

ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертацію Кобзара Олександра Леонідовича
“Потенційні інгібітори протеїнтиrozинфосфатаз на основі
тетраазамакроциклів і фулеренів”,
подану на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук
за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія

Дисертаційна робота О.Л. Кобзара присвячена дослідженню біологічної активності похідних тетраазамакроциклів та фулеренів як інгібіторів ферментів протеїнтиrozинфосфатаз. Безумовно, актуальність теми дисертації не викликає жодних сумнівів, оскільки вивчення інгібіторів ферментів у цілому та фосфатаз зокрема дають можливість не тільки зрозуміти молекулярні механізми важливих біологічних процесів, але й створити основу для розробки новітніх лікарських засобів для терапії численних захворювань. Ферменти родини фосфатаз задіяні в процесах регулювання численних сигнальних шляхів клітини і тому є важливими біологічними мішенями для розробки медичних препаратів.

В роботі досліджувалися сполуки двох структурно досить віддалених класів – фосфонатні похідні тетраазамакроциклів і карбоксильні похідні фулеренів. В обох випадках у молекулах присутня корова частина досить великого розміру.

Вибір саме таких класів речовин цілком віправданий. Так, фосфонатні похідні часто здатні селективно зв'язуватися з ферментами фосфатного обміну, зокрема, такими, як кінази, фосфатази й навіть полімерази, які, проте, не здатні їх використовувати як повноцінні субстрати. Тому сполуки фосфонатного типу можуть діяти як інгібітори вказаних ферментів. Одночасно зрозумілі й широкі можливості функціоналізації поліазамакроциклів через аліфатичні аміногрупи, причому існує можливість регулювати розміщення фармакофорів і загальну геометрію молекул. Це робить поліазамакроцикли перспективною платформою для створення біологічно активних сполук, у т.ч. медичних препаратів. .

Фулерири ж є відносно новим класом сполук, що останніми роками дуже активно вивчається. На перший погляд здається, що великий розмір ядра не дозволяє використовувати похідні фулеренів як терапевтичні засоби, оскільки вони не відповідають по крайній сірі одному з класичних правил Ліпінського (молекулярна маса перспективних для фармакології сполук не повинна перевищувати 500). Проте останнім часом це правило переглядається, оскільки знайдено біологічно активні сполуки і навіть розроблено лікарські засоби на основі таких молекул, як карборанові та клатрохелатні металокомплекси, а також похідні фулеренів. При цьому вважається, що такі похідні з великим жорстким ядром можуть взаємодіяти з біологічними мішенями за принципами “топологічної інвазії”, алостеричного регулювання чи діяти в області білок-білкових інтерфейсів великої площині.

Таким чином, сполуки обох розглянутих в дисертаційній роботі класів є перспективними об'єктами дослідження як можливі інгібтори ферментів, зокрема, і тирозинфосфатаз, та потенційні терапевтичні засоби.

Дисертація досить об'ємна (162 стор.) і побудована за класичною схемою – вступ, огляд літератури (розділ 1), експериментальна частина (розділ 2), обговорення результатів (розділи 3-5), висновки та список літератури.

Огляд літератури обсягом 30 стор. розглядає кілька основних проблем – протеїнтирозинфосфатази та їхня біологічна роль у клітині, біологічна активність і застосування похідних тетраазамакроциклів і фулеренів. Хоча огляд і не об'єднаний одною темою, його тематика цілком узгоджується з предметом та об'єктами дослідження дисертаційної роботи.

Сучасний стан вказаних проблем розглянуто повно. Відзначимо дуже об'ємний список літератури, розмір якого (373 найменування) характерний вже швидше для докторських дисертацій. При цьому важлива не лише детальність, але й на актуальність огляду: приблизно чверть посилань (95) – за період після 2010 р., що свідчить про хороше знайомство дисертанта з найновішими досягненнями науки в його сфері досліджень. Тому огляд може бути корисним як для швидкого ознайомлення з проблемою, так і для спеціалістів у даній галузі.

Експериментальна частина дисертації містить дуже детальні (іноді навіть надлишкові) описи використаних методик проведення ферментативних реакцій, кінетичних досліджень, комп'ютерного моделювання та статистичної обробки даних, яка завжди повинна використовуватися в біохімічних дослідженнях.

Основні результати дисертації представлено в розділах 3-5.

Слід вказати на те, що широке дослідження похідних тетраазамакроциклів та карбоксильованих фулеренів як інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз проведено дисертантом вперше. Власне, ним знайдено нові класи інгібіторів, причому з високою біологічною активністю в діапазоні субмікромолярних/наномолярних концентрацій. Особливо активними інгібіторами виявились похідні фулерену.

