

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.192.02

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова

Сибирского отделения Российской академии наук (НАОХ СО РАН)

г. Новосибирск

7 июня 2024 г.

ЗАЩИТА ДИССЕРТАЦИИ

Борисевич Софии Станиславовны, старшего научного сотрудника лаборатории химической физики Уфимского института химии – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук на тему: «Алгоритм описания механизма противовирусной активности ингибиторов мембранных вирусных белков методами молекулярного моделирования» на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.16. Медицинская химия (химические науки).

Научные консультанты: д.х.н. **Яровая Ольга Ивановна**, д.б.н. **Зарубаев Владимир Викторович**

Официальные оппоненты:

Поройков Владимир Васильевич член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории структурно-функционального конструирования лекарств ИБМХ, г. Москва

Хлебников Андрей Иванович доктор химических наук, профессор, профессор Научно-образовательного центра Н. М. Кижнера, Инженерной школы новых производственных технологий Томского политехнического университета, г. Томск

Макаров Вадим Альбертович доктор фармацевтических наук, заведующей лабораторией биомедицинской химии ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», г. Москва

Состав диссертационного совета 24.1.192.02 утвержден в количестве 26 человек. Принимали участие в работе заседания диссертационного совета 20 членов диссертационного совета (из них по специальности диссертации 1.4.16. Медицинская химия (химические науки) – 4 человека

№ п/п	ФИО	Ученая степень, шифр специальности в совете	Должность в совете
1.	Волчо Константин Петрович	д.х.н., 1.4.16.	(председатель)
2.	Тихонов Алексей Яковлевич	д.х.н., 1.4.3.	(зам. председателя)
3.	Шульц Эльвира Эдуардовна	д.х.н., 1.4.16.	Член совета, Врио ученого секретаря
4.	Багрянская Елена Григорьевна	д.ф-м.н., 1.4.3.	Член совета
5.	Багрянская Ирина Юрьевна	д.х.н., 1.4.4.	Член совета
6.	Бардин Вадим Викторович	д.х.н., 1.4.3.	Член совета
7.	Бородкин Геннадий Иванович	д.х.н., 1.4.3.	Член совета
8.	Гатилов Юрий Васильевич	д.х.н., 1.4.4.	Член совета
9.	Зибарев Андрей Викторович	д.х.н., 1.4.3.	Член совета
10.	Карпов Виктор Михайлович	д.х.н., 1.4.3.	Член совета
11.	Колтунов Константин Юрьевич	д.х.н., 1.4.3.	Член совета
12.	Макаров Александр Юрьевич	д.х.н., 1.4.3.	Член совета
13.	Малыхин Евгений Васильевич	д.х.н., 1.4.3.	Член совета
14.	Меженкова Татьяна Владимировна	д.х.н., 1.4.3.	Член совета
15.	Платонов Вячеслав Евдокимович	д.х.н., 1.4.3.	Член совета
16.	Салахутдинов Нариман Фаридович	д.х.н., 1.4.16.	Член совета
17.	Ткачев Алексей Васильевич	д.х.н., 1.4.3.	Член совета
18.	Харитонов Юрий Викторович	д.х.н., 1.4.3.	Член совета
19.	Шундрин Леонид Анатольевич	д.х.н., 1.4.4.	Член совета
20.	Яровая Ольга Ивановна	д.х.н., 1.4.16.	Член совета

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Доброе утро, коллеги! Сначала небольшое техническое объявление. Ольга Анатольевна, ученый секретарь нашего диссертационного совета по семейным обстоятельствам была вынуждена уехать. К счастью, Эльвира Эдуардовна, имеющая большой опыт работы ученым секретарем, согласилась на июнь месяц заменить Ольгу Анатольевну. В ближайшие дни обязанности учёного секретаря диссертационного совета будет выполнять Эльвира Эдуардовна.

Собственно, теперь мы можем приступить к работе. У нас сегодня в повестке дня один вопрос, а именно защита диссертации на соискании ученой степени доктора химических наук по специальности медицинская химия Борисевич Софии Станиславовны. В зале присутствуют 20 членов диссертационного совета, в том числе 4 члена диссертационного совета по защищаемой специальности. Кворум есть, и мы можем приступить к работе. Пожалуйста, Эльвира Эдуардовна, вам слово.

Врио ученого секретаря диссертационного совета – д.х.н. Шульц Эльвира Эдуардовна

Доброе утро, уважаемые коллеги. В диссертационном деле Борисевич София Станиславовны имеется заявление, поданное 9 февраля 2024 года, копия диплома кандидата наук по специальности математическая и квантовая химия, список научных трудов, отзывы научных консультантов, которыми являются Яровая Ольга Ивановна, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ нашего института, и Зарубаев Владимир Викторович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии института Эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, город Санкт-Петербург. Имеется заключение организации, в которой выполнялась диссертация. Это Уфимский институт химии, Федеральное государственное бюджетное учреждение, Уфимского федерального исследовательского центра. Отзыв ведущей организации, это Московский государственный университет имени Ломоносова. Три отзыва оппонентов и 13 отзывов на автореферат. Также членам совета рассылался проект заключения, так что все необходимые для защиты документы имеются, и мы можем приступать к защите. Пожалуйста, София Станиславовна.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Здравствуйте, уважаемые коллеги и друзья. Я, наверное, не буду зачитывать тему своего доклада, поэтому перейду сразу к актуальности. Пандемия COVID-19, вызванная распространением инфекции SARS-CoV-2, убедительно показала, что поиск

и разработка новых малотоксичных противовирусных препаратов — это весьма важная и актуальная задача медицинской химии и вирусологии. Современные подходы к направлению создания химических соединений с заданным типом биологической активности, безусловно, требуют методов молекулярного моделирования. И, как любые другие методы физико-химические, методы молекулярного моделирования имеют свои границы применимости, свои возможности, и понимание их может помочь ответить на многие вопросы, которые возникают перед исследователем, занимающимся созданием новых биологически-активных соединений. Поэтому целью данной работы является создание теоретической методологии, позволяющей дать рекомендации для обоснования выбора биологических решений среди мембранных вирусных белков, описание механизма противовирусной активности малых молекул и разработка прогностической модели для оценки биологической активности новых соединений.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи. Первое: детальный анализ структурных особенностей механизма действия мембранных вирусных белков, а именно, гемагглютини́на и протонного M2-канала вируса гриппа, поверхностного S-белка SARS-CoV-2, F-белка респираторно-синцитиального вируса, гликопротеина вируса Эбола и мембранного белка ортопоксви́русов. Второе: картирование известных сайтов связывания указанных белков с малыми молекулами изображения их фармакофорного профиля с указанием ключевых аминокислотных остатков, описания природных взаимодействий и референсных соединений, если таковые имелись, с аминокислотными остатками сайтов связывания. Третье: поиск и изучение взаимосвязи между энергетическим профилем конформационных переходов гемагглютини́на вируса гриппа с патогенностью дикого и камфецин-резистентного штамма. Четвертое: определение и аннотирование сайтов связывания соединений, влияющих на фузогенную активность гликопротеинов вируса гриппа, поверхностного S-белка SARS-CoV-2 и ингибиторов мембранного белка ортопоксви́русов. Пятое: оценка аффинности малых молекул к сайтам связываний в мембранных вирусных белках, описанных ранее. Описание природы и динамики взаимодействия лигандов с аминокислотными остатками сайтов связывания. Определение взаимосвязи между химической структурой лигандов и аминокислотными остатками связываниями в совокупности с данными биологических тестов. А также создание рекомендаций к структурной модификации лигандов с целью увеличения их аффинности. Ну и наконец, разработка и создание прогностической модели для предсказания

противовирусной активности новых соединений в отношении ортопоксвирусов, в частности, в отношении штаба *vaccinia virus*.

Был проведен анализ научной литературы, в которой были рассмотрены структура и функциональные особенности указанных выше белков. В частности, систематизированы были знания о тех соединениях, которые являются ингибиторами этих белков, и исследования, которые были получены в результате методов молекулярного выделения.

В результате был выяснен ряд нерешенных задач, в частности, достоверно не определено место связки новых малых молекул ингибиторов гемагглютинина, не установлено место связывания ингибиторов фузогенной активности поверхностного S-белка SARS-CoV-2. В литературе, к сожалению, нигде вообще не встречается возможность: может ли быть такое соединение, которое могло бы ингибировать вирусные белки, поверхностные вирусные белки первого типа разных вирусов. Отсутствует пространственная структура полноразмерного протонного M2 канала вируса гриппа и достоверно неопределенное место связывания типа тековиримата – ингибитора мембранного белка р37 ортопоксвирусов и новых ингибиторов.

Все результаты, которые будут представлены в данном докладе, все теоретические расчеты и алгоритмы этих расчетов и методологии были выполнены в Уфимском институте химии УФИЦ РАН. Синтез проводился в Новосибирском институте органической химии. Ну и, наконец, биологические эксперименты были проведены в Векторе, в Санкт-Петербургском НИИ Пастера и НИИ Гриппа.

Объектами исследования являются мембранные белки. Здесь представлены поверхностные вирусные белки первого типа, геометрические параметры полноразмерных или, частично, так или иначе, они были расшифрованы экспериментальными методами и депонированы в базу данных, из которой они были взяты для молекулярного моделирования. В частности, это гемагглютинин вируса гриппа, S-белок SARS-CoV-2, F-белок RSV-1 и, наконец, гликопротеин вируса Эбола. Два других белка, протонный M2-канал и р37 мембранный белок, третичная структура их до сих пор является вопросом спорным, поэтому необходимо было их предсказание. Также в качестве объектов исследования было рассмотрено более 200 химических соединений, которые проявляют активность в отношении указанных вирусов.

Методика расчёта включала в себя подготовку белка и лигандов. Программное обеспечение, которое использовалось это GAUSSIAN C09 и Schrodinger Small Molecules Drug Discovery Release 2020–2022 года.

Молекулярный докинг, протокол молекулярного докинга, условия молекулярно-динамических симуляций подбирались исключительно под конкретную задачу.

Итак, ингибирующая активность малых молекул в отношении мембранных белков вируса гриппа.

Камфецин – соединение, синтезированное в Новосибирском институте органической химии, активно ингибирует репликацию вируса гриппа разных штаммов, в том числе и пандемичного. Агент активен в первые часы заражения и ингибирует фузогенную активность гемагглютиниона. Эти факты позволяют рассматривать гемагглютинин в качестве потенциального биологического решения. С другой стороны, камфецин имеет схожие структурные дескрипторы и схожий фармакофорный профиль, в частности, гидрофобный скаффолд, который выделен здесь зелёным цветом, с известными ингибиторами протонного M2 канала, что позволяет рассматривать и протонный M2 канал в качестве потенциально-биологической мишени.

Сам гемагглютинин вируса гриппа представляет собой поверхностный вирусный белок. Это тример, состоящий из трёх протомеров. Различают первую и вторую субъединицу. Здесь представлены домены схематично. Первая субъединица отвечает за прикрепление к клетке хозяина, вторая участвует в конформационных переходах, в частности, вот эта область гептадных повторов. Известно филогенетическое дерево гемагглютининов, разделяют две группы. Аминокислотные последовательности гемагглютининов этих разных групп отличаются, особенно в первой субъединице. Вторая же субъединица, как правило, консервативна, как правило, в рамках двух групп.

Итак, камфецин. Небольшая молекула, имеющая гидрофобную составляющую. Согласно молекулярному моделированию, она может связываться в месте пептида слияния, в сайте *трет*-бутилгидрохиона. *Трет*-бутилгидрохион представляет собой модельную молекулу. Известные комплексы *трет*-бутилгидрохиона с гемагглютинином, которые расшифрованы методами РСА и депонированы в базу данных. Энергетические параметры связывания камфецина и *трет*-бутилгидрохиона в сайте связывания соизмеримы.

Дополнительно было проведено аннотирование полной поверхности белка, и в белке была обнаружена небольшая полость. Эта полость находится в области протеолиза, и эта полость благоприятна для связывания малых молекул. Эта полость была аннотирована. Определено, что она находится рядом с двумя цистеинами. Два

цистина образуют дисульфидный мостик, связывая две субъединицы между собой. Это очень важное место, потому что именно оно подвергается изменению конформационному в процессе перестройки. Активный сайт насыщен гидрофобными аминокислотами. И можно отметить, что энергетические параметры связывания камфецина в обоих сайтах плюс-минус одинаковые. Однако, если мы делаем процедуру кластеризации, или, так сказать, воспроизводим эти данные докинга, то мы видим, что укладка камфецина в К-сайте более упорядоченная. В дальнейшем эти два сайта называются К-сайт и, наконец, трет-бутил гидрохиноновый сайт.

Еще одно доказательство в том, что сайт такой существует, заключается в следующем. Выравнивание аминокислотных последовательностей сайта связывания гемагглютиниона показывает, что в гемагглютинине третьего типа находится достаточно большое количество аминокислотных замен, и результат докинга показывает, что камфецин вместе с протеолиза гемагглютиниона третьего типа не связывается. Это коррелирует данные, что камфецин ингибирует репликацию вируса гриппа штамма H3N2 в больших концентрациях, чем остальные штаммы.

Параллельно с этим коллегами было проведено исследование, которое позволило получить камфецин-резистентный штамм вируса гриппа. Секвенирование гена гемагглютиниона позволило обнаружить мутацию в области протеолиза, это валин-615 мутировал на лейцин. В результате молекулярного докинга было отмечено, что камфецин образует водородную связь с валином-615.

В результате мутации происходит изменение формы сайта связывания, он становится меньше, и аффинность камфецина к нему падает. Это коррелирует с данными эксперимента, согласно которым камфецин ингибирует репликацию вируса гриппа камфецин-резистентного штамма в большей концентрации, чем дикого типа.

Еще одним способом доказать, что сайт связывания существует или опровергнуть, можно ли провести молекулярный докинг аналогов коэффициентов, что ли, собственно, было сделано. Были взяты 35 соединений, были проведены процедуры молекулярного докинга и была выведена корреляция между данными экспериментальными и расчетными.

Видно, что корреляции здесь присутствуют в обоих случаях. К сожалению, сделать выбор какого-то конкретного сайта мы не можем на данном случае. Но здесь можно отметить, что молекулы, которые более объемные, они больше комплементарны к трет-бутил гидрохиноновому сайту, потому что он большего размера. В то время как малые молекулы, аналогами камфецина комплементарны к К-

сайту в виду их меньшего размера. Тем не менее, раз мутация была обнаружена именно в К-сайте. Соответственно, дальнейшие исследования более глубоко были посвящены этому К-сайту. Здесь вы видите результат молекулярной динамики, сэмплирование данных, то есть наложение нескольких кадров. И видно, что камфецин, как самое активное соединение, более 300 нс, становится стабильным и остается в сайте связывания.

Также этот сайт был рассмотрен как потенциальное место связывания других активных соединений, которые также ингибируют репликацию вируса гриппа, активны в первые часы заражения и подавляют фузогенную активность гемагглютинаина. В частности, его четвертичная аммонийная соль на основе борнеола, она также, как и камфецин, не может связываться в К-сайте третьего типа. Ну и, собственно, это коррелирует с данными экспериментальными. Ингибирующая активность в отношении штамма H3N2 здесь выражена менее.

То же самое можно сказать про О-ацилированные амидоксимы и замещенные 1,2,4 оксадиазолы, они тоже могут связываться как в 3-трет-бутил гидрохиноновом сайте, так и в К-сайте. Ряд соединений комплементарны к трет-бутил гидрохиноновому сайту, ряд к К-сайту, это связано с их структурой и подвижностью. Опять же, результаты расчетов находятся в согласии с экспериментом.

Еще одни соединения, которые также ингибируют репликацию вируса гриппа, также активны в первые часы заражения, подавляют фузогенную активность белка. Они проявляют аффинность к К-сайту выраженную и соизмеримую с камфечином. Самое замечательное, это то, что в результате получен гинсамид-резистентный штамм вируса гриппа и была обнаружена мутация в К-сайте. И мутация та же самая. То есть вирус также под воздействием гинсамида мутирует.

Таким образом, совокупность биологических исследований и теоретических расчетов позволяет нам предполагать наличие вот такого сайта, расположенного в области протеолиза, и благоприятного для связывания малых молекул.

Кстати, невозможно об этом не отметить, что наша публикация вышла в 2018 году, где были описаны как теоретические данные, так и экспериментальные. При подготовке литературного обзора мною была найдена статья 2020 года, в которой авторы описывают то же место связывания. Они, к сожалению, на нас не ссылались. Но это не самое главное. Самое главное, что две совершенно независимых научных группы обнаружили одно и то же место связывания. И это, на мой взгляд, очень здорово.

В тестах *in vivo* было показано, что камфецин-резистентные штаммы обладают низкой патогенностью. Обратите внимание на красные кривые, которые показывают, что животные после инфицирования не теряют в весе.

Известно, что гемагглютинин претерпевает конформационные переходы из префузионной в постфузионную конформацию. То, что вы видите, это визуализация данных, полученных электронной микроскопией и депонированных в базу данных научной группы Бентона. У нас же возникает вопрос: а вообще, можно ли методами молекулярного моделирования, молекулярной динамики, вообще, получить энергетический профиль этих переходов? Хотя бы из формы 1 в форму 2.

И результаты молекулярной динамики показывают, что да, можно это сделать. И были проведены масштабные расчеты, итогом которых стал вот этот энергетический профиль. Видно, что для того, чтобы гемагглютинину перейти с первой формы на вторую, ему нужно преодолеть энергетический барьер. То есть, соответственно, нужно забрать некую энергию. Если мы в гемагглютинин дикого типа, укладываем камфецин, то энергия этого барьера повышается, и образуется комплекс менее стабильный, чем просто сам гемагглютинин, что, по аналогии с химической реакцией, позволяет посмотреть вариант возвращения обратной реакции. Если же у нас в системе присутствуют валин, то, во-первых, у нас сама структура стабилизируется, и системе требуется еще больше энергии, чтобы перейти в формулу 2. Камфецин здесь также увеличивает этот энергетический барьер, однако система, которая образуется, более стабильна.

Тогда мы предполагаем, что снижение патогенности камфецин-резистентного штамма вируса гриппа может быть связано именно с влиянием камфецина на структуру гемагглютинина. Мутация V615 лейцин, которая происходит, она стабилизирует энергетическую конформацию формы 1, и системе требуется больше энергии. Соответственно, расчеты полностью согласуются с экспериментальными данными.

Камфецин и гинсамид имеют схожий фармакофорный профиль с известными ингибиторами ремантадина и амантадина. Соответственно, они проявляют аффинность к сайту связанными соизмеримые с этими данными. Но для того, чтобы оценить влияние лиганда на функциональные особенности белка, необходимо было провести молекулярно-динамические симуляции. И оказалось, что полноразмерной формы M2 канала нет. Несмотря на то, что это достаточно хорошо изученный белок.

Тогда был использован подход наиболее популярный. Сейчас это ColabFold. В результате попытки предсказания «напрямую», сначала тетрамера сразу, а потом отдельно протомера. Результаты были не очень хорошие. Особенно неправильно предсказывались вот эти аминокислоты, которые представлены здесь в виде спирали. Они не соответствуют данным рентгеноструктурного анализа. Тогда было принято решение разделить этот белок на кусочки, предсказать их по отдельности и, потом, вручную собрать в программе. Белок был помещен в мембрану, были приведены молекулярно-динамические симуляции. Без белок, без лигандов и с лигандами. Здесь видно, что у нас образуются стабильные комплексы. В результате двухсот наносекунд наши молекулы не покидают сайты связывания.

