

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора химических наук Хлебникова Андрея Ивановича на диссертационную работу Борисевич Софии Станиславовны на тему «Алгоритм описания механизма противовирусной активности ингибиторов мембранных вирусных белков методами молекулярного моделирования», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.16 – медицинская химия

Разработка новых эффективных противовирусных агентов невозможна без понимания механизмов возникновения противовирусной активности. Вместе с тем, изучение этих механизмов требует широкого применения методов молекулярного моделирования, особенно при современном объеме имеющихся экспериментальных данных о пространственных структурах вирусных белков и их комплексов с различными лигандами. В связи с этим исследования, выполненные в диссертационной работе С.С. Борисевич, направленные на разработку общих вычислительных подходов к описанию взаимодействий малых молекул с вирусными белками, являются весьма актуальными.

Диссертационная работа изложена на 332 страницах, состоит из введения, списка сокращений и условных обозначений, трех глав, выводов, приложения, списка цитируемой литературы (325 наименований).

Первая глава диссертационной работы представляет собой обзор литературы, в котором приводятся основные характеристики вирусных белков слияния, типичные сайты связывания для ингибиторов белков слияния I типа, протонного M2 канала вируса гриппа, высококонсервативного мембранного белка ортопоксвирусов p37. Рассматриваются методы молекулярного моделирования, используемые для анализа структуры белков и их взаимодействий с малыми молекулами.

В обзоре отмечается роль вирусных белков слияния для связывания с клеткой-мишенью и проникновения вирусного генома в цитоплазму.

Приводится классификация белков слияния различных вирусов, дается характеристика элементов их строения и субъединиц, показаны особенности префузионной и постфузионной конформаций. С.С. Борисевич систематизировала литературные данные об основных этапах процесса слияния вирусной и клеточной мембран, что весьма важно для последующего восприятия собственных результатов автора, изложенных в диссертационной работе. Автор анализирует строение и функции гемагглютинина (НА) вируса гриппа, который является одним из главных объектов диссертационного исследования. Приводится филогенетическое дерево подтипов НА, показаны ключевые конформационные перестройки НА в процессе слияния, положение и структура сайта связывания малых молекул в субъединице НА₁. Суммируется краткая история разработки ингибиторов, действие которых основано на взаимодействии с этим сайтом связывания, в том числе с применением методов молекулярного моделирования. Наиболее перспективными для разработки противовирусных агентов являются сайты связывания в субъединице НА₂, к которым относится ТБГХ-сайт, взаимодействующий с молекулой *трет*-бутилгидрохинона. Отмечается важность поиска новых областей в стеблевой части НА, связывание с которыми затрудняло бы важные конформационные изменения при слиянии вирусной и клеточной мембран.

Значительное внимание в литературном обзоре уделено современному состоянию в области разработки ингибиторов, взаимодействующих с различными сайтами S-белка коронавируса SARS-CoV-2; при этом данный белок является одной из главных биологических мишеней, наряду с основной протеазой M^{PRO}. Хотя и непродолжительный, но весьма интенсивный период поиска ингибиторов S-белка SARS-CoV-2 отражен в многочисленных публикациях, результаты которых творчески обобщены автором диссертации и представлены в главе 1. Важной задачей является поиск новых эффективных ингибиторов и изучение особенностей их взаимодействия с ключевыми (в том числе еще неизвестными) сайтами связывания S-белка.

Довольно глубокий анализ сведений о молекулярной структуре, локализованных и потенциальных сайтах связывания проведен для F-протеина респираторно-синцитиального вируса (РСВ) и гликопротеина вируса Эбола. Литературный обзор, как и вся диссертация, хорошо иллюстрирован и представляет самостоятельную научную ценность для ознакомления со структурой и функциями вирусных белков.

Вторая глава диссертационной работы содержит описание методов и объектов исследования. В качестве объектов использовались мембранные вирусные белки, упоминавшиеся в главе 1 (см. выше), а также структуры соответствующих лиганд-белковых комплексов, имеющиеся в базе данных Protein Data Bank (PDB). Полноразмерные структуры поверхностных белков в ряде случаев были собраны автором из протомеров, если полная информация о строении тримеров отсутствовала в PDB. Для решения некоторых вычислительных задач (например, относящихся к мембранному белку ортопоксвирусов р37) пространственная структура белковой макромолекулы была полностью предсказана с применением нейросетевых алгоритмов. Приводятся методы подготовки белков и лигандов с учетом pH среды для последующих этапов молекулярного моделирования. Описана методология SiteMap для поиска потенциальных сайтов связывания в ситуациях, когда конкретное расположение сайта неизвестно. Результат применения этой методологии иллюстрируется в главе 2 на примере поиска сайтов в гемагглютанине вируса гриппа.

Дается описание методик, использованных при проведении молекулярного докинга, молекулярной динамики и обработке полученных результатов (выбор докинг-позиций, вычисление констант диссоциации лиганд-белковых комплексов, анализ траекторий молекулярной динамики). Примененные автором методы и подходы являются современными и надежными, что позволяет говорить о высокой достоверности полученных результатов.

