

Відгук
офіційного опонента на дисертаційну роботу
Старосили Сергія Анатолійовича
**"Розробка фармакофорних моделей та інгібіторів протеїнкіназ ASK1,
FGFR1 і CK2",**

представленої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Дисертаційна робота **Старосили С.А.** присвячена розробці фармакофорних моделей та відбору ефективних інгібіторів протеїнкіназ людини за допомогою сучасних методів фармакофорного пошуку, віртуального скринінгу бібліотек низькомолекулярних органічних сполук, їх біохімічного тестування і структурно-біологічного аналізу особливостей ліганд-білкової взаємодії. Зокрема, метою роботи було конструювання фармакофорних моделей і розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 та CK2.

Пошук інструментів пригнічення активності, саме протеїнкіназ ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), CK2 (Casein kinase 2) і FGFR1 (Epidermal growth factor receptor 1), був обумовлений зв'язком їх гіперактивності із низкою хвороб і патологій людини. Загалом, розробка інгібіторів протеїнкіназ є важливим напрямом сучасної молекулярної біології та біомедичної хімії. В останні роки ефективні та специфічні інгібітори протеїнкіназ розглядаються не лише як важливий інструмент для вивчення ролі ферментів у мережі сигнальних каскадів клітини, а також як перспективний напрямок розробки нових фармацевтичних препаратів.

Фармакофорний пошук це один з найбільш ефективних методів віртуального скринінгу гетерогенних бібліотек хімічних сполук. Особливо, методи фармакофорного пошуку ефективні у ситуаціях, коли будова молекулярної мішені невідома, взагалі не визначена, а також під час пошуку перспективних агентів серед нових класів сполук. Тому вважаю, що головна задача дисертаційного дослідження Сергія Анатолійовича, яка полягала у розробці більш ефективних фармакофорних моделей та їх застосуванні для пошуку нових інгібіторів протеїнкіназ, пов'язаних з низкою хвороб і патологій

людини, є дуже актуальною і перспективною.

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 двох бюджетних (0112U000254 (2012–2016 рр.) 0112U004110 (2013–2017 рр.)) тематик Інституту.

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

Дисертаційна робота Старосили С.А. була виконана на сучасному науковому та методичному рівні і ґрунтується на значному матеріалі оригінальних експериментальних та теоретичних досліджень. Усі результати були отримані автором особисто або за його безпосередньою участю.

У результаті виконання дисертаційної роботи автором було побудовано оригінальні фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і CK2, знайдено нові інгібітори цих ензимів та розроблено алгоритм подальшої оптимізації моделей і оцінки результатів молекулярного скринінгу.

За допомогою отриманих фармакофорних моделей автором було виконано молекулярний скринінг та ідентифіковано нові інгібітори протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і CK2. Загалом застосований Здобувачем метод молекулярного скринінгу використовувався у комбінації методів комп'ютерного моделювання та тестування *in vitro*. Таким чином, було забезпечено відповідний експериментальний контроль результатів віртуального скринінгу. На прикладі значних за об'ємом бібліотек лігандів була доведена селективність розроблених моделей та їх здатність розпізнавати перспективні інгібітори серед сполук, що належать до різних хімічних класів. На мій погляд, це найбільш важливий момент, оскільки останнє відкриває можливість пошуку інгібіторів протеїнкіназ серед представників нових класів хімічних речовин, включаючи ті, що раніше ніколи не розглядалися як потенційні інгібітори протеїнкіназ.

Автором було розроблено алгоритм оптимізації фармакофорних моделей і рескорингу результатів молекулярного скринінгу, що поєднує оптимізацію радіусів елементів фармакофорів та використання концепції ваг фармакофорних точок і молекулярних дескрипторів QSAR. Відпрацьований алгоритм було реалізовано програмно із використанням мови програмування Java, забезпечено графічним інтерфейсом та системою паралелізації обчислень. Так, оптимізація фармакофорної моделі інгібіторів FGFR1 за допомогою цього алгоритму дала змогу значно збільшити кількість знаходження активних сполук при скринінгу валідаційної вибірки з 21 до 43 і покращити відсоток правильно знайдених активних сполук із 38 до 60%. Оптимізація фармакофорної моделі інгібіторів CK2 дала змогу збільшити кількість знаходження активних сполук при скринінгу валідаційної вибірки з 12 до 39 і покращити відсоток правильно знайдених активних сполук із 58 до 74 %.

Практичне значення одержаних результатів.

