

## Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Остринської Ольги Василівни

**"Розробка низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2",**  
представленої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Дисертаційна робота Остринської О.В. присвячена пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук, біохімічних тестів *in vitro*, а також оптимізації структур сполук-лідерів методами раціонального молекулярного дизайну. Зокрема, метою роботи був раціональний дизайн нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2 людини та дослідження особливостей їх взаємодії з амінокислотними залишками АТФ-зв'язувального сайту мішені.

Розробка інгібіторів протеїнкіназ є важливим напрямом сучасної біотехнології та біомедичної хімії. Ефективні та специфічні інгібітори протеїнкіназ є важливим інструментом вивчення ролі ферментів у мережі сигнальних каскадів клітини, який відкриває нові перспективи в галузі розробки нових фармацевтичних препаратів.

Без сумніву, серед відомих молекулярних мішеней СК2 займає особливе місце. Протеїнкіназа СК2 приймає участь в регуляції таких життєво важливих процесів, як транскрипція, трансляція, контроль клітинного циклу, проліферація, виживання клітин та апоптоз. СК2 є одним із ключових компонентів сигналіngu клітини, і наразі відомо більш ніж 400 субстратів цього ензиму. Зміна рівня експресії або активності цієї протеїнкінази є причиною низки нейродегенеративних патологій, запальних процесів, серцево-судинних хвороб, онкологічних захворювань тощо. Також відомо, що зміна рівня експресії СК2 спостерігається під час вірусних і паразитарних інфекцій.

У ряді випадків ми можемо впливати на активність протеїнкіназ, інгібуючи їх активність шляхом зв'язування зі специфічними лігандами. У зв'язку з цим не дивно, що розпочатий декілька десятиріч тому пошук інгібіторів СК2 актуальний як ніколи, і, згідно із даними літератури, кількість

досліджень, присвячених цілеспрямованій розробці та пошуку подібних речовин, стрімко зростає. Ефективні інгібітори СК2 було знайдено серед похідних бензімідазолу й бензотриазолу, антрахінону, флуоренону, кумарину, флавоноїду, дибензофурандіолу тощо. Деякі з цих сполук вже використовуються як інструмент дослідження та доказу функцій СК2 в клітині.

Підвищений інтерес саме до цієї молекулярної мішені нерозривно пов'язаний з першими позитивними результатами клінічних випробувань. Особливо слід зазначити "Silmitasertib" (CX-4945) - сполуку яка зараз знаходиться на другій стадії клінічних досліджень як перспективний протипухлинний препарат. Тому пошук і розробка нових інгібіторів СК2 є дуже актуальними і підтверджують необхідність і своєчасність дисертаційних досліджень Остринської О.В.

**Зв'язок з науковими програмами, планами, темами.** Робота відповідає основному плану фундаментальних досліджень, які проводяться у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, і виконувалась в рамках декількох бюджетних (№0107U003345; №0112U004110) та конкурсної (0107U004939) тематик.

**Наукова новизна дослідження та одержаних результатів, ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Дисертаційна робота Остринської О.В. була виконана на сучасному науковому та методичному рівні і ґрунтується на значному матеріалі оригінальних експериментальних та теоретичних досліджень. Усі експерименти були виконані автором особисто або за її безпосередньою участю. За допомогою методів структурної біоінформатики і біохімічного аналізу здобувачем було розроблено і досліджено нові перспективні інгібітори СК2. Загалом, під час дослідження, було проаналізовано комбінаторну бібліотеку, що нараховує 150000 різноманітних низькомолекулярних органічних сполук, і відібрано нові потенційні інгібітори СК2 - речовини що належать до п'яти класів: 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолів, 4'-гідроксифлавонів, 4'-

карбоксіфлавонолів, (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтію)карбонових кислот і (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонових кислот. Для представників двох з п'яти досліджених класів здатність інгібувати СК2 була доведена вперше.

Відібрані сполуки унікальні і ніколи раніше не використовувалися у якості інгібіторів протеїнкіназ. Інгібіторні властивості нових сполук було підтверджено результатами біохімічного аналізу і, зокрема, результатами люциферазної реакції, показником  $IC_{50}$  і константою інгібування ( $K_i$ ). Селективну дію інгібіторів стосовно саме СК2 було перевірено із використанням панелі з чотирьох серин-трионінових (ASK1, JNK3, Aurora A та Rock1) і трьох тирозинових протеїнкіназ (FGFR1, c-Met I Tie2).

Для одержаних інгібіторів, здобувачем вперше було запропоновано моделі ліганд-білкової взаємодії завдяки зв'язуванню саме з АТФ-акцепторним сайтом ензиму, що дозволяє віднести відібрані сполуки до інгібіторів АТФ-конкурентного типу дії. Також автором було встановлено ключові механізми міжмолекулярної взаємодії, які відповідають за зв'язування лігандів з АТФ-акцепторним сайтом СК2. Останнє дозволило автору встановити зв'язок між хімічною структурою сполук та їх інгібувальною активністю.

Особливу увагу заслуговують результати, отримані стосовно здатності сполук-лідерів до ізоформно-специфічного інгібування каталітичних субодиноць СК2 $\alpha$  та СК2 $\alpha'$  холоензиму СК2. Так, за результатами експериментів на власно отриманих рекомбінантних каталітичних субодиноцях холоензиму було відібрано ізоформно-специфічний інгібітор - сполуку FLC26, що здатна пригнічувати активність СК2 $\alpha'$  у 6,7 разів ефективніше, ніж СК2 $\alpha$ .