Тогда мы впервые построили полноразмерный M2-канал, и данные теоретически позволяют нам предположить возможное мультитаргетное действие камфецина и гинсамида на гемагглютинин, которое заключается, с одной стороны, в подавлении фузогенной активности гемагглютиниона, а с другой стороны, в блокировании протонного M2-канала.

Ингибирующая активность малых молекул в отношении поверхностного белка SARS-CoV-2.

То же самое: S-белок — это тример, состоящий из трех протомеров. Отличает первую и вторую субъединицу. Первая субъединица отвечает за прикрепление к клетки-хозяина. Вторая участвует в похожих конформационных переходах, предшествующих слиянию. Выравнивание аминокислотных последовательностей разных штаммов показывает наличие мутации в первой субъединице и точечные мутации во второй, что может быть важным для разработки ингибиторов именно фузогенной активности белка.

Умифеновир проявляет умеренную активность в отношении SARS-CoV-2 и в отношении псевдовиральной системы, которые демонстрируют, что действие умифеновира на SARS-CoV-2 связано именно с влиянием на S-белок. Однако место связывания умифеновира до сих пор вопрос спорный. Мы провели ряд симуляций. Это достаточно большая работа, в которой заключалась в следующем: сам белок был разобран на «кусочки», то есть отдельно рассматривался рецептор связывающий домен. Отдельно комплекс домена с белком, отдельно луковичная головка, все это дело в виртуальном боксе засыпалось некоторым количеством лигандов и все запускалось на симуляцию 300 и более наносекунд.

В результате были обнаружены статистически значимые сайты связывания из всех возможных. Четыре из них были выбраны, аннотированы и была оценена энергией связывания. И видно, что аффинность умифеновира к сайту связывания 4, который располагается в области гептадных повторов, лучше, чем к остальным сайтам связывания. Это место было описано, и сайт связывания, и полость с аминокислотными остатками и фармакофорный профиль были сравнены с фармакофорным профилем гемагглютиниона.

Видно, что у нас и размер полостей, и аминокислотные остатки и их фармакофорный профиль примерно схожи. Это позволяет предположить, что сайт связывания умифеновира находится именно в области гептадных повторов, и умифеновир действует на SARS-CoV-2 путем ингибирования фузогенной активности S-белка по аналогии с гемагглютинином. Эти данные легли в основу следующей задачи. Есть соединения – производные эфиров борнеола. Видно, что они проявляют активность в отношении разных штаммов вируса SARS-CoV-2, и видно, что активность в отношении этих разных штаммов одинаковая. Что очень важно, учитывая их фармакофорный профиль, то, что они ингибируют репликацию вируса гриппа H1N1, позволяет предположить по аналогии с камфецином и агентом 36, что эти соединения могут ингибировать фузогенную активность гемагглютиниона, а значит, вероятно, могут ингибировать фузогенную активность S-белка и место связывания их находится области гептадных повторов. Поэтому опять была проведена процедура молекулярно-динамической симуляции. Здесь представлены выравнивание аминокислотных остатков сайтов связыванием в радиусе 5 ангстрем. Видно, что мутации здесь точечные, и с этими аминокислотами лиганды не взаимодействуют. Далее была проведена последовательная процедура кластеризации, и оценка энергии связывания. Дополнительно были проведены биологические эксперименты, согласно которым было показано, что соединение ингибирует S-белок и при этом не препятствует связыванию рецептор-связывающего домена с ангиотензин превращающим ферментом, а значит, механизм действия производных эфиров борнеола на SARS-CoV-2 заключается в подавлении его фузогенной активности белка.

Ещё одна группа соединений, это производные усниновой кислоты. Здесь три активных было выбраны, а одно неактивное в качестве отрицательного контроля. Была детально изучена луковичная головка S-белка. Обнаружены разные полости. Эти полости были аннотированы. В результате исследований был выбран сайт связывания биливердина, как наиболее подходящий для таких соединений.

Он же рассматривался как сайт связывания других производных усниновой кислоты. Здесь уже использовались методы молекулярной метадинамики, которые позволили выбрать наиболее стабильную позицию докинга для оценки последующей энергии связывания. Тогда предполагается, что противовирусная активность производных усниновой кислоты в отношении SARS-CoV-2 связана с влиянием на функцию NTD-домена. Ну и, согласно литературным данным, предполагается, что NTD-домен может влиять на реактивность самого белка.

Ингибирующая активность малых молекул в отношении поверхностного F-белка респираторно-синцитиального вируса.

На самом деле, это решение оказалось немножко попроще, потому что геометрические параметры этого белка, они депонированы в Protein Data Bank. Единственный момент, что, как правило, это протомер с лигандом. То есть здесь была приведена процедура сборки этого белка. Тем не менее, сайт связывания хорошо известен, он описан. Есть здесь ингибиторы, такие как сисунатовир. И, собственно, замещенные фенилкумарины, они активны. Они активно ингибируют репликацию РСВ, активны в первые часы заражения, имеют схожий фармакофорный профиль с известными ингибиторами и характеризуются высокой аффинностью к сайту связывания.

Молекулярно-динамические симуляции показывают, что комплексы образуются стабильными, соединения лидеры хорошо там себя чувствуют, взаимодействуют с аминокислотными остатками функциональными: с фенилаланинами, ну и собственно, не диффундируют в растворитель.

Здесь также был применен подход, как и с аналогами камфецина: было взято большое количество фенилкумаринов. Здесь вы видите корреляцию между экспериментальными данными и расчетами. Да, есть выпадающая точка, ну, такое бывает. Опять же, молекулярно-динамические симуляции также достоверно показывают, что комплексы стабильны, и все здесь хорошо.

Молекулярная метадинамика позволила получить профиль взаимодействия лиганда с аминокислотными остатками сайта связывания F-белка и объяснить разную противовирусную активность двух стереоизомеров. Собственно результаты расчетов находится в согласии с экспериментальными данными.

Ещё одни соединения, это на основе эфиров борненола. Удивительным здесь является то, что эти соединения не содержат в себе ароматических групп. Я говорю про активные соединения несмотря на то, что F-сайты насыщены ароматическими

аминокислотами. Но тем не менее, эти соединения активны против РСВ, проявляют активность в первые часы заражения, и для них был сделан дополнительный биологический эксперимент. Результат анализа температурного сдвига, который однозначно позволяет выбрать F-белок в качестве потенциальной биологической мишени. К слову, надо сказать, что, если в соединениях присутствуют какие-либо ароматические фрагменты, эти соединения ингибируют репликацию вируса в невысоких концентрациях. Однако они характеризуются высокой токсичностью, цитотоксичностью, но цитотоксичность – это то, что методы моделирования вам никогда не предскажут.

Опять же, фармакофорный профиль сайта, кстати, схож с фармакофорным профилем лигандов и подходит для связывания столь малых молекул. Поэтому был проведен гибкий докинг и опять молекулярно-динамические симуляции, которые показывают, что комплексы стабильны.

Поэтому, исходя из данных биологических экспериментов и теоретических расчетов, предполагается, что производные фенилкумаринов и N-содержащих эфиров борнеола, подавляют репликацию респираторно-синцитиального вируса за счет влияния на функцию F-белка.

Ингибирующая активность малых молекул в отношении гликопротеина вируса Эбола.

Это также тример, состоящий из трех протомеров. Также в протомере находится область, гидрофобный туннель. И надо сказать, что это место связывания в свое время было определено методами, именно, молекулярного моделирования и потом уже подтверждено методами рентгеноструктурного анализа. Простые эффекты на основе камфена, они ингибируют репликацию вируса гриппа, активны против псевдовиральных систем Эбола-гликопротеин, и ряд из них подавляют репликацию вируса Эбола штамма Заир. Учитывая их структурные особенности, фармакофорные профили, можно предположить, что эти соединения могут ингибировать гликопротеины вируса Эболы. Но для этого нужно убедиться, что фармакофорные профили их схожие. И это было сделано. Он действительно схожий. Результаты расчётов находятся в согласии с результатами эксперимента. И поэтому предполагается, что производные камфена также ингибирует репликацию вируса Эболы, как и репликацию вируса гриппа за счёт подавления фузогенной активности поверхностных белков. Учитывая, что оба поверхностных белка начинают свою активацию при пониженных pH среды.

Фармакофорный профиль ингибиторов поверхностных белков первого типа.

Все исследования, которые были сделаны, результаты биологических экспериментов, результаты масштабных теоретических расчетов позволили сделать вот такую вот картиночку. Анализ этих данных позволил вывести вот такие дескрипторы, которые должны быть, по нашему разумению, в соединениях, которые могли бы ингибировать поверхностные белки первого типа разных вирусов. Это на самом деле очень важно, потому что это достаточно амбициозная задача, и, по крайней мере, это дает нам шанс сделать предположение, что такое соединение, которое может ингибировать поверхностные вирусные белки I типа разных штаммов, существует. По крайней мере, сейчас есть соединения, которое ингибирует два из них. Предполагается, что это малые молекулы объемом до 350 ангстрем, содержащие жесткий гидрофобный каркас, акцепторную группу и количество порядка 70.

Ингибирующая активность малых молекул против ортопоксвирусов.

Здесь работа началась с предсказания третичной структуры Р37. Это белок оболоченный. Белок работает на последней стадии жизненного цикла ортопоксвируса. Он участвует в оболачивании зрелого вириона при выходе его из клетки. Относится он к фосфолипазам. Фосфолипазы достаточно известные белки, поэтому результат предсказания здесь достаточно удовлетворительный. Известно предполагаемое место связывания тековиримата, которое основано на результатах получения тековиримат-резистентного штамма. Это все описано в литературе и работами не имеет отношение к данному докладу.

Но эти данные были взяты, суммированы, были проведены молекулярно-динамические симуляции, определено место связывания, оно было описано, и предполагается, что эта полость близка к фосфолипазному мотиву, который содержит в себе ключевые аминокислотные остатки. Именно они потом и рассматривались как важные для взаимодействия с лигандом.

Эти данные позволили описать механизм производной камфоры и фенхона, которые подавляют репликацию ортопоксвирусов штамма *vaccinia virus* и коровьей оспы. Они активны на последней стадии заражения и имеют схожие с тековириматом фармакофорные профили. В частности, гидрофобную клеточку, донорно-акцепторную группу и ароматическое кольцо с заместителями.

Также данные расчетов и экспериментов, коррелируют между собой, и молекулярно-динамические симуляции показывают, что комплексы стабильны. Эти данные позволяют предполагать, что механизм производных камфора и фенхона

против вирусной активности в отношении ортопоксвирусов связаны с ингибированием р37.

То же самое можно сказать о производных адамантана. Были проведены похожие расчеты. Молекулярный допинг, молекулярно-динамичная симуляция, оценка ΔG .

Дополнительно из литературы были взяты производные адамантана, которые ввели в построение прогностической модели. Эта прогностическая модель была проведена на четырех соединениях. И предполагается, что такие прогностические модели вполне могут быть рабочими. Единственным моментом заключается, что нужно использовать одно химическое пространство для соединений, и данные биологически должны быть достоверными, их должно быть достаточно много.

Ну и наконец, методология молекулярного моделирования.

Все то, что сейчас было рассказано, укладывается в очень важную вещь. Эта важная вещь отвечает на вопрос, как правильно вообще проводить эти расчеты и зачем они нужны. Вот, наверное, это основная вещь. Итак, методология молекулярного моделирования необходима для описания выбора биологического вещества, для описания механизма противовирусной активности действия биологически активных веществ, для систематизации рекомендаций структурных модификаций, что очень важно, и для создания прогностической модели, что вообще является принятой квинтэссенцией всех методов молекулярного моделирования.

С чего обычно начинаются методы молекулярного моделирования? Они могут начинаться как с лиганда, так и с белка, но в моей практике это начиналось всегда с лиганда. Тогда собираются данные про лиганды, необходим анализ структурных и фармакофорных признаков, и этот анализ должен делаться обязательно с совокупными данными биологических экспериментов. Только такая информация позволит выбрать белок в качестве потенциальной биологической мишени. Да, это тоже очень важный момент. Необходимо понимать функцию биологического белка. Как он работает? Какие функциональные аминокислоты в нем действуют? И будут ли вообще ваши лиганды взаимодействовать с этими аминокислотами? Если с этим было всё понятно, геометрические параметры лиганд-белкового комплекса или самого белка, депонированного в Protein Data Bank, могут быть оттуда взяты. Дальше идёт стадия поиска и обоснования выбора места связывания. Опять же, она связана и с функциональными особенностями белка, и с данными биологических экспериментов.

Ну или необходимо предсказание вторичной структуры. Следом идет очень важная на самом деле часть, это выбор и обоснование выбора алгоритма молекулярного докинга. И она должна была быть сделана корректно. Если здесь все получается удачно, следом идет комплекс всяких расчетов. Часть из них можно упустить, можно сделать все. Главное, чтобы результат пришел к выводу, который адекватно согласуется с экспериментальными данными и биологической функцией белка. И если это произойдет, то в самом минимальном результате можно описать механизм биологической активности соединения. Ну или рекомендовать структурные модификации лигандов, что приведет нас к новому лиганду. Ну или создать прогностическую модель, что вообще является самым, самым важным, на мой взгляд, вообще, и всё это, ради чего нужно это делать. Если же это не происходит, то, к сожалению или к счастью, здесь необходимы биологические тесты дополнительные, которые могут привести к другому белку или к альтернативному месту связывания. И весь этот алгоритм необходимо будет повторить еще раз и еще раз, пока мы не перейдем в зеленую зону.

Тогда, в результате биологических экспериментов, анализа этих биологических экспериментов и теоретических расчетов, которые были выполнены в данной работе, можно сделать следующие выводы. Впервые описан фармакофорный профиль альтернативного сайта связывания каркасных производных на основе терпеновых соединений ингибиторов гемагглютинаина.

Сайт расположен в области пептида слияния. Данная полость предпочтительна для связывания малых молекул объемом не более 300 ангстрем, содержащих жесткий гидрофобный каркас и полярный заместитель. Связывание малых молекул в месте протеолиза энергетически стабилизирует конформацию белка, что затрудняет его последующие конформационные перестройки и препятствует слиянию вирусных и клеточных мембран.

Впервые математически обосновано, что снижение патогенности камфецин-резистентного штампа вируса гриппа может быть связано с влиянием камфецина на структуру гемагглютинаина. Аминокислотная замена V615L в месте протеолиза, стабилизирует префузионную конформацию белка и затрудняет конформационные переходы. Энергетический профиль описан, результаты согласованы с экспериментами.

Впервые был собран и представлен полноразмерный протонный M2-канал, и предполагается, что как раз производные терпеновых соединений, среди которых

камфесцин и гинсамид подавляет фузогенную активность гемагглютинирина за счет связывания со стеблевой частью домена белка, а также могут блокировать проводимость протонного M2-канала.

Определен вероятный сайт связывания ингибиторов S-белка SARS-CoV-2, подавляющих его фузогенную активность, описан его фармакофорный профиль. Сайт находится в области гептадных повторов второй субъединицы. Механизм противовирусной активности производных эфиров борнеола как раз и заключается в том, что они подавляет фузогенную активность белка за счёт связывания в области гептадных повторов и энергетически стабилизируют белок.

Производные усниновой кислоты связываются в N-терминальном домене, описан фармакофорный профиль их сайта, и на основании результатов молекулярного моделирования выдвинуто предположение, что противовирусная активность производных усниновой кислоты, вероятно, связана с влиянием на функцию N-терминального домена, что может повлиять на реактивность S-белка.

Приведённый анализ фармакофорного профиля сайта связывания ингибиторов F-белка респираторно-синцитиального вируса, позволил объяснить противовирусную активность фенил замещённых кумаринов и N-содержащих эфиров борнеола, которая может быть связана с влиянием малых молекул на F-белок. Для этой группы соединений это решение дало рекомендации по структурной модификации для того, чтобы увеличить аффинность к сайту связываний.

Согласно результатам молекулярного моделирования, бициклический каркас производных камфена обеспечивает эффективное связывание с гидрофобными полостями сайтов связываний гемагглютинирина вируса гриппа и гликопротеина вируса Эбола. Активация обоих белков происходит при пониженных pH среды, и дальнейший поиск новых аналогов, в том числе этих двух структурных фрагментов приведет к открытию ингибитора, нацеленного на стадию слияния мембран и обладающего широким спектром противовирусной активности.

Показано, что малые молекулы объемом до 350 ангстрем в количествах порядка 70, содержащие жесткий гидрофобный компас, акцепторную группу, и протонированный атом азота могут одновременно связываться в сайтах связывания ингибиторов поверхностных вирусных белков первого типа. Проведенное исследование позволяет сделать вывод, что механизм противовирусной активности этих соединений заключается в подавлении фузогенной активности упомянутых белков.

Производные камфоры и фенхона проявляют противовирусную активность в отношении ортопоксвирусов за счет возможного ингибирования мембранного белка р37. Соединения связываются в области фосфолипидного домена и оказывают влияние на вторичную структуру белка.

И, представлена прогностическая модель для оценки биологической активности производных адамантанов – ингибиторов мембранного белка р37 ортопоксвирусов. Показано, что для создания подобной модели требуется достаточно большое, не менее 35, а сейчас, наверное, я бы сказала, не менее 50, количество соединений с достоверно определенными значениями биологической активности. Методы молекулярного моделирования для оценки энергии связывания должны включать в себя совокупные результаты молекулярно-динамических симуляций для определения референсной докинг-позиции и процедуры гибкого допинга с последующей оценки энергии связывания.

По теме диссертации опубликовано 26 статей, из них 20 Q1 по 2.

Спасибо за внимание.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо, Софья Станиславовна. Кто бы хотел задать вопросы? Тогда.

Член совета – д.х.н. Платонов Вячеслав Евдокимович

У меня, может быть, такой наивный вопрос. Скажите, вот ваш камфецин, который положительно влияет на белок, насколько я понял, в нём содержатся две функциональные группы – имина и гидроксила. Какую роль они могут играть на это положительное действие камфецина на белок? И в этой связи, если они играют положительную роль и важны, для работы. У меня такой вопрос. Нельзя ли использовать в качестве аналога, не аналога, а в качестве тоже рабочей молекулы, молекулы меньшего размера. Я имею в виду глицин. Это аминокислотная кислота, которую продают в каждой аптеке. И пожалуйста, если вы будете каждый день пить глицин, может быть, вы никогда не будете болеть никакими вирусами? Спасибо.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо вам за вопрос. Глицин можно пить, чтобы не болеть вирусами, это же повышает внутреннюю уверенность. На самом деле, здесь действительно, вообще, в камфецине важны две вещи.

Это тот самый атом азота, потому что он может протонироваться при пониженных рН среды, и тем самым дополнительно образуется возможность

связывания в сайте связывания и ОН-группа. На самом деле самое главное взаимодействие, которое постоянно происходит с валином 615, это именно через протонированный атом азота. Что касается молекул глицина, или вообще уменьшить эту молекулу, на самом деле это не все так возможно вообще. Дело в том, что сайт связывания можно представить, как, понимаете, как, например, некую комнату, в которой есть пространство для дивана. И вам нужно вот в это пространство поставить конкретный диван. И если он будет очень маленький, то, соответственно, он не очень хорошо туда впишется. А если он будет большой, то он, соответственно, туда не влезет. Другими словами, что сайт связывания должен очень четко подходить для лиганда. Или, лиганд должен хорошо подходить для сайта связывания. И еще, позвольте, я вас чуть-чуть поправлю. На самом деле, камфецин плохо влияет на белок, потому что он подавляет его фузогенную активность.

