

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

Диссертация Ильина И.С. посвящена рациональному поиску низкомолекулярных ингибиторов для трех терапевтических белков. Для прогноза активности молекул используется подход, сочетающий два уровня теории вычислительной химии – молекулярную механику и квантовую химию с учетом электронного строения системы. Разработка новых подходов для прогнозирования активности малых молекул является очень важной задачей для этой области науки. С этой точки зрения представленная диссертационная работа является актуальной, так как автор ищет ингибиторы для терапевтически важных мишеней. Были выбраны: фактор свертывания крови Ха, бета-лактамаза ТЕМ-1 и транскрипционный фактор YB-1. Ингибирование фактора Ха является подтвержденной стратегией для лечений форм тромбоза. Ингибиторы ферментов с бета-лактамазной активностью являются агентами борьбы с устойчивостью бактерий к антибиотикам. Подавление активности белка YB-1 может быть стратегией противоопухолевой терапии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Обоснованность сформулированных в рамках диссертационного исследования научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается использованием известных и валидированных методов вычислительной химии. Результаты получены с использованием точных молекулярных моделей белков, которые были построены на основе качественных рентгеноструктурных данных, и трехмерных моделей малых молекул, подготовленных на основе общепринятых алгоритмов. Обоснованность экспериментальных выводов следует из применения стандартизированных методик и правильного планирования эксперимента.

Достоверность научных положений, результатов, выводов и рекомендаций

Достоверность результатов и выводов по экспериментальной части соотносится с высоким профессиональным уровнем ученых-экспериментаторов, выполнявших проверку предсказаний. Достоверность положений, результатов и выводов теоретической части, то лучшим показателем качества моделирования является экспериментальное подтверждение. В данном исследовании, используя результаты моделирования, для двух из трех мишеней удалось на первой итерации обнаружить активные малые молекулы. Конкурентный механизм действия для одного из лучших найденных ингибиторов фактора Ха подтвержден экспериментально, что позволяет предполагать его прямое влияние на активный центр, что и предполагалось в

моделировании. Общая точность предсказания для данной мишени составила почти 70%. Для оценки достоверности предложенной модели аллостерического ингибирования бета-лактамазы TEM-1 требуются дополнительные исследования.

Новизна

Диссертационное исследование характеризуется явной новизной. Во-первых, найденные ингибиторы фактора Ха и антагонисты белка YB-1 принадлежат к новым химическим классам. Во-вторых, разработанный подход на основе комбинации метода докинга и квантовой химии впервые применен для поиска ингибиторов выбранных белков. Наконец, публикация основных результатов диссертационной работы в ведущих научных журналах также подтверждают новизну научных положений и выводов.

Теоретическая и практическая значимость диссертации.

Теоретическая значимость диссертации определяется реализацией подхода комбинированного метода компьютерного скрининга для поиска кандидатов в лекарственные средства. В рамках работы проведена оценка этого подхода для выявления малых молекул, ингибирующих терапевтически значимые белки. Практическая значимость диссертации проиллюстрирована эффективностью разработанной методологии. В рамках одной итерации и с минимальными затратами на экспериментальную часть удалось обнаружить соединения с требуемыми свойствами. Хемотипы выявленных ингибиторов также представляют практическую значимость исследования и могут быть использованы для дальнейшей разработки.

Оценка содержания

Диссертация Ильина И.С. включает в себя Введение, шесть глав, Заключение, список публикаций автора по теме диссертации и списка цитированной литературы из 83 наименований. Во Введении обосновывается актуальность работы, цели и задачи исследования, его новизна, положения, выносимые на защиту, а также теоретическая и практическая значимость работы. Поставленные задачи соответствуют выводам из Заключения, а защищаемые положения сформулированы кратко и ясно. В Главе 1 представлено описание белков, выбранных в качестве мишеней, их физиологической роли и существующих малых молекул, которые влияют на их активность. Я не нашел информации об недостатках существующих ингибиторов Ха, это помогло бы понять мотивацию к применению сфокусированной библиотеки. Также было бы полезно представить информацию об успешных попытках искать аллостерические ингибиторы. В Главе 2 дана классификация методов виртуального скрининга с точки зрения наличия знания о структуре мишени. Подробно обсуждаются методы подготовки белковых моделей для моделирования и библиотек органических соединений, а также существующие методы постобработки, позволяющие повысить эффективность виртуального скрининга. Глава 3 посвящена аспектам докинга в контексте разработки лекарств. Дан обзор популярных программ докинга. Глава 4 посвящена поиску автором ингибиторов фактора Ха. Главным результатом поиска стала идентификация новых подтвержденных *in vitro* ингибиторов фактора Ха. Для двух соединений подтверждена

