

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук Ильина Ивана Сергеевича
на тему: «Поиск новых ингибиторов для заданных белков-мишеней
методами молекулярного моделирования»
по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия»

Актуальность избранной темы

В настоящее время наметилась тенденция сокращения темпов появления новых лекарственных средств, несмотря на увеличение финансирования крупными фармацевтическими компаниями отделов разработки и исследований. Во многом это связано с тем, что основной стратегией разработки биологически активных соединений до сих пор остается экспериментальный перебор *in vitro* большого числа соединений-кандидатов. Использование виртуального скрининга, базирующегося на моделировании взаимодействия потенциального ингибитора с соответствующими мишенями, может существенно облегчить процесс разработки лекарственного средства за счет снижения потенциальных расходов, связанных с экспериментальным тестированием. В контексте начальной разработки лекарственного средства работа посвящена поиску ингибиторов фактора Ха, β -лактамазы TEM-1 и антагонистов перехода белка YB-1 в ядро. Актуальность работы очевидна и заключается в том, что идентификация данных биологически активных соединений будет способствовать появлению новых средств для терапии тромботических состояний, инфекций, вызванных устойчивыми штаммами бактерий, а также опухолевых заболеваний. Работа также актуальна с точки зрения оценки предложенного метода постпроцессинга результатов докинга, основанного на применении методов квантовой химии и использованного для

прогнозирования активности в отношении избранных терапевтических белков-мишеней.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Сформулированные в рамках данной работы научные положения, выводы и рекомендации обоснованы, и это подтверждается тем фактом, что использованная методология исследования опирается на апробированные методы вычислительной химии. Экспериментальная часть исследования также базируется на проверенных методиках. Публикация основных положений диссертации в рецензируемых научных журналах высокого уровня, а также их обсуждение на международных и всероссийских научных конференциях подкрепляет обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций.

Достоверность научных положений, результатов, выводов и рекомендаций

Корректное применение методов вычислительной химии подтверждает достоверность научных положений, результатов, выводов и рекомендаций. Созданные в ходе исследования модели белковых молекул были построены на основе полученных экспериментально структурных данных, содержащихся в Protein Data Bank. Достоверность результатов молекулярного моделирования проверена экспериментально для двух из трех изучаемых белков-мишеней. Проверка активности выполнялась высококвалифицированными специалистами-экспериментаторами. Для двух ингибиторов фактора Ха, предсказанных с помощью моделирования, продемонстрирован селективный характер действия, а также конкурентный механизм ингибирования данного белка-мишени. Предсказанные антагонисты перехода белка YB-1 в ядро продемонстрировали способность ингибировать данный процесс, а также подавлять жизнеспособность

опухолевых клеток. Предсказанные в настоящей работе аллостерические ингибиторы β -лактамазы TEM-1 дополнительно исследованы методом молекулярной динамики.

Новизна научных положений и выводов

Представленные положения и выводы представляются мне новыми, так как для виртуального скрининга и предсказания активности соединений сравнительно редко используются методы квантовой химии. Новизна исследования также проявляется в том, что идентифицированные и подтвержденные ингибиторы фактора Ха и белка YB-1 принадлежат к новым химическим классам, для которых впервые показана способность влиять на активность этих белков-мишеней. Что касается разработанной в ходе данного исследования теоретической модели связывания аллостерических ингибиторов β -лактамазы, то в научной литературе нет примеров подобной модели.

Содержание диссертации

Диссертация Ильина И.С. состоит из введения, шести глав, заключения, списка публикаций автора по теме диссертации и списка цитированной литературы из 83 наименований. Во введении обосновывается актуальность работы, обсуждаются цели и задачи исследования, степень разработанности избранной темы, новизна, положения, выносимые на защиту, значимость работы, а также личный вклад диссертанта. Выносимые на защиту положения сформулированы правильным образом и подтверждены соответствующими публикациями. Глава 1 посвящена общему понятию мишени лекарственного средства и описанию биохимических аспектов трех белков-мишеней, выбранных для поиска ингибиторов. Кроме того, представлена информация об известных ингибиторах этих белков, однако без полного перечисления всех химических классов. Для целостного восприятия разработки, обсуждение аспектов ингибирования, возможно,