Член совета – д.х.н. Платонов Вячеслав Евдокимович

Можно две молекулы глицина поставить на гемагглютинин и тогда с диванами будет все в порядке?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Два дивана будут плохо смотреться. Да, можно затолкать и две молекулы глицина. Но нужно также учитывать нюансы сайта связывания. Действие глицина на фузогенную активность не происходит. И это может быть связано не только с белком. Здесь же представлен достаточно обширный биологический эксперимент. Эти все нюансы нужно учитывать.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Вы говорили, что в камфециновом сайте наблюдалась мутация. Есть ли такие данные по *трет*-бутилгидрохиноновому сайту? Была ли мутация там? Есть ли какие-то доказательства, что камфецин может туда ввязаться?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо за вопрос.

Согласно данным биологических тестов и анализу камфецин-резистентного штамма вируса гриппа, мутация, которая значима и повторяющаяся, была обнаружена одна. Она находится в области протеолиза. То есть, вот та самая, где валин мутирует на лейцин. Что касается биологического доказательства связывания в *трет*-бутилгидрохиноновом сайте, вот именно биологического, чтобы это было видно, их, к сожалению, нет, потому что здесь в качестве доказательства может быть только

получение кристалла с камфецином и расшифровкой его методами РСА. Но такая работа сейчас ведется по подбору условий для создания этого кристалла, поэтому только так. Поэтому данные основаны исключительно на наших масштабных молекулярно-динамических симуляциях и докинге.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Будут ли ещё вопросы? Ну пока, думаю, я буду спрашивать. Почему были выбраны именно вот эти мембранные белки, именно эти белки, именно эти вирусы?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо за вопрос. Какой-то сложно-философский. На самом деле, был изначально выбран камфецин, а потом уже к нему подтянулся гемагглютинин. А потом оказалось, что гемагглютинин — это настолько хорошо изученный такой интересный белок, который относится к поверхностным белкам первого типа, и, соответственно, если предполагать, что мы можем создать молекулу, которая будет ингибировать гемагглютинин и еще какие-то белки, то почему бы не рассмотреть следующие? Ну и потом SARS-CoV-2, вирус Эбола, это все-таки патогенные вирусы. Они ответственны за пандемии и эпидемии. То есть, поэтому, собственно, есть над чем работать.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

А если будут взяты другие белки, других вирусов, не мембранные белки, это алгоритм будет работать?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Да, будет. Единственное, что еще раз подчеркну, что очень важно обоснование биологической мишени. Это вообще является проектом дома, который мы хотим построить, под названием: «Результаты молекулярного моделирования».

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Еще вопрос, пожалуйста.

Слушатель

В ходе работы было построено несколько разных белков, были построены белки из разных частей, либо структура была предсказана нейросетями и потом построена. Такой вопрос. У полученных структур необходима ли им была валидация этих структур, была ли она проведена или в какой степени была проведена валидация полученных белков?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо за вопрос. Значит, здесь конструирование, ну, если мы говорим о конструировании, здесь было два момента. Первый момент, такой самый сложный, это, который касался протонного M2-канала. Что касается валидации? Валидация всегда вопрос достаточно больной для молекулярного моделирования. Вот смотрите.

Значит, нейросети, они на чем-то обучаются. И это обучение, соответственно, происходит, в данном случае, если мы говорим о ColabFold, оно происходит на данных, которые находятся в Protein Data Bank и Big Fantastic Data Bank в которых представлены данные, в частности, M2 канала после 2008 года. После 2008 года весь M2 канал был только как трансмембранная часть. Именно поэтому трансмембранная часть была предсказана хорошо. Что касается валидации, то мы смотрим на предсказание на тест Local Distance Difference Test, то есть разницу в расстоянии между сравнимыми структурами, ну на карту Рамачандран, естественно.

Те части, которые не были ни разу расшифрованы методами экспериментальными, они показаны красным цветом, потому что у них нет обучающей выборки. И только одна была молекула 2008 года, одна система, но она не входит в обучающую выборку, в которой была показана гибкая петля. Именно вот этот кусочек, депонированный 2008 года, и являлся валидирующим кусочком для подтверждения правильности этой молекулы. Ну, все остальное — это полномасштабные длительные молекулярно-динамические симуляции, которые показывают, что белок стабильный, он не разрушается, он из мембраны не выходит.

Что касается второго подхода, это достаточно простой момент. В базе данных депонирован один протомер. Собственно, известно, как этот протомер должен связываться с двумя другими. Все остальное просто строится и, естественно, система уравнивается. Трансмембранная часть в вирусную мембрану укладывается, и дальше работает молекулярная динамика, которая стабилизирует эту систему.

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

Спасибо большое за хороший доклад. Очень большая работа. У нас несколько вопросов, а вот, в частности, три.

Вопрос первый. Вы упомянули в своем докладе проект эксперимента. В частности, эксперимент по рентгеноструктурному анализу. Просто Вы быстро говорили, это РСА белков был?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Для молекулярного моделирования были выбраны пространственные геометрические структуры, то есть кристаллы выращенные, расшифрованные методами рентгеноструктурного анализа. Они депонированы в Protein Data Bank, но это не моя работа. Эти данные были использованы, это литературные данные.

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

То есть это белки?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Это белки, да. То есть это могут быть белки с лигандами, то есть либо белковый комплекс, или просто белок.

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

То есть это литературные данные?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Да.

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

Понятно, спасибо. Вопрос номер два. Когда вы анализировали семейство *orthoroxvirus*, вы ограничивались оспа вакцинами только. Почему именно эти? Почему не *monkeurox*?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Ну, на самом деле здесь ситуация такая. Дело в том, что тот белок, который рассматривается по p37, он считается консервативным белком. Он относится к фосфолипазам, как я и говорила, и он консервативен. Это литературные данные. То есть в штаммах *monkeurox* или *orthoroxvirus*...

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

Он не мутирует?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Практически нет. Фосфорлипазный домен остается тем же самым.

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

Понятно, спасибо. И еще третий вопрос. Вы когда в конце доклада описывали алгоритм ваш, да? Алгоритм описан в общих чертах. Скажите, пожалуйста, достаточно логично. В чем новизна вашего алгоритма? Вот конкретно Ваш вклад, конкретно Ваш подход, в чем он заключается?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо за вопрос. В совокупности данных. На самом деле, большая методологическая проблема именно молекулярного моделирования заключается в том,

что большинство исследователей не используют совокупный подход, о котором говорю я. Очень часто опускаются моменты, связанные с получением дополнительных биологических тестов, которые являются фундаментом создания этого алгоритма, создания этого подхода. Собственно, я ратую за то, что необходимо именно использовать вот совокупный такой подход. И если мы хотим использовать методы молекулярного моделирования не просто для того, чтобы красиво визуализировать статью, а чтобы получить какой-то конкретный научный результат, который будет полезен для вас, для меня и для наших коллег. Нужно делать всё вот так.

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

Понятно. То есть вот этот ваш подход, насколько я понял, он предполагает взаимодействие с экспериментами?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Обязательно.

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

Спасибо большое. И маленький технический вопрос. Когда метод молекулярной механики, на мой взгляд, ну вы это сами понимаете, он основан на очень-очень больших продвижениях. Скажите, пожалуйста, ваш весь этот анализ, он привязан к конкретным методам молекулярных механизмов?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Вы имеете в виду силовое поле?

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

Да-да-да. То есть если они будут развиваться в будущем.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо за вопрос. Во-первых, они будут развиваться, думаю, в будущем, и, значит, результат мы будем получать лучше. Во-вторых, смотрите, как это всё на самом деле происходит. Если мы решаем какую-то конкретную задачу по молекулярному моделированию, мы берём, ну, допустим, часто используемый метод расчёта. Говорим о методе расчёта молекулярной динамики, собственно, проводим его и делаем, очень желательно, делаем сэмплирование данных. То есть не одну динамику делаем, а не несколько динамик. И все эти динамики анализируем и получаем какой-то суммарный результат.

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

А потом выбираете лучший?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Как правило, делаем статистику. То есть процедуру кластеризации, которая показывает, что, например, вот лиганд на протяжении, условно, 50% времени симуляции именно здесь сидит и с этими аминокислотами взаимодействует. То есть все картинки — это результат кластеризации.

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

Понятно. Спасибо большое.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

У меня на продолжение этого вопроса последний, а можно на алгоритм тогда? Что вкладывается под фразу выбора в основании алгоритма молекулярного докинга? Насколько много их может быть?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Это очень важный вопрос, спасибо. На самом деле существует на данный момент 75 программ по молекулярному документу. Из них многие доступные имеют свободный код, то есть вы можете скачать их в интернете и как-то там использовать. Если взять самые известные и хорошо себя зарекомендовавшие программы, такие как, например, Glide — это Schrodinger, Gold, Flex — это BiosolveIT, например, AutoDockVina, что еще я там забыла, ну, еще какой-нибудь там, LigandFit...

Эти программы используют разные алгоритмы. Алгоритмы могут быть, например, алгоритм генетического, генетический алгоритм ламаркавский, или алгоритм постепенного конструирования, или алгоритм скольжения и так далее. Так вот, когда происходит отладка таких программ, то получается, что эти программы как бы обучаются на каких-то конкретных белках. И может быть такое, что этот алгоритм, эта программа для ваших белков не подойдет. И тогда нужно будет искать другую. Что касается данных исследований, здесь можно сказать, повезло, потому что все, что было использовано, использовалась программа GLIDE, правда, с разными протоколами, они нормально коррелировали с результатами экспериментов, и поэтому, собственно, не пришлось менять программное обеспечение.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Ну, то есть выбор алгоритма полностью зависит от того, вы смотрите в литературе, что с подобными белками использовали успешно.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Можно так. А если, допустим, не встречается, то вы провели какой-то предварительный расчет, посмотрели вообще всё это дело в парадигму функциональных особенностей белка укладывается или не укладывается. Если укладывается, то всё и замечательно. А если не укладывается, то тогда да.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович

То есть корреляция или нет?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Да, то есть ли корреляция или нет. Если вообще положение лиганда соответствует вообще пониманию функции белка или не соответствует?

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович

Так, у меня вопрос, следующий по корреляции. Там коэффициенты корреляции отличаются от 0,4 до 0,7. Вы видите, что они хорошие. Мне просто для себя понимать, хорошее это на сколько должно быть? Вот этот коэффициент насколько-то 0,3 это хорошо или плохо?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Нет, 0,3 – это плохо.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович

0,5 это хорошо?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

0,5 это уже нормально. Но я тут так скажу, на самом деле это тоже очень тонкий вопрос вообще создавать корреляцию между результатами теоретических расчетов, учитывая, что мы рассчитываем ΔG конкретно связывания конкретного лиганда к конкретному сайту, а с другой стороны, рассматриваем pIC_{50} , то есть ингибирование репликации вирусов.

И поэтому ожидать на самом деле здесь корреляции, которая бы у вас стремилась к ста процентов, нет, нельзя. Я бы более сказала, что если вам теоретики или вы читаете в литературе такую корреляцию, то они что-то лукавят, честное слово. Поэтому на самом деле, согласно анализу литературных данных и своему опыту, скажу, что 50–70 процентов – это вполне допустимо.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович

Исходя из этих реализаций, можно предсказывать количественные значения IC_{50} для других соединений, которые не тестировались? Или это слишком большой разброс будет?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Можно сделать прогностическую модель, которая здесь была доложена. Здесь есть нюансы, которые надо обратить внимание. Вот смотрите. Можно сделать вот такую вот модель. И действительно эта модель, то есть каждая из этих точек, она получена не просто: один докинг сделан и вот точка нанесена, а несколько процедур молекулярного докинга, выбор оптимальной докинг-позиции, ну и прочие, прочие оценки ΔG и все такое. Собственно, здесь вы видите достаточно успешную корреляцию и вот то, что вы можете получить на выходе. По факту, молекулярное моделирование, такие модели вам могут предсказать именно интервал. Ну и, собственно, этот интервал либо он вас удовлетворяет, либо он вас не удовлетворяет. Вот. Как-то так.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович

А тут сначала были сделаны расчеты, а потом...

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Да, здесь были сделаны расчеты, ну, экспериментальные данные в литературе получены просто, и всё. Просто всегда в результате докинга, как правило, получается не одна позиция, а их получается несколько, и соответственно нужно корректно эту позицию выбрать. Поэтому для каждого соединения здесь было выбрано несколько позиций, вот для, так сказать, апробации модели, и уже получен какой-то интервал.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович

И, кстати, о позициях. Молекула может быть конформационно гибкой. Вирус находится не в вакууме, а в крови плавает, видимо, там соли много еще есть. Это как-то учитывается, и то, и то.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо, вопрос хороший. На самом деле, если мы молекулярный докинг делаем, то тут, конечно, есть у нас допущения. Мы используем, здесь был использован

гибкий докинг. Что это означает? Это значит, что учитывалась, безусловно, конформационная подвижность лиганда. И на этапах выбора выбирался тот конформер, который не обязательно энергетически стабилен. А именно тот конформер, который лучше подходит к сайту связывания.

Что касается гибкости белка, в докинге рассматривается только окружение аминокислотных остатков сайта связывания. И это получается как раз то самое ограничение метода. Чтобы от этого уйти, нам необходимо делать молекулярно-динамические симуляции. Вот симуляции, это уже учитывают.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович

В молекулярной динамике учитывается тоже какой-то небольшой фрагмент белка, или можно весь белок?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Можно весь. Можно весь белок, и здесь считались все белки целиком. То есть, если, допустим, взять большие белки, в частности, в поверхности белок, вот я возьму респираторно-синцитиальный вируса, потому что здесь видно, на самом деле все белки полноразмерные.

Тут необходимо отметить, что, когда распифровывается кристаллическая структура и депонируется в базу данных, какие-то части белка могут быть потеряны. Соответственно, их необходимо достроить. То есть полностью весь белок. Так как мы знаем, что это мембранный белок, то необходимо трансмембранный домен поместить вирусную мембрану. Если вы этого не сделаете, в молекулярной динамике после 300 нс симуляции, у вас белок станет кругленьким. Соответственно, мембрана должна учитываться. Учитывается ее поверхностное натяжение. Дальше ставится коробочка виртуальная, достаточно большого размера, в неё насыпают там различные растворители, в частности здесь вода и 0,5 М NaCl физраствор. Да, получаются очень большие системы, и они требуют более большого времени на расчётах, но уже тогда, собственно, уже хотим точный результат получить, ну или приблизительный.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович

Может так, что эта маленькая молекула будет применять конформацию белка?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Может.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович

Это будет видно?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Это будет видно, но для этого нужно провести более точные расчеты и долго. То есть не ограничиваться на 20–30 наносекунд, как, кстати, очень часто бывает в литературе.

Слушатель

Я совсем точно понял, но близкие молекулы у вас действуют на разные вирусы. Я так понимаю, вот эти вирусы на поверхностных белках имеют похожие сайты связывания.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Верно.

Слушатель

А эти вирусы, получается, не родственные? В процессе эволюции человека?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Нет. Нет. Эти вирусы, да, вот это на самом деле загадка природы, на мой взгляд.

Слушатель

Я имею в виду, если мы возьмем бешенство, там, клещевой энцефалит или какой-нибудь ВИЧ, можно какие-то поверхностные белки поискать, где вот эти молекулы можно попробовать?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Да, спасибо за вопрос. На самом деле, рассмотренные четыре вируса относятся к разным семействам. Объединяет их только то, что эти белки относятся к поверхностным белкам первого типа. Значит, поэтому все 4 вируса, все 4 поверхностных белка первого типа которые были здесь рассмотрены, они относятся к разным вирусам, но их объединяет общий механизм слияния вирусных клеточных мембран. Причем в этом механизме самое важное, я поясню, что здесь нарисовано, вирусные мембраны, трансмембранный домен – голубой и вот эта зелененькая, это, собственно, та самая область гептадных повторов, те самые кудряшечки или спиралечки, которые были показаны. Вот эта часть, как правило, считается первой субъединицей. Она может отличаться, естественно, у всех белков, и механизм связывания с клетками может быть разным, но вот эта область гептадных повторов плюс-минус у указанных белков одинаковая. И сюда же можно записать и ВИЧ.

Поэтому ВИЧ – это тоже есть идея в дальнейшем его рассматривать, но это просто было невозможно сделать, еще и ВИЧ сюда добавить. Именно вот эти конформационные переходы являются плюс-минус одинаковыми. Что касается вируса бешенства, поверхностные белки вируса бешенства относят к белкам третьего типа. То есть у него совершенно другой механизм слияния, который здесь не изучался и не рассматривался. Поэтому бешенства мы не можем к этому компоненту добавить никак.

Член совета – д.х.н. Зибарев Андрей Викторович

У меня вопрос тоже по методологии. Если я правильно понял, то вот для оценки энергии взаимодействия вы использовали теорию DFT, да? И потенциал B3LYP. Известно, что DFT и B3LYP, в частности, очень плохо передают дисперсионные взаимодействия. Которые здесь наверняка важны?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Нет, на самом деле нет. Потому что здесь нужно только было получить оптимальные геометрические параметры системы, и всё.

Член совета – д.х.н. Зибарев Андрей Викторович

А как же вы ΔG оценивали?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

ΔG оценивался методом молекулярной механики с использованием обобщенной теории Борна.

Член совета – д.х.н. Зибарев Андрей Викторович

Мне кажется, очень грубо.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Ну, грубо, но, к сожалению, DFT методами рассчитать огромный белок вы просто не сможете, на это времени нам не хватит.

Член совета – д.х.н. Зибарев Андрей Викторович

А локальные взаимодействия?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Локальное взаимодействие — это, получается, подход к QM/MM, он тоже имеет свои ограничения и, собственно, для данной истории не подходит. Понимаете, есть еще такой нюанс, как целесообразность расчетов. То есть вы должны это сделать не только максимально точно или максимально коррелировать с экспериментом, но еще достаточно быстро, потому что если расчеты будут занимать время много большее, чем эксперименты, которые могут сделать, то какой в них смысл?

Член совета – д.х.н. Зибарев Андрей Викторович

Ну, во-первых, любой подход применит свое значение.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Безусловно.

Член совета – д.х.н. Зибарев Андрей Викторович

А простота получения решения не цель науки. Цель науки получение исхода. Правильно? Это слабый ответ. Значит, по стратегии. Потом, цифры. Речь идёт о молекулярных комплексах, да?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Да, верно.

Член совета – д.х.н. Зибарев Андрей Викторович

Хорошо. Энергии взаимодействий – три. Но все это не работает. Это электростатика, дисперсия и...

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Это все учитывается в методах молекулярной механики. Используются потенциалы. Эти потенциалы, они уточняются.

Член совета – д.х.н. Зибарев Андрей Викторович

Потенциалы же эмпирические. Мой вопрос, можно мне тоже вопрос задать. Почему вы использовали теорию DFT, а не теорию MP2, более точную? И насколько ваше решение устойчиво для функционалов? Ну, это B3LYP, да. Расхожий функционал. Есть другие функционалы, но сейчас это несколько сотен функционалов, да? Есть очень специализированные, Миннесотские, кстати. Что будет если изменять эти функционалы?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

На самом деле результаты, то есть выводы не изменятся. Вот это 100%. Потому что здесь подходы DFT использовались только для получения оптимальной молекулы. То есть это абсолютно предварительные расчеты были проведены, и это не самое главное, что было здесь сделано.

Здесь можно, конечно, перебирать эти методы DFT и потратить на это время. Я даже с вами согласна, есть замечательная публикация, которая называется «A trip to the DFT Zoo», и мы её все читали. И если бы мы здесь с вами беседовали и обсуждали механизм химической реакции, например, какой-нибудь, то, безусловно, этот вопрос был крайне важен. И метод B3LYP бы не использовался, с большой вероятностью. Он бы выбирался и было бы обоснование выбора метода DFT-расчета. А в данном случае

в этом нет просто целесообразности. Это можно сделать безусловно, но целесообразности в этом нет.

