

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Старосили Сергія Анатолійовича «Розробка фармакофорних моделей та інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і CK2», представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Актуальність проблеми. Підвищена активність протеїнкіназ ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), CK2 (Casein kinase 2) та FGFR1 (Epidermal growth factor receptor 1) спостерігається при низці хвороб людини. Так підвищена активність ASK1 асоційована з рядом нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера та аміотропний латеральний склероз, серцево-судинних хворобах та різних видах раку. Підвищена активність FGFR1 спостерігається при раку легень, мезотеліомі, плоскоклітинній карциномі язика, синоназальному раку, раку шлунка, простати, крові, підшлункової залози, колоректального раку, карциноми нирок і інших захворюваннях. Надекспресія CK2 пов'язана з виникненням різних видів раку людини, зокрема, раку легень, молочних залоз, нирок, голови та шиї, простати, мієломи, гострої мієлоїдної лейкемії, Т-клітинної гострої лімфобластичної лейкемії та В-клітинної хронічної лімфоцитної лейкемії. Порушення регуляції активності CK2 також пов'язане також із виникненням запальних хвороб, болі і вірусних інфекцій.

Існуючі зараз інгібітори протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і CK2 мають недоліки, зокрема низьку структурну різноманітність та недостатню селективність. Зважаючи на потенційне терапевтичне значення інгібіторів вищезазначених кіназ, розробка низькомолекулярних інгібіторів цих ензимів є важливим завданням.

Сучасні методологічні підходи до дизайну як фармакологічних препаратів, так і інших біологічно активних речовин, мають обов'язковою складовою застосування методів обчислювальної біології та хімії.

Використання цих обчислювальних методів, по-перше, дає змогу значно прискорити процедуру розробки нових біологічно-активних речовин, зокрема, нових ліків, а по-друге, дозволяє суттєво зменшити об'єм відповідних матеріальних витрат на розробку.

Потужним методом пошуку біологічно активних речовин являється фармакофорне моделювання. Для ASK1 та CK2 ще не запропоновано фармакофорних моделей інгібіторів цих протеїнкіназ. Для FGFR1 розроблено фармакофорну модель інгібіторів, але сполуки, знайдені скринінгом відносно неї, погано інгібували цю кіназу. Таким чином, на сьогодні розробка фармакофорних моделей інгібіторів цих протеїнкіназ є актуальним завданням.

Дисертаційна робота Старосили Сергія Анатолійовича, присвячена розробці фармакофорних моделей та низькомолекулярних інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і CK2, є прикладом якісного сучасного підходу до дизайну нових біологічно-активних сполук, фундаментом якого є застосування обчислювальних та експериментальних методів. За тематикою досліджень робота знаходиться в на передових позиціях сучасної молекулярної біології, і її актуальність не підлягає жодному сумніву.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконувалася в рамках бюджетних тем відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Мішень-орієнтований пошук новітніх протимікробних, противірусних і протипухлинних засобів» (номер державної реєстрації – 0112U000254, 2012–2016 рр.) та «Раціональний дизайн інгібіторів протеїнкіназ як попередників лікарських засобів» (номер державної реєстрації 0112U004110, 2013–2017 рр.).

Основні результати, отримані дисертантом, їх наукова новизна та практичне значення.

Автором побудовано ліганд-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів протеїнкінази ASK1 людини та рецепторно-орієнтовані

фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкіназ CK2 і FGFR1 людини. Варто відзначити, що для ASK1 та CK2 фармакофорні моделі побудовані вперше. Всі розроблені моделі ретельно валідовані: для ASK1 – *in silico*, для CK2 і FGFR1 – експериментально. Ці моделі можуть застосовуватися для знаходження нових інгібіторів вищезазначених ензимів. Про це свідчать вже знайдені дисертантом нові інгібітори кіназ CK2 і FGFR1 за допомогою фармакофорного скринінгу відносно відповідних фармакофорних моделей.

Крім інгібіторів знайдених із застосуванням фармакофорного моделювання, Старосила С.А. знайшов низку інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і CK2 за допомогою напівгнучкого молекулярного докінгу.

