. West, M. J. Cameron, B. Schwartz, T. D. Heightman, N. La Thangue, C. A. French, O. Wiest, A. L. Kung, S. Knapp, J. E. Bradner, *Nature* **468** (2010) 1067 (<http://dx.doi.org/10.1038/nature09504>)
18. F. Li, K. R. MacKenzie, P. Jain, C. Santini, D. W. Young, M. M. Matzuk, *Biol. Reprod.* **103** (2020) 427 (<http://dx.doi.org/10.1093/biolre/iaaa043>)
19. S. Kar, J. Leszczynski, *Expert Opin. Drug Discov.* **15** (2020) 1473 (<http://dx.doi.org/10.1080/17460441.2020.1798926>)
20. G. Xiong, Z. Wu, J. Yi, L. Fu, Z. Yang, C. Hsieh, M. Yin, X. Zeng, C. Wu, A. Lu, X. Chen, T. Hou, D. Cao, *Nucleic Acids Res.* **49** (2021) W5 (<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkab255>)
21. P. Schober, C. Boer, L. A. Schwarte, *Anesth. Analg.* **126** (2018) 1763 (<http://dx.doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>)
22. ADMETLab 2.0, <https://admetmesh.scbdd.com/explanation/index> (January 31, 2024)
23. ClinicalTrials.gov, <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02296476> (January 31, 2024)
24. P. Artursson, J. Karlsson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175** (1991) 880 ([http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)91647-U](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(91)91647-U))
25. W. S. Putnam, L. Pan, K. Tsutsui, L. Takahashi, L. Z. Benet, *Pharm. Res.* **19** (2002) 27 (<http://dx.doi.org/10.1023/A:1013647114152>)
26. D. A. Volpe, *J. Pharm. Sci.* **97** (2008) 712 (<http://dx.doi.org/10.1002/jps.21010>)
27. R. Didziapetris, P. Japertas, A. Avdeef, A. Petrauskas, *J. Drug Target.* **11** (2003) 391 (<http://dx.doi.org/10.1080/10611860310001648248>)
28. J. Lewin, J.-C. Soria, A. Stathis, J.-P. Delord, S. Peters, A. Awada, P. G. Aftimos, M. Bekradda, K. Rezai, Z. Zeng, A. Hussain, S. Perez, L. L. Siu, C. Massard, *J. Clin. Oncol.* **36** (2018) 3007 (<http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2018.78.2292>)

29. R. Aggarwal, A. N. Starodub, B. D. Koh, G. Xing, A. J. Armstrong, M. A. Carducci, *Clin. Cancer Res.* **28** (2022) 3979 (<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-0175>)
30. V. Moreno, J. M. Sepulveda, M. Vieito, T. Hernández-Guerrero, B. Doger, O. Saavedra, O. Ferrero, R. Sarmiento, M. Arias, J. De Alvaro, J. Di Martino, M. Zuraek, T. Sanchez-Pérez, I. Aronchik, E. H. Filvaroff, M. Lamba, B. Hanna, Z. Nikolova, I. Braña, *Ann. Oncol.* **31** (2020) 780 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.annonc.2020.03.294>)
31. S. A. Piha-Paul, J. C. Sachdev, M. Barve, P. LoRusso, R. Szmulewitz, S. P. Patel, P. N. Lara Jr, X. Chen, B. Hu, K. J. Freise, D. Modi, A. Sood, J. E. Hutti, J. Wolff, B. H. O'Neil, *Clin. Cancer Res.* **25** (2019) 6309 (<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0578>)
32. K. Riddell, A. Patel, G. Collins, Y. Zhou, D. Schramek, B. E. Kremer, G. Ferron-Brady, *J. Clin. Pharmacol.* **61** (2021) 125 (<http://dx.doi.org/10.1002/jcph.1711>)
33. D. A. Gonzalez-Carter, Z. Y. Ong, C. M. McGilvery, I. E. Dunlop, D. T. Dexter, A. E. Porter, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **15** (2019) 1 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2018.08.011>)
34. D. A. Smith, K. Beaumont, T. S. Maurer, L. Di, *J. Med. Chem.* **58** (2015) 5691 (<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00201>)
35. John E. Hall, *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, Elsevier Health Sciences, Amsterdam, 2015 (ISBN: 9781455770052)
36. A. S. Krishnatry, A. Voelkner, A. Dhar, M. Prohn, G. Ferron-Brady, *CPT Pharmacol. Syst. Pharmacol.* **10** (2021) 709 (<http://dx.doi.org/10.1002/psp4.12639>)
37. E. Odore, F. Lokiec, E. Cvitkovic, M. Bekradda, P. Herait, F. Bourdel, C. Kahatt, E. Raffoux, A. Stathis, C. Thieblemont, B. Quesnel, D. Cunningham, M. E. Riveiro, K. Rezaï, *Clin. Pharmacokinet.* **55** (2016) 397 (<http://dx.doi.org/10.1007/s40262-015-0327-6>)
38. U. M. Zanger, M. Schwab, *Pharmacol. Ther.* **138** (2013) 103 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>)
39. M. Kato, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **23** (2008) 87 (<http://dx.doi.org/10.2133/dmpk.23.87>)
40. M. A. Dawson, G. Borthakur, B. J. P. Huntly, A. Karadimitris, A. Alegre, A. Chaidos, D. T. Vogl, D. A. Pollyea, F. E. Davies, G. J. Morgan, J. L. Glass, M. Kamdar, M.-V. Mateos, N. Tovar, P. Yeh, R. G. Delgado, F. Basheer, L. Marando, P. Gallipoli, A. Wyce, A. S. Krishnatry, O. Barbash, E. Bakirtzi, G. Ferron-Brady, N. O. Karpnich, M. T. McCabe, S. W. Foley, T. Horner, A. Dhar, B. E. Kremer, M. Dickinson, *Clin. Cancer Res.* **29** (2023) 711 (<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-1284>)
41. D. A. Smith, K. Beaumont, T. S. Maurer, L. Di, *J. Med. Chem.* **62** (2019) 2245 (<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01263>)
42. P. D. Leeson, B. Springthorpe, *Nat. Rev. Drug Discov.* **6** (2007) 881 (<http://dx.doi.org/10.1038/nrd2445>).