В третьей главе диссертационной работы приводится описание результатов, полученных С.С. Борисевич при выполнении исследований. Детально изучено строение сайта связывания ТБГХ/умифеновира, локализованного на субъединице НА₂ гемагглютиниона вируса гриппа. В работе приводятся размеры и структурные характеристики молекул, которые могли бы иметь сродство к этому сайту, и проведен докинг нескольких рядов органических соединений. Изучена аффинность малых молекул к альтернативным сайтам связывания. Большое внимание уделялось исследованию камфецина, который проявляет выраженную противовирусную активность против различных штаммов. В работе рассматривалась возможность ингибирования камфецином как гемагглютиниона, так и М2 канала. С.С. Борисевич выполнен QM-докинг этого соединения в сайт связывания ТБГХ трех штаммов вируса гриппа. Результаты согласуются с предположением о связывании в области пептида слияния НА. Альтернативный сайт связывания камфецина (К-сайт), находящийся в области протеолиза НА, был найден автором с помощью методологии SiteMap, что является одним из достижений выполненной диссертационной работы. QM-докинг в этот сайт также свидетельствует о хорошей аффинности камфецина. Следует особо отметить результаты моделирования с мутантным камфецин-резистентным НА, дополнительно подтверждающие гипотезу о гемагглютенине как биологической мишени противовирусного действия камфецина. Аналогичные выводы с дополнительным привлечением результатов молекулярной динамики были сделаны для широкого ряда аналогов камфецина. Важность альтернативного К-сайта НА показана также для четвертичной аммониевой соли на основе (–)-борнеола, обладающей противовирусной активностью, и некоторых других соединений.

Отдельный раздел главы 3 посвящен изучению связывания камфецина и гинсамида с М2 каналом вируса гриппа. Хотя автором показано эффективное связывание этих молекул с гемагглютинином, имеется также

возможность блокирования M2 протонного канала данными соединениями. Автором показано, что связывание камфецина и гинсамида характеризуется энергетическими эффектами, соизмеримыми с таковыми для M2-блокаторов амантадина и римантадина. При проведении этих исследований автором была построена модель мембранного M2 канала с использованием метода нейронных сетей. Такой оригинальный подход может быть применен для предсказания структуры виropоринoв других вирусных белков.

Поверхностный S-белок коронавируса SARS-CoV-2 является одной из важнейших биологических мишеней при разработке лекарств против коронавирусной инфекции. В частности, с этим белком взаимодействует противовирусный препарат умифеновир (арбидол). В работе С.С. Борисевич предпринято масштабное исследование возможных сайтов связывания S-белка. Отличительной особенностью этих вычислительных экспериментов являлось применение метода молекулярной динамики без предварительного докинга, а именно использовалась модель взаимодействия нескольких молекул умифеновира с рецептор-связывающим доменом (РСД) и с комплексом РСД-АПФ2, включающим ангиотензинпревращающий фермент 2. Статистическая обработка результатов симуляций позволила найти потенциальные места связывания умифеновира с поверхностью S-белка. На основе этих данных, а также результатов молекулярного докинга было 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 при переходе из префузионной в постфузионную конформацию, то есть в препятствии слиянию вирусной и клеточной мембран. Кроме умифеновира, автором исследовано взаимодействие производных эфиров (-)-борнеола и производных (+)-усниновой кислоты с S-белком. Полученные результаты моделирования находятся в согласии с имеющимися экспериментальными

данными и позволяют сделать важные выводы о положениях сайтов связывания.

Не менее объемные и тщательные вычислительные эксперименты выполнены С.С. Борисевич при изучении ингибирующей активности малых молекул в отношении поверхностного F-белка РСВ, ортопоксвирусов и вируса Эбола. При этом, в частности, были рассмотрены возможности метода молекулярной динамики объяснить разную противовирусную активность различных стереоизомеров; сделаны обобщения, касающиеся фармакофорного профиля ингибиторов поверхностных вирусных белков I типа; предложена фармакофорная модель ингибитора белка р37. В заключение главы 3 сформулированы общие рекомендации для применения методов молекулярного моделирования в отношении вирусных белков. Эти рекомендации касаются обоснованного выбора биологической мишени, описания механизма противовирусного действия изучаемых соединений, построения прогностической модели и структурной модификации лигандов с целью повышения их противовирусной активности.

В Приложении приведены необходимые материалы, дополняющие основной текст диссертации.

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.

При прочтении диссертации возникли следующие вопросы и замечания.

1. Среди квантовохимических программ, использованных в диссертации для подготовки лигандов, упоминается Gaussian 09. Следует отметить, что современной версией этого программного пакета является Gaussian 16.
2. На с. 87 диссертации отмечается: «Процедуры молекулярного докинга были проведены для обеих форм (протонированных и нет), если их соотношения были равные». Не совсем понятно, что под этим понимает автор: в точности равное соотношение концентраций протонированной и депротонированной форм, либо всё же концентрации одного порядка.
3. В главе 2 не указано, какое программное обеспечение использовалось для симуляций методом молекулярной динамики. Применялся ли соответствующий модуль Desmond, входящий в пакет Schrodinger, либо какая-то другая программа?
4. Автор отмечает, что «для дополнительных биологических исследований был выбран агент 173, для которого были проведены прямые анализы проверки влияния соединения на рецептор-связывающую и фузогенную функции гемагглютинирина» (с. 146; в работе встречаются и другие аналогичные фразы), однако в главе 2 не приводятся методики этих биологических исследований. То же относится к экспериментально определенным значениям pK_a (с. 121).

Отмеченные недостатки не являются принципиальными и 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

Тел. (3822) 56-38-61, e-mail: aikhl@tpu.ru

Андрей Иванович Хлебников

В.Д. Новикова

17.05.2024