Загалом автором знайдено й охарактеризовано 6 нових класів низькомолекулярних інгібіторів. Для ASK1 – 1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідропірол-2-они, найбільш активна сполука якого мала $IC_{50} = 520$ нМ. Для CK2 – 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-они (всі похідні класу мали інгібувальні активності в наномолярному діапазоні, найактивніша сполука мала значення $IC_{50} = 150$ нМ) та тетразоло[1,5-с]хіназоліни. Для FGFR1 – 3-(1-бензил-1H-індол-3-іл)-2-ціаноакрилові кислоти, [(фенілметиліден)аміно]тіосечовини, піридин-3-карбонітрили. Інгібітори FGFR1 мали IC_{50} в діапазоні від 1,4 до 16 μ М. Знайдені нові інгібітори ASK1, FGFR1 і CK2 можуть використовуватися для з'ясування функцій цих кіназ на рівні мережі сигнальних шляхів клітини. Також вони можуть стати основою для розробки фармацевтичних препаратів для терапії низки захворювань, пов'язаних із порушеннями функціонування цих протеїнкіназ.

Під час застосування фармакофорного моделювання дисертантом було виділено кілька його недоліків і для їх подолання розроблено цілком оригінальний алгоритм оптимізації фармакофорних моделей і рескорингу результатів фармакофорного скринінгу. Автор поєднує оптимізацію радіусів фармакофорних точок моделі і використання концепції ваг фармакофорних точок і молекулярних дескрипторів. Ваги вказують на ступінь важливості

конкретних точок моделі, а застосування дескрипторів – це підхід QSAR. Розроблений алгоритм дає змогу покращувати якісні характеристики фармакофорних моделей і, відповідно, знаходити більше активних сполук при фармакофорному скринінгу. Алгоритм реалізований у розробленій автором програмі «PharmDeveloper».

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій сформульованих у дисертації.

Дисертація написана за класичною схемою. Вона включає в себе 8 розділів. В огляді літератури докладно проаналізовано питання, що стосуються фармакофорного моделювання інгібіторів. Потрібно підкреслити, що англійська версія огляду опублікована в міжнародному журналі, що говорить про ґрунтовний підхід дисертанта до проблеми. В розділі «Матеріали і методи дослідження» описано широкий спектр сучасних обчислювальних методів дизайну біологічно активних сполук, що використовувалися в дисертаційній роботі та метод визначення інгібувальної активності сполук за допомогою АТФ, міченого ізотопом фосфору ^{32}P , що на сьогоднішній день є самим точним. Наступні 5 розділів власне описують експериментальні дані, а у останньому восьмому розділі зроблено коротке узагальнення результатів.

Автором уперше побудовано ліганд-орієнтовану фармакофорну модель інгібіторів ASK1 і валідовано її *in silico* – скринінг відносно цієї моделі дозволив успішно знайти низку відомих інгібіторів серед бібліотеки, що налічувала більше 100000 сполук. Ця модель узагальнює в собі кілька типів взаємодії різних класів інгібіторів з ASK1 і може бути застосована для пошуку нових інгібіторів ASK1. Для протеїнкінази CK2 теж вперше побудовано фармакофорну модель. Це – рецепторно-орієнтована модель. Вона валідована експериментально – скринінг відносно неї дозволив знайти новий клас інгібіторів з високими активностями – 2-(феніламіно)-5-(фенілметиліден)-4,5-дигідро-1,3-тіазол-4-они. Найактивніша сполука мала $\text{IC}_{50} = 150 \text{ nM}$. Для FGFR1 також побудовано рецепторно-орієнтовану

фармакофорну модель інгібіторів та експериментально її валідовано – знайдені два нових класи інгібіторів: 3-(1-бензил-1H-індол-3-іл)-2-ціаноакрилові кислоти та [(фенілметиліден)аміно]тіосечовини, що мали значення IC_{50} від 1,4 до 16 μ M.

Слід зазначити, що фармакофорне моделювання має певні недоліки. Фармакофорні моделі, навіть після валідації, можуть давати багато фальспозитивних і фальснегативних результатів. Причиною тому є власне простота фармакофорів. Це, як правило, набір кількох фармакофорних точок. І навіть якщо цей набір сформовано ідеально, він може бути не селективним до дуже подібних сполук одного хімічного класу. Біохімічні тести часто показують, що не суттєва зміна в структурі сполуки може погіршувати її активність на кілька порядків, а в цей же час фармакофорна модель може оцінювати такі сполуки однаково і навіть переоцінювати гірший ліганд. Для подолання таких явищ автором було розроблено алгоритм оптимізації фармакофорних моделей. Застосування алгоритму дозволяє суттєво поліпшити точність фармакофорних моделей за рахунок використання вагів фармакофорних точок та молекулярних дескрипторів.