Із графіків концентраційної залежності інгібувальної активності сполук в роботі визначено величини IC_{50} для численних сполук на панелі ферментів. Проаналізовано залежність “структуро-активність” інгібіторів та встановлено фактори, що впливають на їхню біологічну активність. Отримані дані важливі для спрямованого дизайну більш ефективних інгібіторів.

В цілому, біологічна активність і селективність сполук може залежати як від структури й розмірів корової частини молекули, так і від типу й розміщення замісників. Цікавим, а наш погляд, результатом роботи є встановлення того, що в ряду тетраазамакроциклів на рівень активності й селективності визначають як розмір макроцикулу, так і природа замісників. У той же час, в ряду фулеренів основний внесок у взаємодію забезпечує корова частина ліганда, замісники ж досить мало впливають на біологічну активність. Це може свідчити про суттєві відмінності в принципах інгібування ферментів сполуками двох класів.

Звертає на себе особливу увагу дуже широке використання в роботі методів молекулярного моделювання, що є її безумовним плюсом. Важливо зазначити, що

автором була проведена серйозна процедура оптимізації структури ферментів-мішеней для подальшого докінгу інгібіторів. Вона виконувалась на основі доступних кристалографічних структур фосфатаз із Protein Data Bank з використанням цілого набору підходів, у т.ч. молекулярної динаміки (пакет GROMACS). Це важливо з огляду на те, що кристалічні структури великих біомолекул часто досить далекі від їхніх реальних релаксованих структур у воді, а тому для коректного дослідження взаємодії білок-ліганд спершу слід розрахувати максимально наближену до природної структуру білка.

В результаті проведеного моделювання кількох комплексів фермент-ліганд було запропоновано достатньо переконливі моделі зв'язування ряду інгібіторів з ферментами, розраховано й енергетичні параметри зв'язування (наскільки це дозволяють процедури, що використовуються в докінгу).

В роботі цілком гармонійно поєднано підходи ферментативної кінетики й моделювання для дослідження можливих молекулярних механізмів інгібування тирозинфосфатаз. При цьому результати моделювання добре узгоджуються з біохімічними даними і дають можливість зрозуміти способи взаємодії лігандів із ферментами, а, отже, й механізми інгібування.

Отже, в дисертаційній роботі О.Л. Кобзара вперше досліджено різні аспекти біологічної активності інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз на основі похідних фулеренів і тетраазамакроциклів. При цьому використано широкий арсенал адекватних сучасних методів досліджень. В результаті експериментів отримано кількісні параметри біологічної активності інгібіторів стосовно різних ферментів родини тирозинфосфатаз *in vitro*. Досліджено механізми біоактивності сполук методами біохімічної кінетики та моделювання. Отримані результати, на нашу думку, становлять значний інтерес для біоорганічної хімії.

Звичайно, представлена робота містить і певні недоліки. Зупинимось на них більш детально.

Основні зауваження стосуються комп'ютерного моделювання. Викликає певні застереження процедура вибору моделі ферmenta для докінгу лігандів і побудови моделей взаємодій. Автор вважає, що відкрита конформація WPD-петлі ферmenta CD45 дає можливість сформувати в області активного центру кишенню, зручну для розміщення фулеренового ядра. Оскільки відсутні рентгеноструктурні дані для цього ферmenta з відкритою петлею, довелось використовувати доступну PDB-структурну з закритою конформацією, пробуючи “розкрити” петлю. При цьому якщо ідентичність амінокислотних послідовностей двох білків становить всього 35%, то навряд чи можна говорити про можливість коректного порівняння “молекулярної поверхні в області активних центрів” (с. 51). Тому було підібрано структуру з вищим півнем ідентичності (с. 52) – хоча й не вказано, з яким саме. Далі було проведено не зовсім зрозумілу операцію – “позбутися деяких мутантних амінокислотних послідовностей кристалічної структури”, провівши кілька амінокислотних замін. В процесі тривалої подальшої оптимізації з використанням молекулярної динаміки отримали структуру CD45 з відкритою петлею, в каталітичному домені якої, проте, було неможливим “облаштування”

фулерену. Тому положення 6 амінокислотних залишків було відкориговане таким чином, щоб отримати структуру, що задовольняла б автора – в якій фулерен може зв’язуватися в активному центрі (с. 55-56).

