

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Борисевич Софии Станиславовны «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.

Диссертационная работа Борисевич Софии Станиславовны посвящена изучению возможностей современных методов молекулярного моделирования для объяснения механизма противовирусной активности ряда соединений. Поиск новых противовирусных соединений с различными механизмами действия уже длительное время является предметом изучения медицинской химии, однако пандемия COVID-19 вызвала дополнительный всплеск интереса ученых к этой тематике. Для поиска противовирусных соединений сегодня используется весь арсенал доступных науке средств, это и рациональный дизайн лекарств, и высоко производительный скрининг соединений на взаимодействие с определенными белками и ингибирование цельных вирусов. Одним из значительных инструментов является применение *in silico* методов, которые включают как молекулярное моделирование, машинное обучение и др. Современные требования к разрабатываемым лекарственным препаратам включают обязательное понимание механизма действия и мишени конкретного соединения. Действительно, в большинстве случаев в руках исследователей оказываются группы соединений сходной структуры, имеющие общий скаффолд, и имеющие однонаправленную биологическую активность, но ни механизм, ни мишень им не известны. Решение этих вопросов является предметом значительных исследований химиков, биологов и сегодня математиков, которые методами молекулярного моделирования помогают соединить вместе все имеющиеся экспериментальные данные или подсказать направления, в которых нужно

провести эксперименты, чтобы получить доказательства того или иного механизма действия.

Все это свидетельствует о несомненной актуальности выбранной соискателем тематики как с точки зрения получения новых знаний о мишенях и механизме действия ряда противовирусных соединений, так и расширения нашего понимания возможностей молекулярного моделирования как современного инструмента медицинской химии, помогающего в создании новых лекарственных средств.

Несомненным подтверждением актуальности выполненных исследований служит то, что они выполнены при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант 20-04-60038) и Российского научного фонда (гранты 21-13-00026, 22-23-00618), т. е. прошли независимую экспертизу.

Диссертация Борисевич С.С. состоит из введения, в котором обоснована актуальность, научная новизна и практическая значимость темы исследования, сформулированы цели и задачи, литературного обзора, который описывает известные данные о сайтах связывания ингибиторов вирусных мембранных белков в сравнении с данными биологических тестов и результатами молекулярного моделирования, раздела посвященного выбору методов и объектов исследования и наиболее значительному разделу посвященному результатам исследований самого соискателя. Диссертация традиционно заканчивается заключением и основными выводами. Работа изложена на 332 страницах машинописного текста, содержит 170 рисунков, 40 таблиц, список цитируемой литературы (325 литературных источников) и приложения.

Во введении автор обосновал ее актуальность, показал цели, объекты исследования, научную и практическую ценность выбранной тематики.

В первой главе «Литературный обзор» соискателем подробно обсуждаются вирусные белки слияния и некоторые другие мембранные белки, известные в них сайты связывания с различными противовирусными

лекарственными препаратами, а также литературные данные по использованию методов молекулярного моделирования, которые подтверждают имеющиеся экспериментальные данные для обсуждаемых препаратов. Обсуждаемые литературные источники вполне адекватно отражает состояние представленной в главе тематике за последние годы.

Основные достижения диссертационной работы Борисевич С.С. изложены в главе «Результаты», где представлены собственные результаты работы автора, эти результаты и определяют новизну, значимость и возможность практического использования полученных данных.

Так, Борисевич С. С. впервые для каркасных производных на основе терпеновых соединений, прежде всего для кандидата в лекарственное средство с противовирусной активностью Камфецина, описан профиль сайта связывания гемагглютинина вируса гриппа расположенный в области пептида слияния. При этом показано, что механизм противогриппозного действия Камфецина и его производных основан на их связывании в месте протеолиза, что энергетически стабилизирует конформацию белка, затрудняет его последующие конформационные перестройки и в итоге препятствует слиянию вирусных и клеточных мембран.

Интересный раздел посвящен математическому обоснованию снижения патогенности камфецин-резистентного штамма вируса гриппа. Автором убедительно показано, что аминокислотная замена V615L в месте протеолиза, которая произошла в результате отбора Камфецин устойчивого штамма вируса гриппа, стабилизирует префузионную конформацию белка и энергетически затрудняет дальнейшие конформационные перестройки. Автор исследовал изменения энергетического профиля конформационных переходов гемагглютинина вируса гриппа дикого типа и камфецин-резистентного штамма при различных значениях рН среды. Полученные данные могут помочь в будущем правильной разработке лекарственной формы Камфецина.