селективность к мишени. В конце Главы 4 подведены итоги применения комбинированного подхода, сочетающего молекулярную механику и квантовую химию. Хотя результат не вызывает сомнения, приведенные значения энтальпии связывания в диапазоне 50-80 кКал/моль вводят читателя в заблуждение, так как выше предполагаемых экспериментальных значений в 10 раз. Показано, что при прогнозировании активности в отношении фактора Ха точность заметно возрастает, если рассматривать энтропию связывания, рассчитанную полу эмпирическим методом, как второй критерий отбора. В Главе 5 обсуждаются результаты разработки теоретической модели аллостерического ингибирования бета-лактамазы и её использование для скрининга библиотек малых молекул. С учётом отсутствия подтвержденных ингибиторов, работающих согласно приведенной модели, как в рамках данного исследования, так и в литературе достоверность такого подхода к аллостерическому ингибированию белка TEM-1 остается под сомнением. Глава 6 описывает результаты разработки антагонистов транскрипционного фактора YB-1 на основе того же протокола моделирования, который использовался для двух предыдущих мишеней, с одним исключением. Вместо одной конформации рецептора для данной мишени используется ансамбль структур, позволяющий в общем случае неявно учесть подвижность кармана связывания. Показано, что с помощью моделирования обнаружено четыре цитотоксических вещества, с предполагаемым противоопухолевым эффектом, а дополнительные эксперименты для двух из них позволили предположить их влияние на функцию YB-1. С учетом специфики действия, данные вещества представляют наибольший интерес из всех описанных в диссертационной работе ингибиторов для дальнейшего исследования и разработки. В Заключение подводятся итоги проделанной работы, и приведены результаты и выводы – шесть пунктов. Далее приведен список опубликованных автором по теме диссертации работ – 10 статей в различных научных периодических журналах, индексируемых в базе данных Scopus, из которых 5 журналов входят в систему цитирования Web of Science. Затем приведен список пяти конференций, где были сделаны доклады по теме диссертации. Видно, что материалы и результаты исследований прошли достаточную апробацию и опубликованы в известных реферируемых журналах высокого научного уровня в своих областях.

Общая оценка работы положительная, однако, возникли следующие вопросы и замечания:

1. Большинство результатов представлено в виде таблиц, хотя для значительного количества данных полученных автором было бы наглядно оценить корреляции расчетов с экспериментальными данными для Ха и показать влияние постпроцессинга на эту корреляцию.
2. Введение постпроцессинга является новым в работе автора, однако его реализация вызывает вопросы. Использование конформации белка, которая была в комплексе с лигандом как конформации свободного белка, для квантовохимического расчета энтальпии связывания привело к ожидаемо завышенным значениям. Вероятно, автору следовало показать, что применение конформации белка в свободном виде не меняет точности постпроцессинга.

3. Вторая мишень в исследовании предполагала аллостерическое ингибирование, как я понял это стабилизация неактивного состояния фермента, но никаких исследований посвященных поиску этой конформации автор не приводит. В принципе, это вопрос можно распространить на остальные мишени, где автор мог исследовать конформации мишеней и идентифицировать состояния удобные для ингибирования и последующего докинга.

4. Использование состояний из результатов ЯМР YB-1 мне кажется ошибочным, так как конформации представленные в PDB записи являются результатом оптимизации геометрии в вакууме при наложении ограничений из ЯМР. Высокая подвижность петли обусловлена отсутствием данных из ЯМР эксперимента и является результатом упрощенного моделирования, что вероятно, не релевантно по отношению к конформациям белка в растворе.

5. В некоторых местах есть проблемы с использованием терминологии и стилистические неточности. Например, понятие молекула-«хит» корректнее заменить на термин соединение-хит. В разделе Введение понятие «лиганд» и «ингибитор» используется в ряде мест взаимозаменяемо, что, очевидно, не совсем верно. Фразу «аллостерическое воздействие» лучше заменить на «аллостерическая регуляция». Также я нашел жаргонизмы, например, “задочены”.

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:

доктор химических наук, старший научный сотрудник отдела математических методов в биологии Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

ГОЛОВИН Андрей Викторович

26.10.2020