В результаті виконання дисертаційної роботи були розроблені фармакофорні моделі інгібіторів протеїнкіназ ASK1, FGFR1 та CK2 для пошуку нових інгібіторів цих ензимів. Було знайдено нові інгібітори перспективні сполуки, які можуть використовуватися для з'ясування функцій цих протеїнкіназ на рівні сигнальних каскадів клітини. Відібрані сполуки можуть бути використані як основа фармацевтичних препаратів для лікування низки захворювань, пов'язаних із аномальною активністю цих протеїнкіназ.

Дисертантом було досліджено молекулярні механізми взаємодії відібраних АТФ-конкурентних інгібіторів з протеїнкіназами ASK1, FGFR1 та CK2, що може бути підґрунтям для розробки більш активних і селективних сполук.

Розроблений здобувачем алгоритм дає змогу значно покращити якість існуючих фармакофорних моделей і, відповідно, отримати більш ефективний інструмент фармакофорного скринінгу.

Особистий внесок здобувача

Викладені в дисертації результати було отримано автором особисто

або за його безпосередньою участю.

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 праць, з них 8 статей у фахових наукових журналах, 1 свідоцтво про реєстрацію авторського права на твір і 4 публікації у збірниках тез наукових доповідей.

Структура дисертації

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, які викладено у п'яти розділах, аналізу й узагальнення результатів роботи, висновків та списку використаних джерел, який нараховує 144 найменування. Дисертація містить 31 рисунок і 15 таблиць. Загальний обсяг дисертації становить 137 сторінок.

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

Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації.

Опонент не має принципових зауважень до ідеї, методів структури і результатів роботи. Однак, під час аналізу дисертації виникла низка запитань дискусійного та рекомендаційного характеру, а також зауважень до викладення і технічного оформлення рукопису:

1. Розділ 1, стор. 28, Рис. 1.1. Фармакофорна модель для першого типу інгібіторів протеїнкіназ. Відсутній переклад і посилання на авторів рисунку. Інформативність рисунка значно програє через монохромне виконання.
2. Чомусь загальні принципи конструювання фармакофорних моделей інгібіторів протеїнкіназ автором обговорюються в розділі, присвяченому протеїнкінази РКВ (Akt, Protein kinase B - стор.25), а вже після цього йде розгляд окремих випадків.
3. Розділ 2. Матеріали і методи досліджень. Дуже часто відсутні посилання на програми і методи. Наприклад, стор. 33, розділ 2.2.2 відсуне посилання на програму Pharmgist. Загалом в розділі присутні лише 7 посилань.

Складається враження, що це усе цілком власні розробки автора. Дуже часто зустрічається відмінності у написанні назв програм і методів, а також, зловживання професійним сленгом, несталі кальки з англійської мови. Останнє є загальним зауваженням до дисертації.

4. Таблиця 4.1 (Розділі 4, стор. 42-45) займає чотири сторінки. На мій погляд, інформацію було можливо викласти більш компактно. Також, перенос на інші сторінки було здійснено без відповідних маркерів стовбців. Це значно ускладнює сприйняття інформації. Аналогічне, зауваження стосується Таблиці 6.1 (Розділ 6, стор. 83-89) і Таблиці 6.2 (Розділ 6, стор. 92-93) Крім того, вважаю, що таблиці подібного об'єму мали бути розташовані у додатку.
5. У більшості випадків, підписи до рисунків не дуже гарно пропрацьовано. Найчастіше, назва констатує інформацію, яка і так зрозуміла, але окремі моменти не розшифровано. На мою думку, для повноцінного розуміння інформації дуже недостає відповідних приміток до рисунків. Останні практично відсутні.
6. В дисертації досить багато тексту, що не несе інформаційного навантаження і має констатуючий характер.
7. Стор.47 (Розділ 4) «Очевидно, що бензотіазол є важливим для прояву інгібувальної активності сполук цього класу, оскільки заміна цього гетероциклу етил-морфоліном та пропіл-морфоліном призводила до повної втрати активності.» - відсутня інформація стосовно того, що Здобувач мав на увазі: результаті експериментів *in vitro*, чи структурний аналіз комплексів *in silico*. Вважаю, що цей момент для читача залишається незрозумілим.
8. Стор. 51. «Сет із 59 різних сполук був зібраний із різних публікацій, що включають більшість класів інгібіторів протеїнкінази ASK1.» Посилання на відповідні статті відсутні. Це лише окремий випадок, але зауваження має системний характер і стосується дисертації в цілому.
9. Стор. 51 Здобувач говорить про кластеризацію 19 лігандів на 10 кластерів, я

не впевнений, що група з 19-ти лігандів може дати якісний поділ на 10 кластерів. На мою думку, це свідчить про дуже високу гетерогенність групи і недостатній обсяг первинної вибірки. Також, роз'яснення застосованої методології кластеризації лігандів наведено значно пізніше її результатів – на стор. 53.