Одновременно автором подробно изучена гипотеза альтернативного механизма действия Камфецина, как ингибитора протонного M2 канала

вируса гриппа и дано объяснение механизму подавления фузогенной активности гемагглютинаина каркасными производными терпеновых соединений, среди которых наибольшее обсуждение получили Камфецин и Гинсамид. В своей работе Борисевич С. С. убедительно доказывает что это происходит за счет связывания исследуемых соединений со стеблевой частью домена белка и блокированием ионной проводимости протонного M2 канала.

Значительная часть исследований посвящена изучению вероятного сайта связывания ингибиторов S-белка SARS-CoV-2, подавляющих фузогенную активность белка. В качестве примеров автором рассмотрены варианты связывания умифеновира (МНН) и производных эфиров борнеола. Так показано, что связывание умифеновира происходит со второй субъединицей белка и оказывает влияние на вторичную структуру доменов белка, в то время как механизм противовирусной активности производных эфиров (–)-борнеола связан с их взаимодействием с пептидом слияния и в результате в подавлении фузогенной активности поверхностного вирусного белка SARS-CoV-2. В данном разделе работы автором представлены экспериментальные данные, которые полностью соответствуют полученным расчетным данным молекулярного моделирования проведенным соискателем.

Следующий раздел работы посвящен исследованию F-белка респираторно-синцитиального вируса и автором предприняты попытки математически объяснить каким образом реализуется противовирусная активность ряда соединений на этот вирус. В качестве объектов исследования были выбраны производные фенилкумаринов и N-содержащих эфиров (–)-борнеола, так как предварительные биологические данные свидетельствуют в пользу взаимодействия этих групп соединений именно с F-белком. В результате проведенного исследования и обсуждения результатов автор в своей работе дает рекомендации по возможной по структурной модификации исследуемых скаффолдов с целью увеличения аффинности соединений к сайту связывания ингибиторов F-белка, что по логике должно приводить к повышению противовирусной активности.

Вопрос поиска противовирусных соединений прямого механизма действия, но при этом обладающего широким спектром действия, является очень актуальной и важной проблемой. Значительная часть работы соискателя как раз и посвящено попыткам дать рекомендации по возможному конструированию структур малых молекул, которые могли бы обладать именно такими свойствами. Автор убедительно показывает возможность проведения дизайна нового соединения, механизм действия которого направлен на стадию слияния мембран вируса и клетки хозяина, и в результате выйти на противовирусный препарат широкого спектра действия. Так, показано, что малые молекулы, объемом до 350\AA^3 и количеством атомов порядка 70, содержащие жёсткий гидрофобный фрагмент, акцепторную группу и протонированный атом азота могут одновременно связываться в сайтах связывания ингибиторов поверхностных белков I типа разных вирусов, а именно гемагглютинина вируса гриппа, S-белка SARS-CoV-2, F-белка респираторно- синцитиального вируса и гликопротеина вируса Эбола.

Все вышеуказанное в полной мере подтверждает научную новизну и практическую значимость работы.

Выводы диссертации сомнений не вызывают, они научно обоснованы, имеют существенное практическое значения, а их достоверность определяется современным уровнем методов, примененных автором в ходе проведения исследований, интерпретации и обсуждения полученных результатов с позиций современной медицинской химии.

Представленную работу отличает высокий уровень исследований, проведенных автором, использование самых современных вычислительных методов для установления строения и структуры как белков, так и их комплексов с исследуемыми соединениями. Особо следует отметить превосходный теоретический уровень интерпретации полученных расчетных результатов.

Можно резюмировать, что диссертация Борисевич С. С. представляет собой крупное научное достижение, в ней разработаны общие подходы к

объяснению противовирусного действия ряда соединений и показана принципиальная возможность разработки противовирусных соединений широкого спектра действия с прямым механизмом, направленным на внешние вирусные белки.

Основное содержание работы в достаточной мере отражено в публикациях и изложено в виде 26 статей в научных журналах, рекомендованных ВАК, из которых 19 в журналах первого и второго квартилей (Q1, Q2) по медицинской химии, вирусологии, химии и фармакологии.

Автореферат диссертации в полной мере отражает содержание и выводы диссертационной работы.