Член совета – д.х.н. Зибарев Андрей Викторович

Хорошо. Значит, если я правильно понял, вы использовали DFT только для геометрической оптимизации?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Да, и то не всех молекул. Частично.

Член совета – д.х.н. Зибарев Андрей Викторович

А анализ модели проводили уже из молекулярной механики?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Да, из молекулярной механики и обобщенной теории Борна.

Член совета – д.ф.-м.н. Багрянская Елена Григорьевна

Вы там делаете вывод о том, что у вас два механизма действия, протонный канал и сайт связывания. Можно ли на основании ваших расчетов сказать, какой механизм превалирующий? Есть ли какие-то экспериментальные данные, которые бы подтверждали или наоборот, скажем, заблокировали один механизм? Тем не менее, протонный работает. Например, другой молекулы, которая не работает на наш канал. Ну, чтобы подтвердить...

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо за вопрос. К сожалению, на данный момент, насколько я знаю, системы у нас в России, которая могла бы подтвердить, что у нас блокируется именно M2 канал нет. Что касается результатов теоретических расчетов, здесь в том то и дело, что выбор сделать достаточно сложно, поскольку вещество, камфецин и гинсамид, они ингибируют репликацию жизненного цикла вируса на первой стадии заражения, то есть на первых часах заражения. И там работают как раз два белка, это протонный M2 канал и гемагглютинин. И необходимо еще отметить, что на самом деле работа протонного M2 канала влияет на функцию гемагглютинина также.

Поэтому, собственно, и вывод здесь, считаю, получается достаточно разумным, что действительно влияние камфецина и гинсамида может быть также на протонный M2 канал. Но сделать какой-то конкретный выбор мишени невозможно. Но на самом деле, если мы говорим о соединении, которое рассматривается в качестве лекарственного препарата, так это же хорошо, если оно действует на обе мишени.

Член совета – д.х.н. Ткачев Алексей Васильевич

Я думал, что я понял, но после ответа на вопрос Андрея Викторовича понял, что я ничего не понял. Тогда поясните, пожалуйста, а зачем Вы вообще использовали DFT, если, как Вы говорите, Вам нужна была лишь предварительная геометрия?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Вообще это было сделано для того, чтобы проверить, как правильно геометрические параметры лиганда интерпретирует программа, которую я использую, в качестве валидации. Ну и второй способ, вообще DFT-подход был использован для оценки константа кислотности. Результаты коррелируют с экспериментом.

Член совета – д.х.н. Ткачев Алексей Васильевич

Если вам нужна была просто грубая геометрия, то возьмите молекулярную механику, что быстрее и проще, и не будет вопросов поэтому.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Согласна, но, а почему бы DFT не использовать?

Член совета – д.х.н. Ткачев Алексей Васильевич

Если использовать, то надо же грамотно использовать DFT, потому что Андрей Викторович абсолютно прав. Метод функционала плотности, как таковой, практически не учитывает дисперсионное взаимодействие. И органические молекулы рассчитываются очень плохо, в том числе и геометрии. Для этого вводят специальные костыли или поправки, дисперсионные поправки и так далее. То есть, либо вы DFT используете как надо, либо вообще его не используете.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Хорошо, спасибо.

Член совета – д.х.н. Ткачев Алексей Васильевич

У меня вопрос вот такой. По определению Всемирной Организации Здравоохранения резистентность препаратов, это устойчивость препаратов, которым раньше можно было лечить инфекцию. Скажите камфecin, где, когда, кем использовался для лечения и, в связи с этим откуда берется резистентный штамп?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо за вопрос. Камфecin пока еще для лечения не используется, если только для мышей. А резистентный штамм был получен следующим образом: выращивается штамм вируса гриппа под воздействием нескольких концентраций, увеличивающихся концентраций препарата. Получается резистентный, устойчивый штамм, он секвенируется и ищется в нём мутация. То есть он был получен *in vitro* в пробирочке, в ламинаре.

Член совета – д.х.н. Ткачев Алексей Васильевич

Стандартный вход.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Естественно, да, методика достаточно, я думаю, стандартная.

Член совета – д.х.н. Ткачев Алексей Васильевич

В связи с этим, а зачем столько времени тратить на изучение вещества, которое моментально вызывает появление резистентного штамма *in vitro*?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Ну, во-первых, оно вызывает не моментально, это было сделано искусственно. А во-вторых, результат-то получился замечательный. В результате камфецин-резистентный штамм вируса, штамм-то оказался менее патогенный. То есть даже если мы представим в недалеком будущем, что мы будем использовать камфецин в качестве лекарственного препарата, и штамм вируса гриппа мутирует под его воздействием, он же станет менее патогенным, и мы не будем его тяжело переносить. Разве это не замечательный результат?

Слушатель

Если я правильно понял, то основная мутация, которая вызывает резистентность, связана именно с сайтом гемагглютиниона?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Да, верно, она была там обнаружена.

Слушатель

Но как происходит влияние на M2 канала в таком случае? То есть, если мы берем резистентный штамм, вот эта вот мутация, связанная с гемагглютинином, она приводит к тому, что у нас не происходит не связывания. Вы говорите, что нет модели, чтобы попробовать как раз такие... в какую... в какой именно из мишеней связывается камфецин?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Я не совсем поняла ваш вопрос. Простите.

Слушатель

Ну, вы говорите, что у нас есть две мишени.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Мы предполагаем две мишени. M2 канал и...

Слушатель

И при этом у нас есть мутированный...

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Да, камфецин-резистентный штамм.

Слушатель

У которого заблокировал гемагглютининовый сайт.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Он не заблокирован, он видоизменен.

Слушатель

В том случае, если у нас будет являться ингибитором M2 канала, будет адекватно, не будет ли у нас все равно сохраняться активность? То есть как коррелирует мутация в одном сайте с M2 каналом.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Мутация в гемагглютанине вообще никак не коррелирует с M2 каналом. Функция гемагглютинаина зависит от функции M2 канала, но секвенирование проводилось гена гемагглютинаина, а не гена M2 канала.

Слушатель

Я пытаюсь ответить, если у нас есть две мишени и у нас, допустим, одна заблокирована, то у нас все равно будет работать по другой мишени. Но активность пропадает, то есть получается, он не является ингибитором M2 канала?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Да, но активность же не пропадает совсем, она снижается. Она снижается. Если бы у нас камфецин совсем активность не проявлял в отношении вируса гриппа, тогда да, наверное, это хорошее умозаключение. Но есть еще один момент. Есть еще, знаете, такой момент: количество вот этих гемагглютининов на поверхности белка и количество M2-каналов вот в этом вирусе. Их в значительной степени меньше. То есть их прямо совсем мало.

Член совета – д.х.н. Малыхин Евгений Васильевич

Большое спасибо за очень агрессивный доклад. Давно мы такого не слышали.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо. Я не хотела агрессивировать, честное слово.

Член совета – д.х.н. Малыхин Евгений Васильевич

Значит, у меня вопрос следующий. В автореферате, в главе 6, начинается всё с описания активности, или по-другому, активности в 160 000 раз препарата под названием тековиримат. Вопрос следующий. Вы сами получаете длинное соединение

или предъявляете литературное, и это соединение используется как референсное при последующем определении активности, вот тут 6.1 и дальше?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо за вопрос. На самом деле, да, очень хотелось мне рассказать про эту главу 6 более подробно, но я ограничена 40 минутами, но сейчас же я не ограничена. Значит, я могу рассказать поподробнее. Значит, смотрите, вообще, как начинается исследование, да, это очень важно. Нам необходимо определить потенциальное место связывания лиганда. Для этого нам очень-очень желательно где-нибудь там найти, например, лиганд-белковый комплекс. Или получить там его сами, что, к сожалению, не так просто, но хотя бы найти его в Protein Data Bank. Тековиримат является известным ингибитором p37, и это литературные данные. Как они были здесь использованы? На самом деле было проанализировано несколько публикаций, в которых описывалось, как получался тековиримат-резистентный штамм, и как проводилось секвенирование гена именно p37. В результате были обнаружены мутации вот в этой области, в области фосфолипазного домена. Это все написано, собственно, было в литературном обзоре. Что было сделано лично мной? Мной был этот белок предсказан, он был оценен, описаны его функциональные последовательности, динамика и всё такое. Значит, вот в это место связывание дикого типа был уложен тековиримат и приведены молекулярно-динамические симуляции, которые показали энергию связывания тековиримата. Дальше. Вот эти мутации, которые в литературе очень часто появлялись, они были смоделированы здесь. Опять сюда был уложен, условно, тековиримат, и опять проведены были молекулярно-динамические симуляции. И в результате сэмплирования данных было показано, что тековиримат из этого сайта связывания мутантного типа, он выпадает. То есть комплекс, который образуется, он неустойчивый. И поэтому вот этот анализ данных был использован для дальнейших исследований. Я, позвольте, Вас, отнесу к нашей публикации, которая как раз этому и посвящена, и где вот прямо подробно-подробно-подробно всё написано, как это всё делалось. Вот она, вот это. Вот. Четвёртый номер, 2024 года.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Так, ну, наверное, достаточно. Всё, спасибо. Садитесь. Мы переходим к следующему пункту выступления научных консультантов. Их у нас два. Первая

выступает Яровая Ольга Ивановна, доктор химических наук, ведущий научных сотрудник ЛФАВ нашего института

Научный консультант, в.н.с. НИОХ СО РАН, д.х.н. Яровая Ольга Ивановна

Добрый день, уважаемые коллеги. Очень приятно сегодня присутствовать на защите Софии Станиславовны. Я, по большому счёту, наверное, не должна рассказывать именно про работу, я бы хотела сказать именно про Софию Станиславовну как исследователя, как состоявшегося учёного. Вообще наше знакомство с Софией произошло в 2015 году в Санкт-Петербурге на конференции по органической химии. И мы тогда обсуждали о том, что вот мы только начали работать с производными камфоры, у нас выяснилось, что соединение действительно очень эффективно ингибирует вирусы гриппа. И Софии Станиславовне стала интересна эта тематика, и мы начали тогда работать именно с поиском мишени действия этих соединений. И работы, связанные с камфецином, они были уже совместно вместе с Софией Станиславовной. Очень много интересных результатов было найдено. Но, наверное, я бы хотела сказать про какие-то человеческие свойства Софии Станиславовны. И, наверное, одно из самых таких важных её, ну, с моей точки зрения, важных в научной карьере качеств — это смелость. И эта смелость, она связана даже не с тем, что София поднималась на Эльбрус самостоятельно и махала там флагом и так далее, а со смелостью научной и человеческой.

София Станиславовна не боится браться за совершенно задачи, которые новые, которые никто раньше не делал. Так, например, вот эти работы по изучению динамики взаимодействия переходных состояний гемагглютинаина резистентных штаммов и гемагглютинаина дикого типа. Это совершенно новаторские работы. Никто до нас такого не делал. И эта работа длилась, наверное, в течение года. Это была огромная расчетная работа, когда мы смотрели при разных рН изменения больших белковых единиц. Это были очень большие расчеты, которые требовали загрузки серверов и так далее. Значит, вот эти задачи, задачи, которые были связаны с поиском сайта связывания с коронавирусом на спайке, такого тоже никто до наших работ не делал, когда мы насыпаем большое количество лигандов на белок и выбираем некие какие-то вероятные сайты. Вот определенная смелость и умение взяться за какую-то задачу, которая изначально кажется не очень решаемой и понятной. Это очень важное свойство, черта характера Софии Станиславовны. Ну и в целом упорство в доведении каких-то результатов, пока она не будет уверена, что эти результаты действительно правильные, они действительно согласуются. Это очень важные черты. Еще хотела

сказать, что с циклом этих работ у нас в стране впервые началось направление по систематическим исследованиям поверхностных белков вирусов. До этого цикла работ, таких вообще не было у нас в стране, таких вот систематических глобальных исследований. Ну, наверное, я больше говорить не буду. Я считаю, что в данный момент София Станиславовна — это состоявшийся ученый, который может вести направление, может вести группу исследований, и я считаю, что она заслуживает присуждения степени доктора. Спасибо.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо, Ольга Ивановна.

Так, слово предоставляется Зарубаеву Владимиру Викторовичу доктору биологических наук, заведующему лабораторией экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург.

Научный консультант, заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, д.б.н. Зарубаев Владимир Викторович

Уважаемые коллеги, мне очень приятно присутствовать на защите Софии Станиславовны. Я, как и мой коллега-консультант, тоже не могу хвалить работу, я буду хвалить саму диссертантку.

Медицинская химия – наука достаточно молодая, и как в любой науке, которая находится на стыке двух-трех других наук, на первых ее стадиях исключительно важны взаимопонимания всех сторон друг с другом. И, в этом смысле я могу сказать о Софье Станиславовны, дать ей самую лестную характеристику в том смысле, что она пытается понять вирусологию, понять, как оно на самом деле. Потому что любая модель, любое компьютерное моделирование, сколько бы оно ни было подробное, дотошное, это все равно некое приближение. А никогда мы не смоделируем то, что есть в вирусе на самом деле. И в этом смысле Софья Станиславовна заслуживает самых высоких похвал. С той точки зрения, что она у нас, у биологов, у вирусологов, консультируется, спрашивает, а как оно на самом деле. Гемагглютинин в базе данных зарегистрирован в виде мономера – гемагглютинин в виде мономера в клетке не существует. Гемагглютинин не существует без мембраны. Это тоже нужно учитывать при моделировании, и это оказывает самое решающее влияние на результаты моделирования. Поэтому результаты работы Софьи Станиславовны и разработанные ей алгоритмы выходят далеко за тематику, озвученную в ее докладе, далеко за

тематику поверхностных белков-вирусов, далеко за тематику вообще белков-вирусов. А эти алгоритмы могут быть приложены к любой другой биологической модели, ну, в зависимости от поставленных задач. И в этом смысле работа Софьи Станиславовны является, я бы сказал, образцом взаимопонимания между химиками, компьютерными модельерами и биологами, которыми взаимодействуют, естественно, с этих трёх сторон. Собственно, все исследования приобретают биологический смысл. Ну и должен сказать, что, конечно, Софья Станиславовна является законченным исследователем, очень инициативным, самостоятельным, энергичным и, безусловно, заслуживает присуждение ей степени доктора науки. Спасибо.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо, Владимир Викторович. Так, теперь слово представляется Эльвире Эдуардовне для зачитания документов, поступивших в адрес совета.

Врио ученого секретаря диссертационного совета – д.х.н. Щульц Эльвира Эдуардовна

Первый у нас документ – это заключение организации, в которой выполнялась работа (*заключение прилагается*). Это институт, как мы уже говорили, это Уфимский институт химии, УФИЦ РАН. Работа эта была рассмотрена на объединённом семинаре Уфимского института химии, отзыв подписан руководителем федерального государственного бюджетного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Сафиуллиным Руستمом Лутфулловичем.

Вот о чем говорится в заключении. Сначала о диссертанте. В период подготовки диссертации соискатель Борисевич Софья Станиславовна работала в должности старшего научного сотрудника в лаборатории химической физики Уфимского института химии в обособленном структурном подразделении УФИЦ РАН. В 2003 году Борисевич София Станиславовна окончила химический факультет Башкирского государственного университета по специальности «химия». В этом же году поступила в очную аспирантуру, и в 2006 году защитила диссертацию кандидатскую по специальности 02-00-17 – математическая квантовая химия.

Рецензентом на семинаре по рассмотрению диссертации был главный научный сотрудник, зав. отделом биоинформатики и лаборатории структурно-функционального конструирования лекарств научно-исследовательского института биомедицинской химии имени Ореховича, член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук, кандидат физико-математических наук Владимир Васильевич Поройков. Его отзыв об этой диссертации положительный.

По итогам обсуждений принято следующее заключение. Диссертационная работа Борисевич является цельной, самостоятельной и законченной научной работой, выполненной на высоком профессиональном уровне. Личный вклад автора состоит в постановке цели задач исследования, в анализе литературных данных, выполнении теоретических расчетов, их описаний, интерпретации и публикации полученных результатов. Соискатель является подготовленным специалистом в области медицинской химии.

Далее идёт обсуждение актуальности темы. В ходе выполнения диссертационной работы автором разработаны теоретические положения, которые можно использовать для обоснования выбора биологических экспериментов, описания механизмов противовирусного действия, биологически активных соединений, для систематизации рекомендаций структурных модификаций агентов, проявляющих противовирусную активность широкого спектра, а также для создания прогностической модели для оценки заданной биологической активности исследуемых структур. Борисевич решена научная проблема в области медицинской химии, результат которой может быть использован для разработки и создания противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Далее обсуждается научная новизна. Впервые при помощи методов молекулярной метадинамики предложен механизм снижения патогенности камфецин-резистентного штамма вируса, связанный с изменением энергетического профиля конформационных переходов гемагглютинина, что позволяет расширить границы применимости подобного теоретического подхода. Первый построен и динамически аннотирован полноразмерный протонный M2-канал, геометрические параметры которого могут быть в дальнейшем использованы для разработки и создания новых ингибиторов M2-канала, а также описания механизмов противовирусной активности. Впервые в работе описано мультитаргетное действие на мембранные вирусные белки вируса группа каркасных производных на основе терпеновых соединений.

Впервые использован метод мультилигандной динамики, позволяющий аннотировать потенциальный сайт связывания умифеновира на поверхности S-белка, расположенный в области пептидного повтора и пептида слияния. Проведенный анализ фармакофорного сайта связывания ингибиторов F-белка респираторно-синцитиального вируса позволил объяснить противовирусную активность производных фенилкумаринов и N-содержащих производных эфиров минус-борнеола, которая может быть связана с влиянием малых молекул на F-белок.

Впервые выявлена взаимосвязь между химической структурой ряда лигандов и фармакофорным профилем сайтов связывания ингибиторов поверхностных белков вируса гриппа, SARS-CoV-2, Эболы для разработки рекомендаций структурной модификации лигандов, с целью повышения их противовирусной активности.

Практическая значимость работы заключается в том, что проведена систематизация знаний, алгоритмов, методов молекулярного моделирования и границ их применимости, предложенная методология использования современных методов молекулярного моделирования для исследования механизмов противовирусной активности соединений и создание прогностической модели для оценки фармакологического потенциала новых структур. Диссертационная работа подчеркивает важность сочетания молекулярного моделирования с биологическими тестами. Подобная методика позволяет получить максимально достоверную информацию о природе взаимодействия исследуемых лигандов и вирусных белков, а также сформулировать рекомендации о дальнейшей структурной оптимизации активных соединений.

Достоверность научных результатов заключается в наличии взаимосвязи результатов масштабных теоретических расчетов с данными биологических экспериментов, а также экспертные оценки редакционных коллегий высоко рецензируемых журналов, в которых были опубликованы результаты диссертационных исследований автора. Полнота изложения материалов: по материалам опубликовано 26 статей в научных журналах из которых 12 журнала первого и второго квартилей по медицинской химии, вирусологии, химии и фармакологии. Результаты работы были представлены на различных конференциях. Далее перечисляются работы, в которых отражены результаты исследований Софии Станиславовны.

В соответствии с содержанием диссертация соответствует паспорту специальности 1.4.16 «Медицинская химия», отрасль науки – химические, а именно пунктам 2, 5 и 8. Пункт 2 – Использование фундаментальных методов математической химии (компьютерного молекулярного моделирования и QSAR) с целью прогнозирования возможности взаимодействия определенных химических соединений с предполагаемой биологической мишенью. Пункт 5 — Рациональное создание физиологически активных соединений, действующих на две и более молекулярные мишени (в том числе двояко-действующих, гибридных, мультитаргетных лекарств). И восьмой пункт — Физико-химическое исследование лиганд-рецепторных взаимодействий с целью выявления фармакологической пригодности соединений.