Все це звичні процедури моделювання в drug design, навіть подібна “ручна” підгонка. Проте МД не дозволяє визначити глобальний енергетичний мінімум молекули, на що здатні лише квантово-хімічні методи, навіть напівемпіричні. Тому не зовсім ясно, наскільки ж реальними є отримані структури. Відкритим залишається і ще одне ключове питання – а чи достовірно відомо, що фулеренове ядро зв’язується саме в активному центрі? Навіть у самій роботі наведено дані, що свідчать про щонайменше два способи зв’язування фулеренів з ферментом.

Є деякі зауваження щодо структури дисертації. Так, розділи “Матеріалів і методів”, присвячені моделюванню (2.5–2.6), крім опису процедур, включають досить широке обговорення підходів, аналіз літературних даних тощо, що значно доцільніше було би розмістити у відповідному місці обговорення результатів.

Розділ 3, присвячений тетраазамакроциклічним інгібіторам, хоча й досить об’ємний (15 стор.), та чомусь не структурований, на відміну від інших розділів, розбитих на параграфи. Це стосується й розділу 5, хоча й значно меншою мірою.

Перелік умовних позначень дисертації займає повних 3 сторінки (с. 5-7) і містить чимало явно непотрібних повторів. Так, одночасно розшифровано абревіатури JAK1, JAK2 і JAK3 (3 типи Янус-кіназ), STAT1, STAT3, STAT5a і STAT5b (4 типи білка-активатора транскрипції), IL-3, IL-4 і IL-6 (різні інтерлейкіни) та ін., що, безумовно, зайве – досить було розкрити самі лише абревіатури без цифрових позначень. В списку, на наш погляд, зайві й багато загальноприйнятих скорочень – наприклад, М, mM і нМ для концентрацій чи “нм” для нанометрів. І головне – перелік скорочень побудовано в цілком довільній формі, а не за алфавітним принципом, тому шукати в довгому списку потрібне позначення незручно.

Висновки слід було б додатково підсилити, вказавши, що в роботі знайдено активні інгібітори ферментів, ефективні в субмікромолярних і наномолярних концентраціях. Адже така висока активність, поряд зі значною селективністю ряду інгібіторів, свідчить про те, що препарати вже цілком можна розглядати як потенційні кандидати в лікарські засоби.

Робота написана гарною мовою і містить дуже мало літературних огріхів та помилок, таких як, скажімо, “емісіонна томографія” (с. 6) замість “емісійна”, “дитіотриетол” (с. 7) замість “дитіотрейтол”, чи не надто вдалих виразів на кшталт “рентгеноструктурні кристали” (с. 51), “отриманий кристал піддавали оптимізації за допомогою програми GROMACS” (с. 55), тощо.

Вказані вище недоліки носять характер несуттєвих і жодним чином не знижують загального високого рівня роботи й отриманих в ній результатів.

Дисертація й автореферат добре оформлені, якісно ілюстровані (в роботі чимало й кольорових ілюстрацій), підписи до схем і графіків цілком зрозумілі.

Висновки роботи ясні, добре сформульовані та відповідають отриманим результатам. Достовірність останніх не викликає жодних сумнівів, зважаючи на

використання в роботі сучасних методів досліджень і коректної статистичної обробки отриманих даних.

Зміст автореферату відповідає змістові самої дисертації.

Результати роботи повністю опубліковані. За матеріалами дисертації вийшло 5 статей у провідних фахових журналах, стаття в колективній монографії та тези 4 доповідей на наукових конференціях. Серед журналів, де представлено статті, є й такі рейтингові міжнародні видання, як *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *Organic and Biomolecular Chemistry*, *Mendeleev Communications*. Публікації свідчать про високий рівень дисертаційної роботи.

Отже, в роботі всебічно вивчено проблеми біологічної активності й можливі механізми дії нових класів інгібіторів протеїнтиrozинфосфатаз, узагальнено нові підходи до створення інгібіторів. Великий обсяг виконаних досліджень, їхня безумовна наукова новизна і практична цінність отриманих автором результатів дозволяють впевнено стверджувати, що перед нами завершена праця на актуальну тему, яка на високому теоретичному й експериментальному рівні розв'язує складну наукову проблему, важливу для біоорганічної й медичної хімії, а також фармакології, біохімії й суміжних наук.

Виходячи з усього сказаного, вважаю, що представлена до захисту робота "Потенційні інгібітори протеїнтиrozинфосфатаз на основі тетраазамакроциклів і фулеренів" відповідає всім вимогам, що сьогодні висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор, Олександр Леонідович Кобзар, повністю заслуговує присвоєння наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Офіційний опонент

завідувач відділу синтетичних біорегуляторів

Інституту молекулярної біології і генетики

НАН України, д.х.н.

I.Ya. Дубей

Підпись Дубей І.Я.

посвідчується

Зав. наук. №
М. Мойсеєв