стоило бы перенести в соответствующие главы, посвященные поиску ингибиторов. Глава 2 содержит изложение существующих методов виртуального скрининга. Несмотря на то, что методология исследования базируется на структурно-ориентированном скрининге, для полноты изложения стоило бы привести более содержательное описание и лиганд-ориентированных методов. Приведено хорошее описание структурно-ориентированного скрининга с обсуждением большинства аспектов, касающихся данной методологии, в том числе аспекта подготовки библиотек химических соединений. Пункт, описывающий комбинированный скрининг, содержит распространенные примеры данного метода, но не охватывает некоторые современные разновидности постпроцессинга. Глава 3 полностью посвящена молекулярному докингу и программе докинга SOL, которая использовалась в данной работе. Рассмотрены алгоритмы конформационного поиска и существующие скоринг-функции. Справедливо отмечены слабые стороны применения метода докинга как инструмента виртуального скрининга потенциальных лекарственных веществ. В Главе 4 дается изложение процедуры поиска ингибиторов фактора Ха с помощью комбинированного метода скрининга, включающего применение методов квантовой химии на этапе постпроцессинга. Очевидно, что была выполнена довольно тщательная работа по построению модели фактора Ха и валидации этой модели. С помощью скрининга и методов квантовой химии отобрано 20 соединений, экспериментальная проверка которых выявила активность для 7 веществ в микромолярном диапазоне. Дополнительные процедуры моделирования позволили предсказать активность еще для 20 ингибиторов, из которых активность экспериментально подтвердилась для пяти веществ. Приведены расчетные характеристики отобранных кандидатов в ингибиторы. При этом некоторые величины, которые, например, могли бы описать полноту конформационного поиска на основе генетического алгоритма, не были указаны. Возможно, было бы уместно обсудить причины, которые могли бы повлиять на точность предсказания активности и объяснить,

почему не для всех кандидатов активность подтвердилась *in vitro*. Глава 5 посвящена поиску аллостерических ингибиторов белка TEM-1, причем приводится оригинальная теоретическая модель ингибирования, подразумевающая воздействие на Ω -петлю белка. Как правило, место связывания лекарственного вещества на белке-мишени определяется экспериментально при помощи рентгеноструктурного анализа. В данной работе предложена модель связывания ингибитора на поверхности лактамазы TEM-1, которая не подтверждена экспериментально и требует дальнейшего изучения. В Главе 6 описано применение комбинированного скрининга для идентификации новых антагонистов белка YB-1. Подтверждённые в двух экспериментах (на клеточных культурах и системе *in vitro*) антагонисты принадлежат к новому химическому классу и могут быть использованы для дальнейшей оптимизации после того, как для них будет подтверждено место связывания. В Заключение подводятся итоги проделанной работы, приводятся результаты и выводы, которые соответствуют поставленным задачам исследования. Всего представлено 6 пунктов выводов. Заключительный вывод о том, что все три группы найденных ингибиторов представляют практический интерес для дальнейшей разработки лекарственных средств, воздействующих на представленные белки-мишени, считаю полностью обоснованным.

Основные результаты исследования опубликованы диссертантом в десяти работах в периодических научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI. Результаты и выводы в достаточной мере апробированы в докладах на пяти научных конференциях.

Выполненная работа актуальна, её результаты имеют явное практическое значение. Общая оценка диссертационной работы положительная, однако, в процессе изучения данной работы у меня возникли следующие вопросы и замечания.

1. В пункте 4.4 приводится оценка выбранного метода постпроцессинга на способность протокола моделирования

предсказывать ингибиторы фактора Ха. При этом, в качестве тестовой выборки использованы только те соединений, которые были испытаны в рамках исследования и которые, как оказалось, отличаются невысокой активностью в отношении фактора Ха. Почему не использовались какие-либо другие известные ингибиторы фактора Ха, в том числе более активные в отношении данной мишени? Тем более, что известно достаточно много биологически активных соединений данного класса.

2. Одним из аспектов дизайна лекарств является использование определенных дескрипторов или эмпирических правил (например, правила Липински), позволяющих судить о пригодности найденных молекул в качестве лекарственных средств. Однако в работе нет упоминания об их применение для предварительной фильтрации молекул перед скринингом. Они, действительно, не использовались или это просто не описано?
3. В качестве величины ингибирующей активности приводятся значения IC_{50} . Мне кажется, было бы более информативно представить эту информацию в виде значений свободной энергии образования комплекса белок-лиганд или константы диссоциации этого комплекса. Это облегчило бы сопоставление предсказанных в ходе докинга значений энергии связывания с величинами, полученными экспериментально.
4. В работе имеются многочисленные стилистические несовершенства. Так, например, во введении, на странице 5 в одном предложении троекратно употребляется выражение «за счет». На странице 7 в одном предложении дважды употребляется слово «определенный». На странице 11 – неудачное и грамматически несогласованное выражение «молекулы-«хиты», пропущенных первичным запуском HTS». На

странице 20 находим выражение «Фактор Ха является витамин К-зависимой сериной эндопептидазой». И так далее ...

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.08 – «Биоинженерия» (по физико-математическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ильин Иван Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия».

Официальный оппонент:

кандидат физико-математических наук,
старший научный сотрудник лаборатории гетерогенного катализа
Федеральный исследовательский центр химической физики им.
Н.Н.Семенова Российской академии наук

РОМАНОВ Алексей Николаевич

03.11.2020