В диссертации соблюдены требования, установленные в пункте 14. Это требования об отсутствии заимствования без ссылок на использование на источники и авторов положения при суждении степеней. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем, соответствует требованиям пункта 1.13 положения и диссертационная работа рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.16, медицинская химия, отрасль науки, химические науки. Заключение принято на заседании объединенного научного семинара. Присутствовало на заседании 41 человек. Результаты голосования за - 41 человек.

Далее у нас есть отзыв ведущей организации (*отзыв прилагается*).

Ведущей организацией по этой диссертации – Федеральное государственное образовательное учреждение Московский государственный университет имени Ломоносова, а именно, кафедра медицинской химии и тонкого органического синтеза химической факультета МГУ. Отзыв готовили Палюлин Владимир Александрович и Милаева Елена Рудольфовна. (*Отзыв прилагается*).

В отзыве ведущей организации также отмечается актуальность темы исследования. Актуальность разработки новых эффективных противовирусных агентов широкого спектра действия не вызывает сомнений. Пандемия ковид вызванная распространением коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, показала проблемы, с которыми столкнулся мир в связи с отсутствием безопасных терапевтических средств для лечения и профилактики заболеваний распространяющейся инфекции. Современные подходы к направленному созданию химических соединений заданным типом биологической активности требуют понимания механизма действия противовирусной активности, для чего необходимо привлечение методов молекулярного моделирования. Диссертационная работа посвящена разработке теоретических положений, которые могут быть использованы для обоснования выбора биологической мишени, описания механизмов противовирусного действия биологически активных соединений, для систематизации рекомендаций структурных модификаций агентов, проявляющих противовирусную активность широкого спектра, а также для создания прогностической модели для оценки заданной биологической активности.

Связь с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства отмечается. Исследование соответствует задачам мероприятия 1.1. Проведение исследований, направленных на формирование опережающего научно-

технологического задела, федеральной целевой программы исследований и разработки по приоритетному направлению развития научно-технологического комплекса России.

Далее отмечается новизна работы. Здесь впервые описан фармакологический профиль, расширены границы применимости методов, молекулярной метадинамики, предложен механизм снижения патогенности камфецин-резистентного штамма вирусов гриппа связанный с изменением энергетического профиля конформационных переходов гемагглютинаина. Используя методологию машинного обучения и гомологического конструирования впервые построен и динамически аннотирован полноразмерный протонный M2 канал, геометрические параметры которого могут быть в дальнейшем использоваться для разработки и создания новых ингибиторов M2 канала. В работе описано мультитаргетное действие на мембранные белки вируса гриппа каркасных производных на основе терпеновых соединений, которые заключаются в совместном ингибировании фузогенной активности гемагглютинаина и блокировании протонного M2-канала. Использование методов мультилигандной динамики позволило аннотировать сайт связывания ингибиторов фузогенной активности S-белка SARS-CoV-2. Сравнение фармакофорных профилей сайтов связывания, расположенных в области гептадных повторов гемагглютинаина вируса гриппа и S-белка SARS-CoV-2, позволило предположить, что соединения ингибирующие слияния клеточной мембраны и мембраны вируса гриппа могут быть активны в отношении S-белка. Данные предположения впоследствии были подтверждены результатами биологических тестов с использованием псевдовиральной системы.

Показана взаимосвязь структурных особенностей фармакологического профиля ряда малых молекул с фармакофорным профилем сайтов связывания ингибиторов поверхностных белков вируса гриппа на основании данного анализа, представлена рекомендация по структурной модификации лигандов с целью повышения их противовирусной активности.

Разработана прогностическая модель для теоретической оценки противовирусной активности для ряда производных адамантана, описаны границы применимости данного подхода.

Далее отмечается значимость исследования для науки и практики. В результате диссертационного исследования, проведена систематизация алгоритмов, методов молекулярно-моделирования, границ и их применимости. Предложена методология использования современных методов молекулярного моделирования для исследования

механизма противовирусной активности соединений и создания прогностической модели для оценки фармакологического потенциала новых структур.

Далее, разбираются структура и содержание работы, но об этом, по-видимому, оппоненты очень подробно скажут, вот именно по структуре и содержанию.

Далее, рекомендации по использованию результатов диссертации Борисевич.

Решена научная проблема в области медицинской химии, результат которой может быть использован для разработки и создания противовирусных препаратов широкого спектра действия. Апробация работы: опубликованы 26 статей, из которых 20 журналов первого и второго квартиля.

Есть замечания по диссертационной работе. Несмотря на общую высокую оценку работы, есть некоторые замечания, вопросы и пожелания.

1. По разделу 3.1.4. При активации гемагглютинаина его вторичная структура, очевидно, может измениться в результате перехода в так называемое «предреакционное» состояние (рисунок 3–29). Об этом автор упоминает на страницах 19–20 литературного обзора (рисунок 1–15). Есть ли у автора какие-либо экспериментальные подтверждения того, что геометрическая структура предреакционного состояния выбрана корректно.
2. По разделу 3.1.6. можно ли применять используемую автором методологию для предсказания третичной структуры виropиринов других вирусов? Насколько эта задача актуальна и какие способы валидации структур существуют на данный момент? Если актуальность не вызывает сомнений, то автору можно рекомендовать продолжить исследования в данном направлении.
3. По разделу 3.5. В данном разделе автор описывает фармакофорный профиль ингибиторов поверхностных вирусных белков 1 типа, в частности гемагглютинаина вируса гриппа, S-белка коронавируса, F-белка РСВ и гликопротеина вируса Эбола. Автору можно рекомендовать использовать полученные данные для создания виртуальной библиотеки соединений, потенциально проявляющих противовирусную активность широкого спектра.
4. По автореферату такое замечание: в названии работы фигурирует слово «алгоритм», но в автореферате схема алгоритма не приводится, хотя в самой диссертации он описан достаточно подробно.

И в заключении: диссертационная работы Борисевич является научно-квалификационная работа и, соответственно, паспорт научной специальности 1.4.16 «Медицинская химия», отрасль науки химической, а именно пункт 2: использование фундаментальных методов математической химии с целью прогнозирования возможности взаимодействия определенных химических соединений с предполагаемой биологической мишенью; пункт 5: рациональное создание физиологически активных соединений, действующих на две и более мишени (в том числе двояко-действующих, гибридных, мультитаргетных лекарств).

В диссертации соблюдены требования, установленные пунктом 14, об отсутствии заимствования без ссылок на источник положения присуждений и научных степеней. Полнота изложения материала диссертации в работе, опубликованной соискателем, ученой степени полностью соответствует требованию пунктов 11–13. Автор диссертации заслуживает присуждение степени доктора химических наук по специальности: медицинская химия, отрасль науки – химической науки. Отзыв заслужен и одобрен на заседании кафедры медицинской химии, тонкого органического синтеза, химического факультета МГУ.

Протокол № 83, 18 апреля 2024 года. Готовили отзыв Палюлин Владимир Александрович и Милаева Елена Рудольфовна. Все, у меня пока. Давайте ответим на вопросы и замечания в отзыве ведущей организации.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

1. В рамках данного диссертационного исследования какие-либо эксперименты по расшифровке геометрических параметров так называемого «предреакционного» состояния или активной конформации гемагглютина не проводились. Однако в данный момент проводится экспериментальная работа по поиску условий кристаллизации комплекса гемагглютина с камфецином, с целью дальнейшего получения кристаллов методами рентгеноструктурного анализа. Необходимо также отметить, что кристаллизация гемагглютина (или любого другого поверхностного вирусного белка) это достаточно нетривиальная задача. А определение геометрических параметров «предреакционного» состояния еще сложная задача. В 2020 году научная группа под руководством Бентона определила геометрические параметры форм 1–4 методами электронной микроскопии. Геометрические параметры «предреакционного» состояния, полученного в данной работе методами молекулярной динамики, были сравнены с

геометрическими параметрами гемагглютинина, соответствующего форме II. Значение среднеквадратичного отклонения положения атомов составляет не более 3 ангстрем. Этот факт свидетельствует о корректности используемых методов расчета и о достоверности полученных результатов.

2. Да, можно. Виропорины разных вирусов представляют собой белки небольшого размера (не более 120 аминокислотных остатков). И несмотря на то, что виропорины классифицируются на четыре класса, их объединяет наличие амфилипатических трансмембранных спиралей, которые формируют ионный канал. Другими словами строение виропоринов патогенных вирусов, таких как SARS-CoV-2 и ВИЧ схожие. Соответственно способ может быть использован тот же. На данный момент геометрические параметры полноразмерных виропоринов различных вирусов, полученных экспериментальными методами, отсутствуют в базе данных Protein Data Bank. Между тем использование полноразмерных белков в значительной степени упрощает молекулярное моделирование и, как следствие, решение задач направленных на создание новых ингибиторов виропоринов – соединений активных в отношении разных вирусов. Самым лучшим способом валидации, конечно, является расшифровка геометрических параметров белков экспериментальными методами. Однако анализ научной литературы и базы данных Protein Data Bank позволяет сделать вывод о том, что создание полноразмерного реального виропорина задача очень сложная. Вероятно, именно по этой причине в базе данных отсутствуют столь желаемые структуры. Исследования в данной области продолжаются.
3. Спасибо за рекомендацию. Создание виртуально библиотеки входит в планы дальнейших исследований.
4. Это безусловно упущение. Однако в докладе к алгоритму уделено достаточное внимание.

Врио ученого секретаря диссертационного совета – д.х.н. Шульц Эльвира Эдуардовна

На автореферат этой работы поступило 13 отзывов (*отзывы прилагаются*). Все отзывы положительные, с высокой оценкой исследования по актуальности темы, научной новизне и уровню исполнения. Вот из них пять отзывов не содержат замечаний.

Сейчас я тогда их просто перечислю, от кого они поступили. Отзыв от Вацадзе Сергея Зурабовича, профессора РАН, доктора химических наук по специальности

«Органическая химия» из Института органической химии имени Н.Д. Зеленского. Отзыв положительный, без замечаний. Следующий отзыв без замечаний — от Балакина Константина Валерьевича, доктор химических наук, по специальности органическая химия, доцент специальности медицинская химия, ведущий научный сотрудник лаборатории медицинского оборудования в области *in vitro* диагностики Московского физико-технического института. Отзыв положительный, без замечаний. Следующий отзыв подписан заведующим лаборатории информационных технологий и фармакологии, компьютерного моделирования лекарств научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством Волгоградского государственного медицинского университета Васильевым Павлом Михайловичем, специальность фармакология, клиническая фармакология. Отзыв положительный, без замечаний. Большие отзывы у всех по несколько страниц, но положительные, без замечаний. Отзыв Людмилы Александровны Краевой. Она заведующая лабораторией медицинской бактериологии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института имени Пастера. Отзыв положительный без замечаний. И еще отзыв Леневой Елены Анатольевны, доктора биологических наук, заведующей лабораторией экспериментальной вирусологии, вакцины и сывороток имени Мечникова. Вот это положительные отзывы.

Далее отзывы, в общем, такие технические недочеты и некоторые такие дискуссионного характера вопросы.

Значит, отзыв от Логиновой Светланы Яковлевны, доктора биологической науки ведущего научного сотрудника отдела опасных вирусных инфекций. В отзыве содержится такое замечание. «Вместе с тем следует отметить, что, на наш взгляд, положения выносимые на защиту 2, 3 и 5 сформулированы не совсем корректно. Положение должно быть сформулировано в утвердительной форме, а не в виде предположения (возможно, может быть и пр.). Замечание не снижает ценность работы».

Отзыв от Гараева Тимура Мансуровича, ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения Национального исследовательского центра биотехнологии и микробиологии имени почётного академика Гамалеи министра здравоохранения РАН. В этом отзыве отмечается. Автореферат отличается последовательностью, логичностью и завершённостью.

1. Но вместе с тем, на странице 3, в разделе «Актуальность темы» несколько неудачно использован термин: «...с заданным типом биологической активности обязательно требует понимания механизма действия противовирусной активности, для чего необходимо...» в данном случае механизм действия относится к субстанции, которая в свою очередь уже обладает противовирусной активностью.
2. На странице 20 идет ссылка на рисунок 12А, где ТМД «выделен красным кругом» по факту кружок синий.
3. На странице 32 рисунка 24 присутствует два 57 соединения.
4. Общим пожеланием диссертанту хотелось бы отметить, что в начале или перед значительными фрагментами представляющие значения биологических свойств, полученных в экспериментах *in vitro* данных, следует сообщить, что данные представленных биологических испытаний являются известным фактом и получены автором из литературы и от коллеги соавторов публикаций. Это упростит понимание для читателя, где данные, полученные диссертантом, а где значения для известных соединений, полученные из открытых источников.

Отзыв от Краснова Виктора Павловича, специальность «Органическая химия», Федеральное государственное учреждение науки Институт органического синтеза имени Постовского, Уральского отделения РАН. Здесь в качестве замечаний отмечается следующее:

Во-первых, не хватает изображений мембранных вирусных белков, которые изучает автор.

Во-вторых, на рисунках, это по автореферату именно, на рисунках, показывающих длительность межмолекулярных контактов между лигандом и аминокислотами не указаны типы этих взаимодействий, хотя они обозначены в процентах, например, на рисунках 13, 25 и 23. Однако приведенные замечания не снижают ценность высокий уровень выполненного исследования.

И дальше, отзыв подписан Негребецким Вадимом Витальевичем, доктором химических наук, специальность - Органическая химия, доцентом кафедры органической химии Федерального государственного бюджетно-образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Пирогова. Его замечания.

1. Рисунки, в частности рисунок 2, предпочтительно дать сразу после их упоминания в тексте. Это позволит сэкономить время для анализа представленного материала.
2. Встречаются предположения без аффилиации, то есть понимания, кому они принадлежат диссертанту или это известные литературные данные. Например: «Предполагается, что связывание малой молекулы между двумя альфа-спиралями может энергетически затруднить данный процесс» (стр. 9) или «Вполне вероятно, что камфецин может связываться в обеих полостях, ингибируя при этом конформационные перестройки.
3. Стр. 10: «Вероятно, при этом происходит вращение вокруг дисульфидной связи между а.о. C₁₈ и C₂₆₃₇, связывающих две субъединицы...». Оценивалась ли в работе энергия связи или известны ли литературные данные?
4. Там же, последний абзац, такое ощущение, что отсутствует сноска под номером «3». Действительно, ссылка появляется только на стр. 17. Вывод – искать долго.
5. Долго искал сакральный смысл, с какой целью диссертант разукрасил табл. 2 (стр. 18). Потом решил, что наверно просто красиво.

Отзыв от Поткина Владимира Ивановича, академик НАН Беларуси, профессор, доктор химических наук, специальность органическая химия, заведующий лабораторией химии гетероциклических соединений. В качестве замечаний можно отметить следующее.

1. Структура соединения 1 (камфецина) на рисунке 5 отличается от таковой на рисунках 1 и 2 на одну CH₂ группу.
2. В подписи к рисунку 15 указано: А, Б – продолжительность межмолекулярных контактов, образующихся между атомами лигандов: камфецина и гинсамида и атомами М2 канала.» – разве контакты происходят между атомами камфецина и гинсамида с а.о. белка? Разве речь не идет о контактах между молекулами?
3. В подписи к рисунку 19 указано: «Вторичная структура поверхностного белка SARS-CoV-2» – вероятно все-таки это третичная структура белка.

Отзыв подписанный Исаковой-Сивак Ириной Николаевной, заведующей лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. Смородинцева, доктором биологических наук, член-корр. РАН. В качестве вопросов и замечаний можно отметить следующее.

1. Применим ли разработанный алгоритм для оценки противовирусной активности препаратов, действующий на белки полимеразного комплекса респираторных вирусов человека? В целом, данные белки являются гораздо более консервативными, по сравнению с мембранными белками вирусов, и предполагается более широкий спектр действия лигандов внутри каждой группы вирусов.
2. Если M2e белок является одной из мишеней действия камфецина и гинсамида, были ли обнаружены мутации в данном белке, приводящие к устойчивости вируса к данным препаратам?
3. Для биологических экспериментов проводилось ли секвенирование генов НА исследуемых вирусов, или последовательности брались из баз данных? Известно, что накопление вирусов на различных субстратах, а также дополнительные пассажи на куриных эмбрионах могут приводить к появлению различных адаптационных мутаций, которые могут вызывать конформационные изменения в самом белке.
4. На рисунках 11,13 у штамма A/Anhui/1/2013 указан подтип H7N3 вместо H7N9. Кроме того, под штаммом A/H5N2/Mallard/12/00, вероятнее всего подразумевается A/Mallard/NetherLands/12/00 (H7N3).

Высказанные замечания не снижают ценности исследования.

Следующий отзыв от Газизова Альмира Сабировича, ведущего научного сотрудника лаборатории элементноорганического синтеза имени Пудовика, института органической и физической химии имени Арбузова, Казань. В отзыве содержатся следующие замечания и вопросы.

1. На рисунке 12 автореферата, при обсуждении процедуры докинга соединений 2–35 в сайты связывания гемагглютинина вируса гриппа, отмечается, что для некоторых соединений была учтена возможность протонирования по атому азоту. Возникает вопрос – по какому критерию эти соединения отбирались, поскольку возможность протонирования по атому азота имеется, вообще говоря, у всех указанных производных камфецина. Конечно, подробное протонирование зависит от кислотности среды, и это вызывает второй вопрос – при каком значении pH среды проводилось моделирование? Последний вопрос также относится к процедуре докинга соединений 125–138 в сайте связывания НА вируса гриппа и GP вируса Эбола (стр. 38).

2. На той же стр. 12 автором делается вывод о том, что камфецин (и, очевидно, его аналоги, представленные на рисунке 5) может связываться в два сайта гемагглютинаина. Очевидно, что в этом случае экспериментальные данные (значения IC50) представляют собой некую усреднённую величину, отражающую тот факт, что часть молекул связывается в одном сайте связывания, часть в другом. В тоже время анализ зависимости значений pIC50 и энергетических параметров связывания (стр. 13, рис. 6 А, Б) проводился автором для каждого из сайта отдельно, без возможного учета конкурентного связывания. Это вызывает сразу два вопроса – насколько изменится корреляция между экспериментальными и теоретическими данными при учете такой возможности и аффинность к какому сайту выше?
3. В работе имеются некоторые опечатки и оформительские недочеты...

По-видимому, они будут отражены в ответах. Я не буду их перечислять.

Еще один отзыв, подписанный доктором химических наук, член-корр. РАН Солоутиным Виктором Ивановичем. Это Институт органического синтеза имени Постовского Екатеринбург. У него такие замечания. Точнее вопросы общего характера.

1. Можно ли применять разработанные теоретические подходы к оценке и прогнозированию других видов биологической активности?
2. На основании проведенных исследований можно ли получить основные рекомендации о необходимости присутствия структурных фрагментов в синтезируемых противовирусных агентах, наиболее благоприятно влияющих на противогриппозный и на другие виды противовирусную активность?

Пожалуйста, ответьте на замечания в отзывах на автореферат диссертации.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Порядок ответов отличается.

Первое, что прислал Вадим Витальевич (*ответ на замечания д.х.н. проф. РАН Негребецкого В.В.*), по поводу рисунка 2 (1), согласна с замечанием.

Далее. (2) Согласна с замечанием. Результаты, которые описывают данные молекулярного моделирования, вообще все теоретические расчеты, получены лично автором. Однако, в тексте автореферата есть сноски, в которых представлена информация, где и в какой группе проводились биологические испытания, или из

какой статьи были взяты необходимые данные для расчетов. Ну вот, например, в частности, на странице 8.