Як відомо, фармакофорні моделі потребують валідації. *In silico* моделі валідуються на вибірці відомих активних та неактивних сполук до відповідної молекулярної мішені. В роботі визначено три критерії якості фармакофорних моделей: кількість активних сполук знайдених при скринінгу валідаційної вибірки, кількість правильно визначених активних сполук і відношення кількості активних до загальної кількості сполук, вибраних моделлю. Алгоритм оптимізації дозволяє суттєво покращити такі показники якості фармакофорних моделей. Варто відзначити, що дисертант власноруч розробив математичний апарат алгоритму та написав програмний код програми. Програма захищена авторським правом.

Також дисертант застосував напівгнучкий молекулярний докінг для пошуку інгібіторів ASK1, FGFR1 і CK2. В результаті розроблено й охарактеризовано по одному новому класу інгібіторів цих кіназ: для ASK1 –

1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідропірол-2-они, найактивніша сполука яких мала значення $IC_{50} = 520$ нМ, для СК2 – тетразоло[1,5-с]хіназоліни, для FGFR1 – піридин-3-карбонітрили з мікромолярними інгібувальними активностями.

Потрібно відмітити те, що всі біохімічні експерименти на ряду з обчислювальними, виконані дисертантом власноруч.

Викладені міркування є основою для твердження, що положення, висновки і рекомендації, винесені на захист, є обґрунтованими і достовірними. Основні положення і результати проведених досліджень сформульовані у 7 висновках, що логічно витікають з отриманих здобувачем даних.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях. Результати досліджень, представлені в дисертаційній роботі, достатньо повно викладені в опублікованих роботах. За темою дисертації опубліковано 13 наукових праць, із них – 8 статей у фахових журналах, 1 свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір і 4 тез наукових доповідей.

Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації. Представлена до захисту дисертаційна робота є оригінальним науковим дослідженням, проте у опонента є певні побажання до автора.

В практичному значенні роботи зазначено, що «знайдені нові інгібітори протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і СК2 можуть використовуватися для з'ясування функцій цих кіназ на рівні мережі сигнальних шляхів клітини», проте, жодних даних щодо токсичності розроблених інгібіторів по відношенню до клітин в роботі не наведено, а отже, не можна прогнозувати, наскільки ефективними інструментами досліджень будуть знайдені інгібітори.

В роботі сказано, що «атом Брому утворює галогеновий зв'язок із Val116», проте така взаємодія моделюється водневим зв'язком. Чи коректна ця заміна, оскільки для галогенових зв'язків є певні особливості, наприклад,

анізотропія середньостатистичних значень відстані між атомами галогену та всіх його нековалентних партнерів.

Чому фармакофорну модель кінази СК2 доповнили виключеними об'ємами, а моделі інших кіназ – ні?

В роботі є певні не дуже точні формулювання, наприклад, «очищені рекомбінантні протеїни каталітичних доменів». Краще «очищені рекомбінантні протеїни, що є аналогами каталітичних доменів».

Крім того, в авторефераті дисертації дуже багато специфічної біоінформатичної термінології (чи навіть «сленгу»), яка або не розшифровується при першому згадуванні, або взагалі використовується як загальноприйнята, наприклад: «сполука-хіт», «лідерні сполуки», «навчальна вибірка інгібіторів», «молекулярний дескриптор», «фінгерпринти сполук», «фармакофорне представлення», «скор», «рескоринг», «дескриптор» тощо. Проте, людині не знайомій з цією термінологією, важко з першого разу зрозуміти, що означають ці терміни.

Водночас слід зазначити, що наведені зауваження в основному стосуються оформлення і ні в якій мірі не знижують наукової цінності дисертації. Робота написана гарним літературним стилем і легко читається. Основний зміст автореферату повністю відповідає основним положенням дисертації.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Старосили Сергія Анатолійовича присвячена розробці фармакофорних моделей та інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і СК2, є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, глибиною розкриття поставлених проблем, логічністю і обґрунтованістю висновків дисертація повністю відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету

Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
заступник директора з наукової роботи
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України

Д.В. Колибо

Підпис *Д. В. Колиби*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
"14" 02 2017 р. *В*