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

Посл.број: 5/86

Дана 13.09.2024. године

На основу Статута Универзитета у Београду, продекан Факултета је дана 13.09.2024. године, донела

ОДЛУКУ

ОДОБРАВА се КОРАВОВИЋ МЛАДЕНУ, студенту Фармацеутског факултета, индекс бр. 17/2018, продужетак рока за завршетак студија у школској 2024/2025.

Образложење

КОРАВОВИЋ МЛАДЕН, студент на студијском програму ДАС – Фармацеутска хемија, поднео је захтев број 5/86 од 13.09.2024. године продекану Факултета да му се одобри продужетак рока за завршетак студија у школској 2024/2025.

Продекан Факултета је разматрала захтев 13.09.2024.године и оценила да је захтев основан, те је донето решење као у диспозитиву.

ПРАВНА ПОУКА: Против ове одлуке именовани има право приговора декану Факултета у року од 8 (осам) дана од дана пријема истог.

Одлуку доставити: Именованој-ом, декану и Одсеку за наставу и студентска питања.

27. 09. 2024

Младен Коравовић

ПРОДЕКАН ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ
НАСТАВУ
И КОНТИНУИРАНУ ЕДУКАЦИЈУ



[Signature]
Проф. др Сандра Везмар Ковачевић

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

Посл.број: 3/108

Дана 04.11.2025. године

На основу Статута Универзитета у Београду, продекан за последипломску наставу и континуирану едукацију Факултета је дана 04.11.2025. године, донела

ОДЛУКУ

ОДОБРАВА се **МЛАДЕНУ КОРАВОВИЋУ**, студенту Фармацеутског факултета, индекс бр. 17/2018, **продужетак рока за завршетак студија у школској 2025/2026 години.**

Образложење

МЛАДЕН КОРАВОВИЋ, студент на студијском програму ДАС – Фармацеутска хемија, поднео је захтев заведен под пословним бројем 3/108 од 04.11.2025. године продекану за последипломску наставу и континуирану едукацију Факултета да му се одобри **продужетак рока за завршетак студија у школској 2025/2026 години.**

Продекан а последипломску наставу и континуирану едукацију Факултета је разматрала захтев 04.11.2025.године и оценила да је захтев основан, те је донето решење као у диспозитиву.

ПРАВНА ПОУКА: Против ове одлуке именовани има право приговора декану Факултета у року од 8 (осам) дана од дана пријема истог.

Одлуку доставити: студенту, Одсеку за наставу и студентска питања.

ПРОДЕКАН ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ
НАСТАВУ
И КОНТИНУИРАНУ ЕДУКАЦИЈУ




Проф. др Душанка Крајновић