Слід зазначити цілісність і безсумнівну обґрунтованість наукових положень, висновків і рекомендацій сформульованих у дисертації. Гарне і грамотне поєднання методів дослідження *in silico* та *in vitro* дозволило здобувачу не лише відібрати нові ефективні інгібітори СК2, але й зробити цілком обґрунтовані висновки що до молекулярних механізмів та особливостей структури, що обумовлюють рівень спорідненості ліганду до цільового саєту зв'язування. Рекомендації стосовно ролі та положення замісників, а також

використаний алгоритм молекулярного скринінгу, безсумнівно знайдуть подальше використання під час хімічної оптимізації опорних структур з метою покращення властивостей вже існуючих інгібіторів.

### **Практичне значення одержаних результатів.**

У результаті виконання дисертаційної роботи було розроблено й охарактеризовано нові низькомолекулярні інгібітори протеїнкінази СК2 людини серед п'яти класів хімічних сполук: 3,4,5,6-тетрагідротіопірано[2,3-d]тіазолів, 4'-гідроксифлавонів, 4'-карбоксифлавонолів, (тієно[2,3-d]піримідин-4-ілтіо)карбонових кислот і (тієно[2,3-d]піримідин-4-іламіно)карбонових кислот. Отримані сполуки можуть бути використані для вивчення особливостей функціонування ензиму в мережі сигнальних шляхів клітини, а також для з'ясування ролі СК2 в біологічних процесах.

Хімічні структури розроблених інгібіторів можуть бути використані як основа для розробки терапевтичних засобів проти онкологічних захворювань, нейродегенеративних патологій, запальних процесів, серцево-судинних хвороб, вірусних та паразитарних інфекцій. Запропоновані моделі взаємодії сполук з АТФ-зв'язувальним сайтом СК2 є основою для пошуку й розробки нових ефективних та специфічних інгібіторів цієї кінази.

### **Особистий внесок здобувача**

Викладені в дисертації результати було отримано автором особисто або за безпосередньої її участі.

### **Повнота викладу результатів у наукових публікаціях.**

За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах та 8 тез доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій. Також, за результатами роботи отримано 1 деклараційний патент на корисну модель.

### **Структура дисертації**

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, які викладено в 4 розділах, аналізу та узагальнення результатів роботи, висновків та списку використаних джерел,

який нараховує 205 посилань. Дисертація містить 33 рисунки і 16 таблиць. Загальний обсяг дисертації становить 149 сторінок.

У роботі чітко сформульовано мету і завдання дослідження. Матеріали і методи дослідження відповідають сучасному світовому рівню і цілком відповідають завданням дослідження. Висновки цілком відповідають поставленій меті і завданням дисертаційного дослідження.

### **Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації.**

Опонент не має принципових зауважень до роботи. Декілька запитань для дискусії та зауважень технічного характеру наведено нижче:

1. На сторінці 6: "Зміна рівня експресії або активності цієї кінази спричинює розвиток низки нейродегенеративних патологій, запальних процесів, серцево-судинних хвороб, вірусних і паразитарних інфекцій (Guegga et al., 2008), онкологічних захворювань (Tawfic et al., 2001) та ін."

Вважаю, що зміна у рівні експресії СК2 не може бути причиною вірусних або паразитарних інфекцій. Скоріше це наслідок.

2. Для моделювання молекулярної динаміки автором було використано дуже стару версію Gromacs 3.0. Це найбільш застаріла із версій, що наразі доступні на офіційному сайті Gromacs. Не зовсім зрозуміло використання саме такого застарілого програмного забезпечення.

3. У випадку інгібіторів протеїнкіназ питання селективності дії мабуть превалює над константою інгібування. У представленому дослідженні контрольна група була обмежена вісьмома протеїн-кіназами. З тексту дисертації незрозуміло, чим було обумовлено таке спрощення тестової системи і чи було хомогеномне обґрунтування такого скорочення.

4. Взаємодія ліганду з білком ще не є гарантією того, що сполука здатна проникнути у клітину. Нажаль, в дисертації відсутнє теоретичне або експериментальне опрацювання даного питання.

5. Аналогічне питання виникає стосовно можливої цитотоксичності представлених сполук. Не зрозуміло, чи проводилась автором принаймні теоретична оцінка речовин за ознаками токсичності? Або, можливо, подібний

відбір здійснювався ще під час підготовки вихідної бібліотеки лігандів?

Проте, вважаю, що вищевказані зауваження носять скоріше дискусійний і рекомендаційний характер і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

### **Висновок:**

Враховуючи все вищесказане, вважаю, що дисертаційна робота Остринської О.В. «Розробка низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази СК2» представляє собою завершену наукову працю, присвячену важливій науковій і практичній проблемі. За структурою, актуальністю задач, теоретичним та методичним рівнем, новизною, фундаментальним та практичним значенням отриманих результатів дисертаційна робота цілком відповідає вимогам ДАК України до кандидатських дисертацій, а її автор - Остринська Ольга Василівна, без жодного сумніву заслуговує на присудження наукового ступеня - кандидат біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія.

### **Офіційний опонент,**

Завідувач лабораторії біоінформатики та структурної біології,  
Відділу геноміки та молекулярної біотехнології,  
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки  
Національної академії наук України»  
кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник

Карпов П.А.

Підпис зав. лабораторії біоінформатики та структурної біології,  
к.б.н., с.н.с. Карпова П.А.  
ЗАСВІДЧУЮ

### **Вчений секретар**

ДУ «Інститут харчової біотехнології  
та геноміки НАН України»,  
к.б.н.



Пірко Я.В.