Третий (3): энергия дисульфидной связи не оценивалась. В научной литературе в группе Бентона достаточно подробно описывается механизм конформационных перестроек, изученный экспериментальными методами. Вращение вокруг дисульфидной связи там упоминается. Анализ пространственных структур, соответствующих двум конформациям гемагглютинина, позволяет заметить увеличение угла вращения и длины дисульфидной связи. Вот эти данные — это протомеры гемагглютинина, которые депонированы были в базу данных, то есть результаты получены методом электронной микроскопии группы Бентона. Анализ результатов молекулярной динамики гемагглютинина, выполненной в рамках данной работы, также позволяет заметить увеличение двухгранного угла и длины дисульфидной связи. Геометрические параметры двух первых форм белка соответствуют пространственным структурам, определенным методами электронной микроскопии. То есть здесь представлены экспериментальные, и литературные данные. Видно, что увеличивается динамика дисульфидной связи и меняется диэдральный угол. А это результаты молекулярной динамики. И, собственно, здесь наложение геометрических параметров двух первых форм белка и значения RMSD. Видно, что они все укладываются, в общем-то, в нужные параметры.

Четвёртый (4), согласна с замечанием, ну и наконец, помимо того, что это просто красивая таблица, строки её были окрашены в соответствии вот с этим рисуночком, чтобы было лучше его понимать, но, к сожалению, рисунок не влез, и пришлось его убрать, а таблица красивая осталась.

Второй отзыв (*ответ на замечания академика НАН Беларуси Поткина В.И.*).

(1) Да, действительно, в камфецине потерялась CH_2 -группа, верная структура камфецина вот эта. Дальше.

(2) Второй вопрос. Под межмолекулярными взаимодействиями подразумевается взаимодействие между атомами разных молекул, не приводящее к образованию ковалентных (химических) связей. Например, водородные связи, как правило мы их обозначаем желтыми пунктирными линиями, которые образуются между атомами кислорода камфецина и водорода глицина в положении 34, а также между атомом водорода камфецина и карбонильным кислородом аланина в положении 30. Указанные контактные атомы принадлежат разным молекулам поэтому их также называют межмолекулярными.

(3) Третий. Да, терминологически действительно, на рисунке представлена третичная или трехмерная структура белка, в которой визуализируются элементы вторичной структуры: альфа-спирали, бета-листы и петли.

Отзыв профессора Краснова (*ответ на замечания д.х.н., проф. Краснова В.П.*).

(1) К сожалению, на такую объемную картинку в автореферате просто не хватило места. А, визуализация белков с описанием присутствует в диссертации и была представлена в докладе.

(2) С замечанием согласна. Пунктирная стрелка обозначает водородную связь и направление смещения электронной плотности. Зеленые пунктирные линии обозначают пи-пи стекинг взаимодействия, красные – пи-катион стекинг взаимодействия и фиолетовые – солевые мостики. Для этого вот такую картинку добавила.

Далее отзывы идут без замечаний (*отзывы д.х.н., проф. РАН Вацадзе С.З. и д.б.н. Леновой И.А.*).

Шестой отзыв (*ответ на замечания член-корр. РАН, д.б.н. Исаковой-Сивак И.Н.*).

Применим ли алгоритм разработанный?

(1) Да, применим. Но, опять же, если выбор потенциальной биологической мишени обоснован экспериментальными данными, если это есть, то можно весьма успешно применить методы вычислительной химии для разработки и создания биологически активных соединений – ингибиторов полимеразного комплекса. Однако для получения достоверных результатов необходимо подобрать набор необходимых инструментов квантовой химии и молекулярного моделирования. Например, протокол докинга, метода расчета и т. д. И, конечно, нужно понимать биологическую функцию исследуемого белка и его строение.

(2) Мутации в М2 белке резистентных штаммов вируса гриппа не определяли экспериментальными методами. В данный момент это работа ведется.

(3) Третий вопрос. Экспериментальными методами проводили секвенирование генов гемагглютинаина исследуемых вирусов. Использовали три вируса гриппа: первый – это исходный, который соответствует штамму A/PR/8/34 (H1N1); второй – контрольный или пассированный штамм без препарата и, третий, пассированный штамм в присутствии препарата (камфецина или гинсамида). В пассированных штаммах вируса гриппа была определена аминокислотная замена в рецептор-связывающем сайте. В пассированном штамме в присутствии препарата

дополнительно были обнаружены мутации в стеблевой части гемагглютинина в месте протеолиза.

(4) На указанном рисунке действительно присутствуют опечатки при указании штаммов вируса гриппа, нужно было написать, что это штамм Пенсильвания 1985 года. С замечанием согласна.

Без замечаний (*отзыв об автореферате д.м.н. Краевой Л.А.*).

В данном предложении (*ответ на замечания к.б.н. Гараева Т.М.*) речь идет о механизме воздействия малой молекулы на конкретную биологическую мишень. Тем не менее, с замечанием согласна (1). С точки зрения вирусологии термин неудачен.

Здесь по поводу красных и синих кружочков (2): на рисунке трансмембранный домен действительно выделен синим цветом, а продолжение трансмембранного домена – короткая гибкая петля, которая здесь как спираль представлена, выделена красным кругом. Речь в тексте именно об этой петле, написано: «Тем не менее в предсказанной структуре протомера гибкая петля также представлена как продолжение спирали трансмембранного домена (на рисунке 12А выделена красным цветом).»

(3) Со следующим замечанием согласна, это действительно опечатка.

(4) Далее я согласна с замечаниями. Однако в тексте автореферата присутствуют сноски, в которых представлена информация, где и в какой группе проводились биологические испытания. Например, вот здесь. Или ссылочка на соответствующие публикации на странице 25.

Профессора Салоутина (*ответ на замечания член-корр. РАН, д.х.н., проф. Салоутина В.И.*).

(1) Да, можно, при условии достоверного определения выбора биологической мишени и понимания строения и функции рассматриваемого белка.

Второй вопрос (2). Тоже можно. Но здесь есть два момента. Если достоверно известна биологическая мишень и место связывания лиганда, то анализ сайта связывания позволит достаточно точно определить какие фрагменты молекулы значимы и обеспечивают контакт с функциональными аминокислотами.

Например, полость связывания ингибиторов F-белка содержит фенилаланины, стекинг которых друг с другом позволяет стабилизировать компактную конформацию белка до процесса слияния. Присутствие ароматических колец в лигандах – потенциальных ингибиторов F-белка может увеличить аффинность лиганда к сайту связывания, что приведет к дополнительной стабилизации компактной конформации. Это хорошо прослеживается при анализе результатов молекулярного докинга N-

содержащих эфиров борнеола. Соединения, содержащие ароматические группы, в общем, связываются лучше в сайте связывания и ингибируют репликацию РСВ в меньших концентрациях. Собственно, вот эта вот картина как раз визуализирует: полость связывания, а именно аминокислотные остатки, ну и соединения, которые содержат ароматическое кольцо, находятся в верхней зоне.

Если биологическая мишень не известна, то тогда можно провести структурный анализ, который позволит определить наиболее часто встречающиеся скаффолды в соединениях ингибирующих, например, репликации вируса гриппа. Так, анализ базы данных активных противогриппозных агентов в отношении штамма A/H1N1 (848 соединений) позволяет заметить наиболее часто встречающиеся адамантановый или норборнановый фрагменты.

Следующий отзыв без замечаний (*отзыв д.х.н., доц. Балакина К. В.*).

11 отзыв (*ответ на замечания по автореферату д.б.н. Логиновой С.Я.*) Одно из первых замечаний, отвечала, полностью согласна.

Отзыв 12 (*ответы на замечания по автореферату д.х.н. Газизова А.С.*).

(1) Возможность протонирования по атому азота имеется у всех производных камфоры. Алгоритм подготовки лигандов к расчетам включает в себя генерацию протонированных форм в зависимости от структуры. При этом желательно, чтобы молекулярный докинг был проведен для всех форм, как протонированных, так и нет. Для того, чтобы уменьшить общее количество вычислительных итераций необходимо было убедиться, что количество протонированных форм производных камфоры в значительной степени превышает количество непротонированных. Оценка константы кислотности и дальнейшее использование уравнение Гендерсона-Хассельбаха позволяют получить ответ на этот вопрос. Здесь представлены формулы. В данной работе были выбраны четыре активных соединения, для которых были оценены константы кислотности экспериментальными и теоретическими методами. Далее дополнительно были добавлены еще две структуры 19 и 20, с целью оценить изменение константы кислотности в зависимости от присутствия ароматического фрагмента. Моделирование проводилось при pH среды равной 5.0, так как активация конформационных перегруппировок гемагглютинаина начинается именно с при пониженной pH среды. Уравнение Гендерсона-Хассельбаха позволяет учесть соотношение протонированных и непротонированных форм лигандов. В данном случае, использование методов квантовой химии, дополнительно позволило убедиться

в том, что молекулярный докинг необходимо делать для протонированных форм рассматриваемых лигандов.

(2) Второй вопрос. Это по поводу IC50, т. е. сравнения. Это не так. Каждая точка соответствует энергетическим параметрам связывания лиганда в сайте связывания. Анализ результатов молекулярного QM-докинга позволяет сделать вывод, что все рассматриваемые соединения могут связываться в обоих сайтах связывания. Однако часть молекул имеет более высокую аффинность к ТБГХ-сайту (более объемные производные камфоры), а часть к К-сайту (молекулы сравнительно меньшего размера). Учесть возможность конкурентного связывания лигандов возможно, используя методы молекулярного, но расчет будет достаточно сложным. Если использовать грубое приближение, то получается вот такой индекс корреляции.

(3) С замечанием, безусловно, согласна.

Ну тринадцатый (*отзыв об автореферате д.м.н. Васильева В.П.*) без замечания.
Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо, Софья Станиславовна. Принимаем? Все! Спасибо.

Так, тогда переходим к следующему пункту, а именно к вступлению официальных компонентов. В зале присутствует Макаров Вадим Альбертович, доктор фармацевтических наук, заведующий лабораторией биомедицинской химии, института биохимии им. Баха, город Москва. Большое спасибо, что нашли возможность к нам приехать.

Официальный оппонент – д.фарм.н. Макаров Вадим Альбертович

Большое спасибо, что нашли возможность меня пригласить. Ну, я не знаю, насколько у вас принято зачитывать отзывы, я, наверное, не буду этого делать, я зачитаю там замечания и некую официальную часть. Поэтому я позволю себе, что называется, в такой более свободной манере поговорить по поводу этой диссертации. Начну с того, что, конечно, мне было любопытно, что меня пригласили в качестве оппонента, потому что я являюсь, действительно, таким реальным оппонентом различных расчетных работ, несмотря на то, что я их использую в своих многочисленных статьях, но при всем при том, я такой вот сам от себя человек от плуга, да, то есть вот от сохи. Я люблю взять мышь, посмотреть, либо она жива, либо она мертва, и все остальное для меня имеет очень маленькое значение. Однако, несмотря на это, я был приглашен в качестве официального оппонента, и я, наверное, один из немногих присутствующих в

этом зале, кто прочитал и автореферат, и диссертацию целиком, что будет видно из тех вопросов, которые я поставил перед соискателем.

Ну, как обычно, когда мы что-нибудь рецензируем, прежде всего, мы говорим, есть такое понятие как «общее впечатление». Общее впечатление – да, это докторская диссертация. Безусловно, мы достаточно часто, и многие из присутствующих в этом зале, безусловно, оппонируем кандидатские диссертации, и часто сами перед собой, у нас всегда возникает вопрос, ну, есть кандидатская диссертация, есть докторская диссертация, они отличаются количеством страниц, там 150 на 350, или они еще чем-нибудь другим отличаются. В данном случае я должен сказать членам ученого совета, что да, эта диссертация отличается от кандидатской именно задачами и результатами, которые в ней были достигнуты.

Давайте пройдемся тогда по самой диссертации. Актуальность действительно не вызывает никаких сомнений. То, что сама тематика и диссертация, она является очень актуальной. И действительно, учитывая те вопросы, которые здесь прозвучали уже в зале, я даже мог бы построить свое выступление несколько иначе.

Я могу вам сказать, что медицинская химия очень старая наука. Готов поспорить. У меня в собрании есть книга 1666 года, изданная в Лондоне, называющаяся «Медицинская химия и лечение больных». Но при этом мы, безусловно, в настоящий момент находимся в некотором переломном моменте. И София Станиславовна является тем самым лидером вот этого самого переломного момента. Конечно, очень легко всяко-разно тюкать лидера, поскольку он, безусловно, делает массу ошибок. Кстати, любопытно заметить, когда я читал диссертацию, я обнаружил энное количество опечаток и даже пропущенные действительно CH_2 -групп, что является наглядным свидетельством, что эта диссертация не читалась чатом GPT.

Сейчас вообще-то это как бы принято, он убирает все отпечатки, то есть эта диссертация действительно была написана человеком. Это большой плюс, казалось бы, для математики. Поэтому актуальность не вызывает сомнения, при том, не актуальность именно не в плане того, что София Станиславовна рассматривала вирусы, а то, что она пытается привнести математическое описание не просто биологических процессов, а нашего понимания жизни. Поэтому это, подчеркиваю еще раз, это является частью именно собственно докторской диссертации.

Диссертация построена классическим образом, там введение, литературный обзор, достаточное количество ссылок, рисунков. В диссертации, конечно, намного все более понятно, чем в автореферате, потому что специфика работы заключается в том,

что многие картинки и схемы, они очень сложны, и если в диссертации их можно было увеличить гораздо, то в автореферате они получились просто очень сильно сжаты, и поэтому, возможно, многим коллегам не было до конца ясно, что там нарисовано, но позвольте мне сказать, что в самой диссертации в обсуждении результатов все написано очень корректно, красиво и достаточно понятно.

Безусловный очень большой плюс в данной диссертации, что в лучшую сторону отличает данную диссертацию, то, что она не взяла там какой-нибудь молнупиравир, который был сделан в Соединенных Штатах с большим успехом и так далее, его исследовала. Она взяла соединение из команды Наримана Фаридовича, на которое мы смотрим, мы знаем сразу, кто его сделал, какая команда его сделала. И то, что оно, именно это соединение, новое соединение, являлось для нее вот таким базовым фрагментом. То есть это говорит не только о том, что она пыталась изучить, как это соединение взаимодействует с мишенью, какие еще варианты существуют при этом. Но он также говорит о ее способности работать со всякими другими нашими российскими командами. Как человек, приехавший из Москвы, мы ближе, ближе, чем вы к войне. У нас там при входе сразу висит объявление, бомбоубежище 1-е сюда, бомбоубежище 2-е сюда. У вас такого нет. Для нас это сильно важно.

Мой отзыв, он, безусловно, выложен в деле диссертанта, то есть опубликован. Я так понимаю, я его предоставил вовремя, поэтому тут все написано. И по каждому разделу я нашел свои положительные стороны, которые есть. И я не хотел бы уж очень долго зачитывать положительные моменты. И еще раз все-таки хотел сказать, что выводы диссертации лично у меня, как у практикующего медицинского химика, который с одной стороны делает синтез, с другой стороны может препарировать и мышь, выводы диссертации не вызывали у меня никаких сомнений. Я считаю, что все очень хорошо научно обосновано. Мне было это понятно как человеку, который смотрел на это дело со стороны.

Работа имеет существенное практическое значение. И об этом я хотел бы сказать еще раз. Безусловно, именно из-за того, что это одна из малочисленных докторских диссертаций, которая рассматривает возможности математического моделирования, я бы сказал, и как можно, математические методы, приложить именно к медицинской химии, даже, может быть, в меньшей степени к химии, а в большей степени к неким таким объектам биохимии, биологическим объектам.

И именно поэтому я хотел бы сказать, что это очень сильно практическая диссертация, хотя кажется, что этот не так. Ровно две недели назад у нас была очень

подробная встреча с Г.Н. Енгальчевой, которая возглавляет четвертый отдел ФГБУ НЦЭСМП, которая дает разрешение на клинику и так далее. И обсуждались вопросы, как вот в современном мире, когда многие вещи стали мало доступны, какие-то вещи недоступны, но как мы можем пройти доклинику и так далее с учетом того, что, например, механизм действия обязан быть описан. Так вот, позиция разрешающих, регулирующих органов Минздрава на сегодняшний день такова, что если вы очень качественно, подчеркиваю, представите именно расчетные доказательства механизма действия вашего агента, вашей оригинальной молекулы, то этого будет для них достаточно. Поэтому то, что сделано Софией Станиславовной, это именно имеет большое практическое значение. Если для неизвестных молекул мы частично можем доказать механизм действия, и представить вот такого уровня математическое доказательство их механизма действия, то это вполне может входить в досье по лекарственному препарату, что, собственно говоря, является нашей основной целью, а не замечательные публикации, которые в том числе представил соискатель.

На мой взгляд, еще раз говорю, как человек, который смотрел со стороны на это дело, с такой практической стороны, были использованы очень современные различные методы. Притом мне понравилось то, что...это были как бы даже такие разные методы. И еще я хотел бы отметить, что вот в самой диссертации, возможно, это в меньшей степени попало в автореферат, но в самой диссертации, она не просто проводит расчетные методы и говорит, что это таким вот образом получилось, а то, что она практически на каждой странице пытается обсудить. Вот это вот очень-очень хорошо, и это как раз отличает то, что это докторская диссертация, а не кандидатская. В кандидатской диссертации достаточно было бы создать модель, показать, что это вот действует так. Ну и хорошо. Вот соискатель в данном случае пошел на то, что он пытается всякий раз обсудить, вот что получилось и почему это хорошо или почему это плохо. Можем мы это использовать или не можем. Это безусловная заслуга данной диссертации. Я бы сказал, что количество научных статей, которое приведено, оно достаточно для докторской диссертации, что все современные концепции и методики...именно почему было интересно, почему я действительно прочитал всю диссертацию целиком, потому что это очень сильно комплексное научное исследование. Конечно, безусловно, мне было приятно, что я был знаком, слава богу, со всеми участниками. Кто помогал, очевидно, Софии Станиславовне, Володя, Нариман, Ольга, чьи объекты она использовала и так далее. Поэтому создание именно такой комплексной работы, которая бы граничила из химии, из биологии, из

медицинской химии, разные уровни вот этого исследования, это очень большой плюс и достижение, собственно говоря соискателя.

Ну, по поводу искусственного интеллекта проверки я уже сказал. То есть, я не знаю, сейчас, по-моему, считается, что это большой плюс. То есть, ни в коем случае не надо пытаться исправить все запятые, потому что, если нет ни одной опечатки, ну, значит, гарантированно, что у вас она была проверена. Я так понимаю, что я должен обязательно зачитать вопросы по протоколу.

У меня их действительно много, но это «много» не потому, что я там сильно злой, но это, может быть, тоже есть, но потому что я действительно прочитал диссертацию целиком. Замечание к литературному обзору, но это именно с точки зрения медицинской химии, да, конечно, каждый из тех, кто работает полностью в медицинской химии, в голове помнит, огромное количество всяких структур, и когда ты смотришь на что-нибудь, тебе сразу кажется, о, это же вот оно. Вот мне тоже показалось, что соединение 23 — это классический пример ингибитора нуклеопротеина, вируса гриппа. Вот, поэтому как бы с высокой долей вероятности можно утверждать, что у него там два механизма, либо там еще как-то. Вот. То, что оно взаимодействует с гемагглютинином, ну, возможно, что две мишени, но лично для меня, конечно, это как бы сомнительно. И это как раз часть литературного обзора, поэтому мне было бы, например, приятно, если бы соискатель в литературном обзоре как раз обсудил этот момент, но в данном случае этого не было.

То, что потерялись противоионы в случае присутствия положительного атома азота, это допустимо для математика и недопустимо для химика. В разделе, посвященном вирусу Эболу, в литературном обзоре потерялся тилорон, который у нас производится, который действительно обладает активностью против вируса Эбола и близок к проведению уже второй фазы клинических испытаний, но она не состоялась из-за войны.