10. На мій погляд, замість детального опису принципів роботи програми PharmaGist (стор. 53-55) в Результатах дослідження, було б більш правильно послатися на першоджерело в «Матеріалах і методах», із зазначенням відповідного бібліографічного посилання на «Інструкцію користувача». Останнє виконано не було.
11. Розділ 5, Рис. 5а (стор. 66) - Суперпозиція інгібіторів FGFR1. Відсутні пояснення де яка сполука розташована на рисунку і до якого з комплексів відноситься той або інший ліганд. В наслідок чого, інформація зрозуміла лише автору.
12. З тексту дисертації не зрозуміло, чим було обумовлено використання різних бібліотек низькомолекулярних сполук: ASK1 – 270000 сполук, FGFR1/CK2 – 180000 сполук. Як що це похідні бібліотеки, то відповідне пояснення відсутнє, і виникає питання якого вони походження і як пов'язані.
13. Стор. 67, Рис. 5.3. «Серед активних сполук ідентифіковано два хімічні класи інгібіторів протеїнкінази FGFR1», але загальна хімічна структура наведена лише для одного. Для іншого класу, схема з'являється значно пізніше, у складі Рисунку 5.6 на стор. 70.
14. Стор. 71, Рис. 57. Структури сполук, що були відібрані за результатами фармакофорного скринінгу наведено без жодної системи тобто, без врахування їх структурних особливостей або активності.
15. Як витікає з тексту дисертації, описуючи особливості ліганд-білкової взаємодії, автор робить висновки виключно на підставі молекулярного докінгу. При цьому, під час визначення залишків, що приймають участь у зв'язуванні лігандів не застосовувались ні методи молекулярної динаміки, ні аланінове сканування або інші методи визначення ролі відповідних залишків

(мутації, FMO, та ін.) На мій погляд, це досить статичний опис механізмів зв'язування.

16. Дуже часто автор згадує використання різних програм, робочих модулів програм без роз'яснень що це і для чого це робилось. "Pharmer ідентифікував...", "Pharmer згенерував...". На мою думку це не коректно. Pharmer це програма, і сама вона нічого не робить. Операції виконував дослідник, тобто Здобувач, за допомогою той, або іншої програми. В наслідок чого, він несе повну відповідальність за правильність вибору і застосування методів, аналіз попередніх даних і оголошені результати. Також відмічу, що посилання на програму Pharmer таким чином як це робиться в наукових працях, я так і не знайшов.
17. Розділ 7. Численні дослідження взаємодії інгібіторів протеїнази і протеїнофосфатази довели роль води у зв'язуванні лігандів з мішенню. Зазвичай, подібне дослідження виконують хоча б на наявних x-Ray моделях з Protein Data Bank.(CCDC RealBase та ін.) Під час розробки алгоритму оптимізації фармакофорних моделей і рескорінгу результатів фармакофорного скринінгу, молекули води повністю вилучалися. Не зовсім зрозуміло, як виконувалось дослідження без врахування такого важливого фактору.
18. Розділ 7 було присвячено розробці алгоритму оптимізації фармакофорних моделей і рескорінгу результатів фармакофорного скринінгу. Відповідні результати було опубліковано у статті та отримано свідоцтво реєстрації авторського права на твір №69413, щодо відповідного програмного продукту "PharmDeveloper". Нажаль, опис цієї програми у дисертаційній роботі відсутній.

Проте, вважаю, що вищевказані зауваження не применшують результати і значення роботи. Загалом вони носять рекомендаційний і дискусійний характер і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Висновок: Враховуючи все вищесказане, вважаю, що дисертаційна робота Старосили С.А. "Розробка фармакофорних моделей та інгібіторів

протеїнкіназ ASK1, FGFR1 і CK2", 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 Атестаційної колегії Міністерства освіти і науки України до кандидатських дисертацій, а її автор - Старосила Сергій Анатолійович, без жодного сумніву заслуговує на присудження наукового ступеня - кандидат біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

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.