В целом, работа производит хорошее впечатление своей масштабностью, своей логикой, четкой структурированностью, новизной и достоверностью представленных результатов. Соискатель грамотно использует современные концепции и методики медицинской химии, применяет для решения поставленной задачи как экспериментальные подходы, так и квантово-химическое моделирование.

В результате рассмотрения диссертации возникает ряд вопросов и замечаний:

1. Замечания к литературному обзору. Соединение 23 представляет собой классический пример ингибитора нуклеопротеина вируса гриппа и с высокой долей вероятности можно утверждать, что именно через это реализуется его противовирусная активность. Мнение авторов упомянутой в обзоре статьи, что оно воздействует на гемагглютинин выглядит сомнительным или имеет место быть две мишени. Было бы интересно если бы автор диссертации обсудил этот момент.

В обзоре приведены многочисленные структурные формулы соединений, имеющих положительно заряженный атом азота, однако ни где не указан противоион. В тех случаях, когда речь идет именно о веществе, это не корректно.

В разделе посвященном вирусу Эбола хотелось бы видеть так же литературные данные по активности и возможному механизму действия отечественного препарата тилорона (амиксин).

2. В разделе 3.1.1. подробно обсуждается фармакофорный профиль сайта связывания ТБГХ/умифеновира, однако отсутствует детальное сравнение данных молекулярного моделирования и экспериментальными данными для умифеновира по ссылке 25. Такое обсуждение было бы очень интересным, так как указанная статья не однозначна и вызывает много вопросов,

3. В разделе 3.1.2.1. автор пишет, что эксперименты по времени добавления показывают, что агент **103** подавляет репликацию вируса в первые часы заражения, что позволяет рассматривать гемагглютинин (НА) в качестве потенциальной биологической мишени. Это утверждение выглядит сомнительным, потому что точно такой же эффект будет наблюдаться и в случае взаимодействия вещества с клеткой хозяина по механизму препятствующему дальнейшему прикреплению вируса к стенке.

4. На стр. 107-108 автор делает попытку объяснения разной активности для производных бензо[*d*][1,3]дитиолового скаффолда. При этом углубленному анализу подвергаются достаточно удаленные по структуре соединения, в то время как напрашивается провести детальное сравнение соединений 115 и 116, которые структурно очень близки, но принципиально отличаются по активности.

5. В главе 3.1.4. автор очень интересно рассуждает и приводит расчетные данные о возможном влиянии рН среды на конформационное состояние гемагглютинина камфецин-резистентного штамма. Было бы очень привлекательно провести не сложную экспериментальную работу с разными рН сравнить полученные данные с молекулярным моделированием.

6. На стр. 156 автор пишет, что «не оставляет сомнений, гемагглютинин - мишень камфецина». Все же для полной уверенности хотелось бы иметь экспериментальные данные рентгеноструктурного анализа.

7. В разделе 3.2.1. посвященному поиску места связывания умифеновира нет обсуждения со статьей 25 по списку литературы, аналогично хотелось бы видеть более подробное обсуждение на стр. 180 данных статьи 300 по списку литературы по сравнению с результатами молекулярного моделирования проведенными автором

8. Правильность выбор сертралина как референс соединения вызывает сомнения. В лит обзоре описаны (стр. 61) описаны 9 соединений, и есть более активные, однако по непонятной причине в главе 3.4. «Ингибирующая активность малых молекул в отношении вируса Эбола» в качестве референс соединения выбран именно сертралин. Отсутствуют сравнительное описание расчетных данных с данными биологических экспериментов. Ссылка 163 по списку литературы упоминается, но хотелось бы видеть детальный анализ/сравнение расчетных и экспериментальных данных.

9. Представляется, что работу бы сильно украсили рассуждения об общности белков слияния разных вирусов как результат эволюции, так как все они нацелены на одну клетку хозяина, и как следствие возможность получения противовирусного препарата широкого спектра действия.

Все сделанные замечания не носят принципиального характера.

Оценивая работу в целом, можно заключить, что автором выполнено актуальное, значимое научное исследование, являющееся значительным вкладом в медицинскую химию и расширяющее возможности разработки новых фармацевтических субстанций противовирусной направленности.

Диссертационная работа Борисевич Софии Станиславовны «Алгоритм описания механизма противовирусной активности ингибиторов мембранных вирусных белков методами молекулярного моделирования» по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне, практической значимости безусловно удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к докторским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842), а ее автор – Борисевич София Станиславовна заслуживает