Второй вопрос, соответственно, в разделе 3.1.1 подробно обсуждается фармакофорный профиль сайта связывания умифеновира, но отсутствует детальное сравнение данных молекулярного моделирования и экспериментальных данных для умифеновира по ссылке [25]. Действительно, есть такая замечательная статья, София Станиславовна неоднократно упоминает эту самую статью, в которой вроде как приведены данные о том, каким образом умифеновир связывается с гемагглютинином, действительно эта статья вызывает огромное количество вопросов. Но так и надо было

написать диссертацию, что я считаю, что в статье получено большое количество ошибок и так далее, и так далее. Нечего в это стесняться. Автор постеснялся.

В разделе 3.1.2.1 автор пишет, что эксперименты по времени добавления показывают, что агент-103 подавляет репликацию вирусов в первые часы заражения, позволяет рассматривать гемагглютинин в качестве потенциальной биологической мишени. Это утверждение выглядит сомнительным для меня. Потому что точно такой же эффект будет наблюдаться в случае взаимодействия вещества с клеткой хозяина. Механизм, препятствующий дальнейшему прикреплению вируса к стенке. Общая тенденция сейчас заключается в том, что, когда мы говорили о прямом механизме действия, как это здорово, как это хорошо, сейчас это ушло. Если вы посмотрите все последние конференции, все последние международные публикации. Прямой механизм действия — это очень здорово, но коллега говорил, что достаточно быстро разорвется резистентность. Вот поэтому, во-вторых, все-таки мы не можем с очень большой скоростью найти и пройти все необходимые процедуры для создания нового лекарственного препарата каждый раз. Поэтому сейчас как бы обратно откатывается эта волна, и все говорят, что необходимо искать некие соединения, имеющие более универсальные механизмы, и один из таких механизмов, который рассматривается, это когда соединение взаимодействует не с вирусом, а взаимодействует с клеткой хозяина, и при этом оно препятствует присоединению вируса к клетке, и как бы реализуется некий тот же механизм.

Четвёртый вопрос. На странице 117 автор делает попытку объяснения разной активности для производных бензо[*d*][1,3]дитиолового скаффолда. При этом углублённому анализу подвергаются достаточно удалённые по структуре соединения, в то время как напрашивается провести детальное сравнение с более близкими, 115, 116, которые структурно очень близки, но принципиально отличаются по активности. Я бы, например, сделал так.

Пятый вопрос. В главе 3.1.4 автор очень интересно рассуждает и приводит расчётные данные о возможном влиянии pH-среды на конформационные состояние гемагглютиниана камфецин-резистентного штамма. Действительно, очень интересный раздел, очень хорошо написан. Понятно, что какие методы использованы, и что в результате соискатель при этом находит и обсуждает, но было бы очень привлекательно привести несложную экспериментальную работу с разными pH и сравнить полученные данные с регулярным моделированием. Вот здесь сидит товарищ, который мог бы это сделать.

Соответственно, вопрос шестой. На странице 156 автор пишет, что не оставляет сомнений гемагглютинин – мишень камфецина. Ну, мы уже говорили, и, собственно говоря, соискатель в своём докладе сказал, что да, конечно, хотелось бы иметь рентгеноструктурный анализ, но вот я так понимаю, что он конкурирует с Вектором, да, что у них это делается, мы тоже пытаемся это сделать, вырастить кристаллы. Если у нас получится раньше вас, мы вам скажем и пригласим вас прийти к нам с камфецином.

Вопрос седьмой. В разделе 3.2.1, посвящённом поиску места связывания умифеновира, нет обсуждения опять с пресловутой статьёй [25] по списку литературы, хотя она упоминается. Аналогично хотелось бы видеть обсуждение на странице 180 данных статьи [300] по списку литературы, где как бы сравнение молекулярного моделирования именно с литературными данными. Поэтому я бы как раз сказал, если в авторефератах многие делали замечания, что вот там непонятно, что берёт автор своё, а что берёт из литературных источников, я бы сказал, что у меня по прочтению диссертации сложилось обратное впечатление, что автор уж чересчур только всё своё берёт, а всё там чужое как-то упоминает, но...не очень.

Вопрос восьмой. Правильность выбора сертралина как референс соединения вызывает у меня сомнения. В литобзоре описаны 9 соединений, есть более активные, однако по непонятной для меня причине в главе 3.4, ингибирующая активность малых молекул в отношении вирусов Эбола, в качестве референс-соединения выбран именно сертралин. Отсутствует сравнительное описание расчетных данных биологических экспериментов. Ссылка [163] по списку литературы упоминается, но хотелось бы видеть детальный анализ сравнения расчетных экспериментальных данных. Ну, как я уже сказал, Софья Станиславовна безусловно, предпочитает свои собственные данные, чем данные других исследователей.

И последний, девятый вопрос. Это, собственно говоря, не вопрос, а некий просто комментарий, и оно не требует ответа соискателям. Представляется, что работу сильно украсили рассуждения об общности белков слияния разных вирусов, как результат эволюции, так как все они нацелены на одну и ту же клетку хозяина, и, как следствие, возможность получения противовирусного препарата широкого спектра действия.

Вот в докладе был представлен, я, к сожалению, не записал какой-то номер слайда, когда были представлены разные белки излияния, и действительно по прочтению диссертации возникает полное впечатление, что автор исследуют белки

слияния разных групп вирусов. Это всегда удивительно. Меня всегда настораживает, когда мне говорят, о, наше вещество действует и от такого вируса, и от такого вируса, и от такого вируса. Сразу возникает впечатление, что тут не то, как это может быть. Оказывается, это действительно может быть. Именно это понимание дало мне прочтение этой самой диссертации. Вот эта, вот картинка.

Получается, что поскольку мишень одна и она мутирует один миллион лет, то чисто эволюционно вирусы из разных групп, они вырабатывают примерно один и тот же механизм действия. И именно один и тот же механизм слияния, несмотря на то, что это вирусы разные. И именно это продемонстрировано в представленной на наше обсуждение диссертации. Поэтому я бы сказал, что, если бы я писал бы эту диссертацию, я бы просто сделал это последним выводом, что в результате прочтения этой диссертации и в результате проделанной работы именно математического анализа вот разных процессов слияния разных вирусов с клеткой, при этом я бы сказал, что вещества, в данном случае малые молекулы, используются в большей степени как инструмент для изучения этого процесса, то это как бы такой основной докторский вывод из всего проделанного соискателя, что действительно в результате эволюции появились некие общие механизмы, а раз есть общие механизмы, значит, мы вполне вправе себя думать, каким образом создать соединение, обладающее широким спектром активности против разных этих самых вирусов.

Это действительно большая фундаментальная заслуга, которая отличает именно докторскую диссертацию от кандидатской диссертации.

Все мои замечания не носят принципиального характера, это можно, что называется, долго упорно дискутировать, прав я или нет, возможно, что я действительно в целом ряде неправ, но в итоге я хотел бы сказать, что диссертационная работа Борисевич Софьи Станиславовны «Алгоритмы описания механизмов противоположной активности ингибиторов мембранных вирусных белков методами молекулярного моделирования» по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности, научной новизны, о практической значимости, безусловно, удовлетворяет требованиям ВАК РФ предъявляемым докторским диссертациям: пункт 9. Положение о порядке присуждений ученых степени, утвержденного постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года, номер 842, а ее автор Борисевич София Станиславовна заслуживает присуждения ученые степени доктора химических наук по специальности 1.4.16 Медицинская химия. Членов ученого совета я призываю проголосовать за, поверьте моему слову и тому, что я прочитал целиком диссертацию.

Эта диссертация достойна для того, чтобы называться докторской диссертацией. И это первое. И второе, мы очень нуждаемся в молодых, задорных докторах наук в нашей стране. Спасибо.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо большое, Вадим Альбертович. Софья Станиславовна.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо за вопросы, за такой отзыв. Итак, первый вопрос. (1) Возможно. В указанной статье соединение 23 или IY7640 рассматривается исключительно как ингибитор гемагглютиниона. Авторы получили резистентный к этому соединению штамм вируса гриппа. Секвенирование позволило обнаружить устойчивые мутации L49I, E447K, расположенные в стеблевой части гемагглютиниона. Дополнительно, авторы указанной статьи ссылаются на результаты эксперимента по времени добавления, согласно которым соединение активно в первые часы заражения, а также на тот факт, что это соединений не ингибирует гемагглютинирующую активность резистентный штамм вируса гриппа этого соединения, в отличии от штамма H1N1 дикого типа. Молекулярное моделирование, проведенное авторами, демонстрирует высокую аффинность соединения 23 к гидрофобной полости связывания, расположенной в области гептадных повторах. Другими словами, в данной статье, соединение 23 рассматривается, прежде всего, в качестве ингибитора гемагглютиниона. Хотя, этот факт совершенно не исключает возможного мультитаргетного действия IY7640.

С этим замечанием согласна. В обзоре, прежде всего, рассматривались результаты молекулярного моделирования. Как правило, докинг или молекулярную динамику проводят с лигандом, в той форме, в которой он может связываться с сайтом связывания (например, в качестве заряженного иона), исключая при этом противоионы. Они просто из расчета убираются. Но, структуры соединений, конечно, должны быть указаны с противоионом.

Следующий. Тилорон является синтетическим индуктором интерферона. Он связывается в большой борозде ДНК, предположительно конкретных генов, каких до сих пор неизвестно. При анализе научной литературы, посвященной ингибиторам гликопротеина вируса Эбола, информация о том, что тилорон может подавлять функцию гликопротеина, не была найдена. Поэтому его в литобзоре нет.

Второй вопрос (2). Анализ фармакофорного профиля сайта связывания *трет*-бутилгидрохинона/умифеновира в гемагглютанине был проведен на основании данных о пространственных структурах комплексов *трет*-бутилгидрохинон-гемагглютинин и умифеновир-гемагглютинин, расшифрованных методом РСА и депонированных в базу данных Protein Data Bank. На данный момент геометрические параметры комплекса S-белок-умифеновир, полученные какими-либо экспериментальными методами отсутствуют в базе данных. По этой причине был проведен анализ и сравнение фармакофорных профилей сайтов связывания умифеновира в гемагглютанине вируса гриппа и в S-белке SARS-CoV-2, расположенных в области гептадного повтора. Речь идет о рисунке 3–51. Ссылка [25] соответствует публикации, в которой авторы рассматривают N-циклогексилтаурин, который, согласно экспериментальным данным, может связываться в рецептор-связывающем домене гемагглютинаина и в стеблевой части белка. Опять же есть пространственные структуры лиганд-белкового комплекса, депонированного в базу данных. В нашем случае, экспериментально и на основании анализа научной литературы показано, что умифеновир может связываться только в стеблевой части гемагглютинаина. Как сравнивать их достаточно сложно.

Третий (3). Здесь, да. Помимо эксперимента по времени добавления проводился прямой фузогенный анализ, который продемонстрировал дозозависимую активность агента 103 в отношении фузогенной активности гемагглютинаина. Результаты биологического эксперимента приведены в соответствующей публикации. Безусловно, этот факт следовало указать в тексте диссертации при обосновании выбора биологической мишени. Это просто упущение.

(4) Выбор соединений 116 и 117 на самом деле больше основывался на значении индекса селективности, потому что обычный индекс селективности считается предопределяющим для выбора активных соединений, хотя да, конечно, все эти соединения схожи, но тем не менее у них общий структурный скаффолд, поэтому с точки зрения расчётов вообще можно было бы все три посмотреть соединения.

(5) Здесь согласна с замечанием-комментарием, но такой эксперимент провести можно. Я даже знаю, кто может его сделать.

Шестой вопрос (6). В данный момент проводится экспериментальная работа по поиску условий кристаллизации комплекса гемагглютинаина с камфецином, с целью дальнейшего исследования полученных кристаллов методами РСА. При этом необходимо отметить, что кристаллизация лиганд-гемагглютинин (или любой другой

поверхностный вирусный белок) задача достаточно нетривиальная, ввиду значительных размеров белков.

С седьмым вопросом согласна (7), это можно было сделать.

Восьмой вопрос (8). Сертралин это вещество с известной антифиловирусной активностью. Он ингибирует репликации разных типов вируса Эбола. В работе [163] проводился один из способов анализа связывания лигандов в сайте. При этом рассматривались геометрические параметры лиганд-белковых комплексов, расшифрованных РСА методом. Цель же исследования, изложенного в разделе 3.4, сводилась прежде всего к описанию механизма противовирусного действия рассматриваемых монотерпеноидов. Внимание уделялось больше энергетическим параметрам связывания в совокупности с расположением лиганда в полости связывания. Полученных данных оказалось достаточно для описания механизма противовирусного действия исследуемых соединений. Конечно, детальный анализ был бы в этом случае нелишним, как дополнительный.

Ну и, хоть и на девятый вопрос (9) просили, не отвечать, тем не менее, позвольте все же ответить. Известно три типа белков слияния, которые принципиально различаются по структуре и функциональным признакам. В диссертационной работе описан механизм слияния поверхностных белков I типа, к которым относятся грипп, коронавирусы, вирусы Эбола и другие патогенные вирусы. Анализ результатов теоретических расчетов и экспериментальных данных позволяет предположить, существование соединений, которые могли бы ингибировать фузогенную активность ряда поверхностных белков I типа, и как следствие, проявлять противовирусную активность широкого спектра. Конечно, невозможно гарантировать существование подобных соединений, но, по крайней мере, в данной диссертационной работе описан первый успешный шаг в поиске подобных препаратов. К сожалению, методами молекулярного моделирования невозможно учесть эволюцию. Возможно, в будущем мы могли бы использовать искусственный интеллект и машинное обучение, чтобы поискать ответ, или хотя бы обсудить этот вопрос.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо. Вадим Альбертович, удовлетворены? Спасибо.

Тогда переходим ко второму оппоненту. Хлебников Андрей Иванович, доктор химических наук, профессор, научно-образовательного центра имени Кижнера,

Инженерной школы новых производственных технологий, город Томск. Он участвует в нашем заседании дистанционно. Андрей Иванович, вы слышите?

Официальный оппонент – д.х.н. Хлебников Андрей Иванович

Да, слышно прекрасно и видно.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Мы вас слышим.

Официальный оппонент – д.х.н. Хлебников Андрей Иванович

Уважаемые коллеги, добрый день. Прежде всего я должен сказать, что у меня сложилось очень хорошее впечатление и о самой работе, и о докладе соискателя, о том, как она отвечала на вопросы.

Прежде всего скажу в своем вступлении об актуальности диссертационной работы. При разработке новых эффективных противовирусных агентов необходимо понимание механизмов возникновения противовирусной активности, поэтому изучение этих механизмов требует широкого применения методов молекулярного моделирования, особенно при современном весьма обширном объеме имеющихся экспериментальных данных о пространственных структурах вирусных белков. В связи с этим исследования, выполненные Софией Станиславовной, являются весьма актуальными, поскольку они направлены на разработку общих вычислительных подходов к описанию взаимодействий малых молекул с вирусными белками.

Работа построена по классической схеме, состоит из введения, трех блоков, выводов, весьма обширного и полезного приложения и списка цитируемой литературы. Первая глава диссертации представляет собой литературный обзор, в котором приводятся основные характеристики вирусных белков слияния, типичные сайты связывания для ингибиторов этих белков: протонного канала вируса гриппа и некоторых других биомиметов. Рассматриваются методы молекулярного моделирования, используемые для анализа структуры белков, при взаимодействии с малыми молекулами. Автором систематизированы литературные данные об основных этапах процесса слияния вирусных и клеточных мембран, что весьма важно для последующего восприятия тех совершенно разнообразных, как уже отмечалось, результатов автора, изложенных в диссертационной работе. Значительное внимание в обзоре уделено, в частности, современному состоянию в области разработки ингибиторов, взаимодействующих с различными сайтами S-белка коронавируса SARS-CoV-2.

Литературный обзор, как и вся диссертация, очень хорошо иллюстрирован, представляет собой самостоятельную научную ценность для ознакомления со структурой и функциями вирусных белков. Ну, действительно, в литературе, на мой взгляд, довольно сложно найти столь детализированный и, вместе с тем, компактный обзор о структурах и функциях вирусных белков, которые являются объектами исследования данной диссертационной работы. Вторая глава работы содержит описание методов и объектов исследования, приводятся способы и подходы подготовки структур белков и лигандов с учетом pH среды для последующих этапов молекулярного моделирования. Применяемые автором методы являются современными и надежными, что позволяет говорить о высокой достоверности полученных автором результатов. В третьей главе диссертационной работы приводится описание результатов, полученных при выполнении исследований. С вашего позволения я не буду перечислять все, что написано у меня в отзыве по поводу этой главы, тем более после столь исчерпывающего выступления, детализированного выступления Вадима Альбертовича. Отмечу, что весьма объемные и тщательные вычислительные эксперименты, выполнены Софией Станиславовной при исследовании различных сайтов связывания, расположенных на гемагглютанине и M2 канале вируса гриппа. Сделано предположение о том, что механизм противовирусного действия умифеновира в отношении SARS-CoV-2 аналогичен механизму ингибирования вируса гриппа и может заключаться в затруднении конформационных перегруппировок поверхностного белка.

Изучена ингибирующая активность малых молекул в отношении поверхностного F-белка РСВ, ортопоксвирусов, вируса Эбола. При этом, в частности, были рассмотрены возможности методов молекулярной динамики объяснить разную противовирусную активность различных стереоизомеров. Здесь я хочу отметить, что я с большим удовольствием прочитал статью, которая вышла в журнале структурной химии в этом году, как раз посвящённая молекулярно-динамическим исследованиям стереоизомеров. Предложена фармакофорная модель ингибитора белка p37. В заключении главы 3 сформулированы общие рекомендации для применения методов молекулярного моделирования в отношении вирусных белков.

Далее я буду дословно зачитывать более официальную, так сказать, часть своего отзыва. Выводы диссертационной работы научно-обоснованы и не вызывают сомнений. Полученные результаты в достаточной мере опубликованы в печати и представлены в докладах на конференциях.

Автореферат соответствует содержанию диссертации. Работа обладает несомненной научной новизной, поскольку представляет собой пример творческого обобщения большого массива полученных расчетных и экспериментальных данных, важных для целенаправленного поиска противовирусных агентов. Сформулированные автором общие рекомендации для эффективного применения методов молекулярного моделирования имеют также высокую практическую значимость при разработке инновационных лекарственных препаратов.

Ну и, как всегда, в любой диссертации есть к чему придраться, так сказать. Я немножко утрированно так называю. Замечания у меня тоже есть. Четыре замечания я отметил в своем отзыве. Первое. Среди квантово-технических программ, использованных в диссертации для подготовки лигандов упоминается «GAUSSIAN-09». Следует отметить, что современной версией этого программного пакета является «GAUSSIAN-16». То есть хотелось бы услышать, почему использовалась весьма устаревшая версия.

Второе замечание. На странице 87 диссертации отмечается процедура, я цитирую: «процедуры молекулярного докинга были проведены для обеих форм, протонированных или нет, если их соотношения были равные» – конец цитаты, то здесь вот не совсем понятно, что под этим понимает автор. В точности равное соотношение концентраций протонированной и депротонированной форм, либо всё же концентрации одного порядка. Вот в каком случае для обеих форм была проведена процедура молекулярного докинга?

Следующее, третье замечание в отзыве по поводу главы 2. Не указано, какое программное обеспечение использовалось для симуляции методами молекулярной динамики. Но на слайде я, кстати, заметил, там промелькнуло что-то, Desmond. В этом замечании своем задаю вопрос, применялся ли соответствующий модуль Desmond, входящий в пакет Schrodinger, либо какая-то другая программа? В принципе, я там из слайдов ответ уже получил на этот вопрос.

Автор отмечает, это вот четвертое мое замечание, что для дополнительных, опять цитата: «для дополнительных биологических исследований был выбран агент 173, для которого были проведены прямые анализы проверки влияния соединения на рецептор-связывающую и фузогенную функции гемагглютинаина» – конец цитаты. И на странице 146 диссертации, хотя в работе и другие аналогичные фразы встречаются в некоторых местах. Надо сказать, что можно из прочтения работы понять, что эти эксперименты были сделаны самим автором, но в главе 2, то есть в экспериментальной

части, так назовём эту главу, не приводятся методики этих биологических исследований, тоже относятся к экспериментально определённым значениям константа диссоциации pK_a , например, на странице 121, такие константы приводятся. Но отмеченные недостатки не являются принципиальными, не снижают общее положительное впечатление о работе. На основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области медицинской химии, позволяющее целенаправленно конструировать биологически активные соединения, перспективные в качестве лекарственных кандидатов. По научной новизне, актуальности, теоретической и практической значимости, полноте содержания и обоснованности выводов, диссертационная работа полностью соответствует требованиям пункта 9 положения о присутствии учёной степени, предъявляемых к диссертации на соискании учёной степени доктора химических наук. Её автор Борисевич София Станиславовна заслуживает присуждение учёной степени доктора химических наук, специальности 1.4.16, медицинская химия. Спасибо.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо большое, Андрей Иванович. Софья Станиславовна?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо за отзывы, за вопросы. Да (1), действительно, вы абсолютно правы, однако все теоретические расчёты проходили в Уфимском институте химии, а у нас на кластере официальная версия Gaussian C09. А C16 нет.

Второй вопрос (2). Использование уравнение Гендерсона-Хассельбаха позволяет оценить численное соотношение протонированных и депротонированных форм лигандов. Это не концентрационные соотношения. На стр. 227 есть подробный пример. Цитирую: «Согласно уравнению Гендерсона-Хассельбаха, соотношение депротонированных и протонированных форм соединения 218 составляет 89 к 1. Для агента 219 это соотношение равно 1 к 100, а для эфира 220 – 12 к 1. При выборе оптимального значения докинг-решения соотношение депротонированных и протонированных форм было учтено, и выбор был сделан либо в пользу той формы, содержание которой вероятнее, либо было рассчитано средневзвешенное значение энергетических параметров связывания.»

Да, действительно (2) был указан пакет Schrödinger Small Molecules Drug Discovery входит только одна программа для проведения молекулярно-динамических

симуляций – это Desmond. В любом случае я согласна с замечанием, следовало указать в разделе 2.5. Молекулярная динамика и метадинамика.

В диссертационной работе приводятся методики только теоретических расчетов, проведенных лично автором. Биологические и аналитические эксперименты проводились коллегами-вирусологами. В публикациях экспериментальные методики все приведены. Но в диссертации: это не моя работа, поэтому их там нет.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Андрей Иванович, вы удовлетворены?

Официальный оппонент – д.х.н. Хлебников Андрей Иванович

Да. Я удовлетворен полностью. Спасибо.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо, что смогли принять участие в защите. И третий оппонент Поройков Владимир Васильевич, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории структурно-функционального конструирования лекарств научно-исследовательского института биомедицинской химии им. Ореховича, город Москва. Он по уважительной причине, к сожалению, не смог принять участие в сегодняшней защите. Но, он прислал положительный отзыв, который читает Эльвира Эдуардовна.

Врио ученого секретаря диссертационного совета – д.х.н. Щульц Эльвира Эдуардовна

Да, отзыв у нас имеется в деле, и, в общем, отзыв достаточно большой. Отзыв начинается с актуальности и практической значимости проведенных Борисевич исследований, которые не вызывают сомнений, поскольку поиск и разработка более безопасных и эффективных противовирусных препаратов широкого спектра действия является крайне важной задачей, учитывая недавний опыт пандемии.

И далее дается такой небольшой комментарий. Появление свободно доступного программного обеспечения для молекулярного докинга и наличие компьютерных ресурсов, необходимых для выполнения соответствующих расчетов, привело к лавинообразному росту работ в этой области. Нередко, выполняющие компьютерные расчеты, исследователи не владеют физико-химическими основами молекулярного моделирования взаимодействия лигандов с мишенями, не осознают возможности и ограничения подхода *in silico* и во многих случаях не проверяют полученные результаты расчёта с биологическими экспериментами. Особенно ярко это проявилось

в период пандемии COVID-19 когда множество таких работ публиковалось в ускоренном темпе, и при этом надежды возлагались на использование искусственного интеллекта, молекулярного моделирования, суперкомпьютеров для быстрого обнаружения необходимых терапевтических средств для борьбы с инфекцией с SARS-CoV-2. Поиск дает примерно 14 тысяч работ. Многие, если не большинство, из этих исследований предлагают перепрофилировать известные лекарства, которые, согласно прогнозам, имеют аффинность по отношению к одной из мишени коронавируса, преимущественно к главной протеазе вируса SARS-CoV-2. В большинстве случаев предсказания не сопровождаются экспериментальными доказательствами. Некоторые авторы выражали уверенность, что массовые вычислительные исследования, предсказывающие связывание между определенными молекулами лекарств и вирусными мишенями с высокой аффинностью, можно приравнять к экспериментальным доказательствам. Однако, с течением времени, значительный ажиотаж в начале пандемии, связанный с надеждой на методы компьютерного дизайна, сменился разочарованием и критикой. Учитывая данный комментарий, необходимо подчеркнуть, что диссертационная работа Борисевич основана на большом личном опыте практического применения методов молекулярного моделирования к поиску и разработке противовирусных соединений в сотрудничестве с химиками и фармакологами, что обеспечило экспериментальную проверку полученных *in silico* результатов, имеет особенно важное значение. Далее дается описание работы, которое разложено на 332 страницах машинописного текста, и включает 325 цитируемых источников. Рукопись построена на традиционной схеме, состоит из введения, литературного обзора, методов, объектов исследований, результатов и выводов. Дополнительно приставлен список сокращений и предложений. Я не буду главы все перечислять. Здесь перейдём, наверное, сразу к вопросам, которых тоже много. Вопросов семь.

Вместе с тем, как всякое большое исследование, рецензируемая работа не лишена определенных недостатков. На стр. 79 читаем: «Структурно-ориентированный дизайн лекарств (в англоязычной литературе используется аббревиатура SBDD – Structure-Based Drug Design) широко используется в медицинской химии и представляет собой итеративный или циклический процесс, результатом которого является создание лекарственного препарата, готового к клиническим испытаниям». Это спорное учреждение – на этом этапе результатом является выявление фармакологически активного вещества, безопасность которого должна быть

исследована в доклинических испытаниях. Неудивительно, что далее в изложении этапов исследований доклинические испытания безопасности по системе GLP не упоминаются совсем.

Второе замечание. В разделе 1.5. «Заключение» следовало бы резюмировать в одном абзаце основные методологические проблемы, решению которых посвящена диссертационная работа.

В разделе 3.1.1 и далее диссертант использует как синонимы два термина «умифеновир» и «арбидол». Это не синонимы: умифеновир – наименование фармакологически активной субстанции, для которой, собственно, и осуществляется моделирование, а арбидол – торговое наименование лекарственного препарата.

Четвёртое. Диссертант систематически использует термин «агент» для идентификации изучаемых веществ – лучше было бы сказать: «соединение».

На стр. 244 читаем: «К сожалению, такая рекомендация не может учитывать общую токсичность соединений» – следовало бы пояснить, что понимается под «общей токсичностью».

Далее шестое замечание. На стр. 277 читаем: «Теоретически, ингибируя любой вирусный белок малыми молекулами, можно подавить вирусную инфекцию». Это не совсем так, известен ряд примеров, когда малые молекулы, ингибирующие рекомбинантные белки вируса в экспериментах *in vitro*, не подавляют репликацию вируса в клетке.

Седьмое замечание: В работе имеется некоторое количество опечаток и неудачных выражений, например, «Результаты подобного моделирования позволяют осознать форму полноразмерного S-белка» – лучше было бы сказать: «оценить»; «... результаты молекулярно-динамических симуляций...» – лучше было бы сказать: «... результаты моделирования методами молекулярной динамики взаимодействия ...»; «1.3.2. Высококонсервативный мембранный белок ортопоксвирусов» – правильно: «ортопоксвирусов»; «первичная аминокислотная последовательность» – правильно: «аминокислотная последовательность» или «первичная структура»; «подготовка протеина» – лучше было бы сказать: «белка»; «Выбор оптимальной докинг позиции» – лучше было бы сказать: «Выбор оптимального сайта связывания лиганда»; и т.д.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Основные положения, выводы и результаты диссертационной работы корректны и научно обоснованы. Диссертационная работа соответствует специальности 1.4.16 – Медицинская химия по пунктам: установление молекулярных

мишеней и исследование химических аспектов молекулярного механизма действия лекарственных препаратов; выявление взаимосвязей между химической структурой и физиологической активностью. По достоверности и новизне, актуальности, научно-методическому уровню и практической значимости полученных результатов диссертация Борисевич отвечает требованиям ВАК (пункт 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденные Постановлением Правительства Российской Федерации от 23 сентября 2013 года номер 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук по специальности 1.4.16. – Медицинская химии, а сам диссертант заслуживает присвоения искомой ученой степени.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо. Софья Станиславовна?

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Спасибо (1). Первое замечание. Согласна. Безусловно. Действительно в рамках данного исследования были описаны механизмы противовирусного действия фармакологически активных веществ. В то же время важно отметить, что без понимания механизма действия новых биологически активных соединений, выбранных в качестве кандидатов для доклинических, а в дальнейшем и клинических исследований обойтись невозможно.

Второе (2). Согласна с замечаниями. Необходимо было более четко указать методологические проблемы. Основная проблема, это отсутствие комплексного подхода при использовании методов молекулярного моделирования и обоснованного выбора этих методов. Например, механизм биологической активности описывается только на основании результатов молекулярного докинга, что не совсем корректно.

Согласна с третьим (3) замечанием. Следовало указать «умифеновир».

Здесь (4) слово «агент» использовался в качестве синонима, с целью избежать тавтологии.

С пятым (5) замечанием также согласна. Присутствует терминологическая ошибка. Имелось в виду «цитотоксичность».

Шестое (6). Безусловно, тот факт, что малая молекула ингибирует функцию какого-либо вирусного белка напрямую не означает, что эта молекула будет подавлять репликацию вируса. Вирусная репликация в клетке – процесс гораздо более разносторонний и многофакторный, чем просто активность одного вирусного белка. В

первую очередь это может быть связано, с тем фактом, что в процесс репликации вируса задействовано множество белков и вирус для размножения может использовать различные пути и вовлекать как вирусные, так и клеточные белки для размножения. В то же время, есть определенные вирусные белки, критически важные для репликации. По этой причине в тексте используются слова, которые придают вероятностный характер событиям, такие как «теоретически» и/или «можно, возможно».

С данным замечанием, седьмым (7), согласна частично. По сути, смысл молекулярно-динамической симуляции, моделирования методами молекулярной динамики — это одно и то же. В «ОртопокСвирусов» потерялась буква «С». И третье выражение: «Выбор оптимальной докинг-позиции» означает выбор оптимального расположения лиганда в сайте связывания. А выражение «Выбор оптимального сайта связывания лиганда» обозначает определение полости связывания в том или ином белке. Эти два выражения имеют разный смысл. Всё. Спасибо.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо. С вступлением оппонентов и ответом на вопросы мы закончили. Пришло время общей дискуссии. Да, Нариман Фаридович.

Член совета – д.х.н., член-корр. Салахутдинов Нариман Фаридович

Я являюсь многократным соавтором Софьи Станиславовны, поэтому достаточно глубоко посвящен в эту тематику. И, что хотелось бы отметить. На два момента хотелось бы обратить внимание. Но, один момент более общий. Скажем так, вот сейчас мы наблюдаем эволюцию, вот этого молекулярного моделирования, которая пошла от некоего описательно-украшательного момента в наших работах, то, что мы называли «бантиками», вообще говоря, к предсказаниям. И вот это очень важно, и вот как раз эта работа, вот она стоит именно на этом пути, впереди, скажем так, вот этого паровоза, который летит. И для химиков – медицинских синтетиков, коими мы являемся, это очень важно, потому что особенно это важно, когда мы вообще не знаем с чего начать. Когда у нас какая-то новая проблема, новый вирус, новая вообще патология какая-то. И нам нужно понимать, у нас огромное количество соединений, даже классы соединений огромные. В этом плане очень важно, когда нам расчетчики говорят, идите вот туда, возьмите вот это, и начинают постепенно сужать, сужать, и в конце концов нам, это такое большое-большое подспорье, нам меньше работы, меньше работы вирусологам и вообще биологам. Это первый момент, очень важный и положительный, и эта работа одна из первых в стране вот в таком плане.

Второе, более, скажем так, утилитарный момент. Это то, что я узнал от Вадима Альбертовича, что наконец-то с механизмами можно теперь уже считать, и то, что, София Станиславовна, взяла, допустим, камфецин, многие здесь знают, а многие и нет, что камфецин прошел полностью доклинические испытания, значит, он разрешен Минздравом Российской Федерации к клиническим испытаниям первой фазы, и взятие вот этой молекулы в качестве объекта исследования, оно будет очень сильно помогать и дальше. Мы всегда можем ссылаться, что это молекула была сделано так, вот так. Ну, и гинсамид чуть-чуть подальше стоит даже в практике, а камфецин, прямо скажем, уже у дверей. Мы очень сильно надеемся, что мы так эту дверь все-таки откроем. Поэтому вот момент, я считаю, очень важным и очень полезным и для соискателя, и для коллег его, то есть нас.

Но еще одно маленькое замечание к замечанию Владимира Васильевича Поройкова. Здесь у него было такое замечание, «агент» – «соединения». Все-таки я считаю, что София Станиславовна правильно взяла, потому что все-таки «соединение», на мой взгляд, называется просто «химическое соединение». Как только мы его берем биологическую разработку, мы уже называем его агентом. А здесь, так как у нее были соединения с биологической активностью, поэтому я считаю, что то, что вы взяли «агент», так это абсолютно правильно. У меня всё. Спасибо.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо. Кто-нибудь ещё хочет выступить?

Член совета – д.ф.-м.н. Багрянская Елена Григорьевна

Как вы знаете, у нас появились в ученом совете эта специализация. Это первая докторская диссертация по специализации «Медицинская химия». С моей точки зрения, это блестящая диссертация, в которой сделан следующий шаг. Мы только что говорили о том, что если раньше относились как-то так, то теперь, это действительно то, что существенно помогает нашему отделу медицинской химии продолжать исследования и разрабатывать новые молекулы и опираться, делать их вместе с моделированием. Мне кажется, что во всех отзывах и в том, как диссертант отвечала на все эти вопросы, видно было, что это реально очень высокого класса ученый. Поэтому я призываю всех. Знаете, что, это великолепная диссертация, и мы призываем всех голосовать «за». Мне кажется, что это очень высокого качества работа. И это очень приятно, что она защищается в стенах нашего института. И я уверена, что в будущем будет целый ряд работ совместно с отделом Нариман Фаридовича. Успехов больших.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо. Еще желающие? Наверное, достаточно. А, Нариман Фаридович... ..

Член совета – д.х.н., член-корр. Салахутдинов Нариман Фаридович

Я про призыв-то, забыл сказать. Я тоже призываю.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

На мой взгляд, мы заслушали большую качественную работу, которая показала, что плотное и продуктивное сотрудничество биологов и расчетчиков позволяет действительно добиться серьезного прогресса и помочь нам, химикам, с пониманием, куда надо двигаться. Это такая важная и методологически полезная работа. Я буду голосовать «За» это призываю остальных членов диссовета поступить так же. Но сейчас слово предоставляется Софье Станиславовне, заключительное.

Соискатель – к.х.н. Борисевич София Станиславовна

Ну, прежде всего, конечно, я хочу Вас поблагодарить за то, что вы послушали мою диссертацию. Прежде всего я благодарна своим научным консультантам д.х.н. Ольге Ивановне Яровой и д.б.н. Владимиру Викторовичу Зарубаеву за поддержку, за внимание, за постоянную помощь и бесценный опыт. Я должна здесь обязательно сказать о своем первом Учителе, это Янборисов Валерий Марсович. Он меня учил и привил любовь к вычислительной химии. Дополнительно, я благодарю заведующего лабораторией химической физикой УФИХ РАН профессора Сергей Леонидовича Хурсана. В своё время, много-много лет назад он познакомил меня с квантовой химией. Я благодарна своим коллегам Эдуарду Маратовичу Хамитову и Максиму Алексеевичу Гурееву за помощь в проведении ряда молекулярно-динамических симуляций. Искренняя благодарность коллегам из Новосибирского института органической химии: член-корреспонденту РАН Нариману Фаридовичу Салахутдинову, Константину Петровичу Волчо, Анастасии Соколовой.

Отдельная благодарность директору НИОХ СО РАН Багрянской Елене Григорьевне за возможность защититься здесь первой по специальности «медицинская химия». Ну и, конечно, всем моим друзьям, моей семье и моим коллегам, кто поддерживал меня во время написания данной работы.

Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Спасибо, Софья Станиславовна. Итак, переходим к голосованию. В члены комиссии предлагается Шундрин Леонид Анатольевич, Бородин Геннадий Иванович и Меженкова Татьяна Владимировна. Кто за такой состав комиссии? Прошу голосовать. Против? Единогласно. Прошу комиссию приступить к голосованию.

Член совета – д.х.н. Шундрин Леонид Анатольевич

Внимание, коллеги! Счётная комиссия готова огласить результаты тайного голосования.

Уважаемый коллеги, счетная комиссия по присуждению учёной степени доктора химических наук Борисевич Софии Станиславовне в составе Шундрин Леонид Анатольевич – председатель, Меженкова Татьяна Владимировна и Бородин Геннадий Иванович, члены комиссии утверждают следующее: На заседании присутствовали 20 членов совета, в том числе докторов, но по профилю рассматриваемой диссертации 4.

Роздано бюллетеней было 20. Осталось не розданных бюллетеней 6. Оказалось в урне 20 бюллетеней. Результат этого склада следующий. «За» 20, «Против» 0 «Недействительных бюллетеней» 0. Председатель счетной комиссии и подписи членов счетной комиссии.

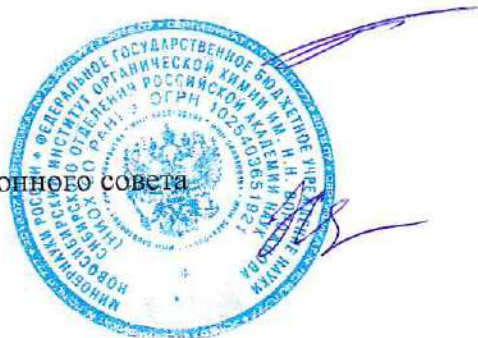
Председатель диссертационного совета – д.х.н., проф. РАН Волчо Константин Петрович.

Кто за то, чтобы утвердить результаты? Кто за? Против? Воздержались? Единогласно. Поздравляем!

Внимание! Рассылался проект заключения. К нему есть какие-то вопросы, замечания? Нет, да? Тогда предлагается принять заключение. Кто за? Против? Единогласно. Спасибо всем большое за работу. У нас успешно прошла защита работы в области медицинской химии.

Председатель диссертационного совета
д.х.н., проф. РАН

Врио ученого секретаря диссертационного совета
д.х.н.



Волчо К. П.

Шульц Э. Э.