

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, заведующего лабораторией информационных технологий в фармакологии и компьютерного моделирования лекарств Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Васильева Павла Михайловича на диссертацию Щербакова Кирилла Андреевича на тему «Исследование антиандрогенной активности стероидных гибридов методами молекулярного моделирования», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. – Математическая биология, биоинформатика

Актуальность проблемы

Актуальность темы исследования определяется высокой частотой встречаемости рака предстательной железы (РПЖ) среди онкологических заболеваний мужчин зрелого возраста.

Данная патология во многом определяется атипичным функционированием андрогенного рецептора (АР), в частности, его мутантных форм. В связи с этим, антагонисты АР весьма широко используются для лечения РПЖ. Ген АР, экспрессирующий АР, характеризуется достаточно высокой степенью полиморфизма: в настоящее время известно более 400 мутаций АР, причем особенности функционирования большинства мутантных форм АР не изучены. При андрогенозависимом РПЖ мутации АР приводят к нарушению функции этих рецепторов, что может также порождать резистентность к используемым в клинике препаратам. Более того, резистентные мутации могут порождать и сами антагонисты АР.

Синтез естественных агонистов АР, тестостерона и дигиротестостерона, происходит с участием цитохрома CYP17A1, ингибиторы которого также используются при лечении РПЖ. Однако из-за низкой селективности эти препараты имеют множество побочных эффектов, что ограничивает их применение.

Тем не менее, антагонисты АР и ингибиторы CYP17A1 используются в клинической практике при лечении РПЖ, несмотря на перечисленные выше недостатки.

На фоне отсутствия достаточно эффективных средств фармакотерапии РПЖ, исследования, направленные на поиск новых лекарственных веществ, устойчиво блокирующих указанные мишени, в том числе выполненные с применением методов молекулярного моделирования, являются весьма перспективными.

Диссертация Шербакова К.А. посвящена изучению механизмов взаимодействия стероидных соединений с молекулярными мишенями, задействованными при лечении рака предстательной железы, что, с учетом вышеизложенного, обуславливает высокую актуальность проведенной работы.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Работу отличает корректно поставленная цель, грамотно сформулированные задачи, адекватно подобранные методы исследования.

Проведенное исследование характеризуется тщательностью подготовки исходного материала: 1) в базе данных RCSB PDB найдены хорошо разрешенные рентгеноструктурные 3D-модели изучаемых белков и на их основе построены нужные мутированные формы; 2) поиск потенциальных лигандов выполнен в базе данных ZINC12, включающей 8 млн. соединений.

Необходимо отметить профессиональное использование автором современных методов программирования, специализированных программ и Web-ресурсов, в частности: хорошо зарекомендовавших себя программных

пакетов и сред SYBYL, Vina Autodock, GROMACS, VMD, AutoGrow4, RING; Web-сервисов PLIP, PharmaGist, ZINCPharmer; специализированной Python-библиотеки ProLIF.

Следует также подчеркнуть, что работы по синтезу и биологическому тестированию новых соединений, выполненные в рамках кооперации с исследователями из других структурных подразделений и научных организаций, выполнены на современном методическом уровне, должным образом обработаны и являются валидными и достоверными.

Особо необходимо отметить, что диссертационное исследование выполнено при поддержке трех грантов РФФИ и одного гранта РНФ и, следовательно, полученные результаты неоднократно проходили экспертизу профильных специалистов указанных фондов.

Достаточный объем данных, полученных с использованием хорошо зарекомендовавших себя методов молекулярного моделирования, их глубокий анализ, подробное описание и корректная вычислительная обработка, наличие валидных экспериментальных данных по биологическому тестированию известных и новых соединений позволяют квалифицировать результаты диссертационной работы как обоснованные и достоверные, а основные положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации, как вполне обоснованные.

Научная новизна и практическая ценность диссертации

Исследование носит фундаментально-прикладной характер. Бесспорны научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Впервые методами молекулярного докинга и молекулярной динамики было показано, что два новых стероидных соединения являются антагонистами как дикого типа AR, так и его мутантных форм. Высказаны предположения относительно молекулярного механизма такого действия.

Впервые методами молекулярного докинга было исследовано взаимодействие абиратерона, галетерона и их 3-кет- Δ^4 -метаболитов с релевантными ферментами синтеза стероидов. Было показано, что модели

цитохромов P450 с лигандами, построенные методом докинга, позволяют предсказывать тип ингибирования этих лигандов. Сформулированы предположения о том, какие препараты наиболее оптимально использовать для лечения РПЖ

Следует подчеркнуть, что при выполнении диссертационного исследования автор самостоятельно разработал эффективный новый подход по поиску аффинных соединений для выявленных, но не исследованных сайтов связывания. В рамках этого подхода последовательно применяются методы *de novo* построения лигандов, фармакофорного поиска, молекулярного докинга и молекулярной динамики. Подход был апробирован в поиске ингибиторов сайта фосфорилирования шаперона HSP90, найдены два высоко аффинных соединения.

Таким образом, диссертационная работа Щербакова К.А. имеет высокую степень научной новизны и практическая значимость полученных результатов.

Теоретическая и научно-практическая значимость

В работе установлен молекулярный механизм действия двух новых соединений на АР дикого типа и его мутантные формы. Построенные модели комплексов стероид-метаболизирующих цитохромов P450 с абиратероном, галетероном и их метаболитами D4A и D4G позволили объяснить ряд наблюдаемых при связывании в экспериментах спектральных изменений, а также наблюдавшийся в ряде случаев сигмоидальный характер связывания соединений. Был предложен и апробирован подход по поиску лигандов в ранее неописанные сайты связывания, позволяющий отказаться от докинга больших баз данных.

Полученные в работе данные могут послужить основой для дальнейшей оптимизации стероидных антагонистов АР с целью повышения их специфичности и аффинности как к рецептору дикого типа, так и к его мутантным формам.

Выявление механизмов взаимодействия известных препаратов со

стероид-метаболизирующими цитохромами P450 позволяет спрогнозировать изменения в метаболизме стероидных гормонов и обозначить направления для разработки более эффективных препаратов для лечения РПЖ.

Предложены низкомолекулярные соединения, способные препятствовать фосфорилированию шаперона HSP90 по остатку Thr-90, которые могут стать препаратами с принципиально новым механизмом действия для лечения РПЖ.

Замечательно, что данная работа выполнена комплексно и логически последовательно: 1) синтезированы новые ингибиторы AP и проведено их биологическое тестирование; 2) построены верифицированные 3D-модели белок-лигандных комплексов известных и новых соединений с различными мутантными формами AP и выполнен детальный анализ молекулярного механизма действия этих лигандов; 3) построены верифицированные 3D-модели белок-лигандных комплексов известных и новых соединений с несколькими видами ферментов стероидогенеза и выполнен детальный анализ молекулярного механизма их действия; 4) разработан подход по поиску аффинных соединений для новых сайтов, позволяющий проводить направленные поиск *in silico* высоко эффективных лекарственных веществ для лечения РПЖ.

Следует подчеркнуть, что в результате проделанной работы автором разработана методология общего характера и создан реальный рабочий инструмент для виртуального поиска новых противоопухолевых соединений.

Три гранта РФФИ и один грант РНФ, при поддержке которых выполнена работа, успешно завершены, результаты опубликованы в открытой печати.

Таким образом, диссертационная исследование Щербакова К.А. имеет высокую теоретическую и практическую значимость.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Поставленные цели, задачи, область исследования, предмет исследования, примененные современные и обоснованные методы,

полученные выводы и рекомендации являются весьма актуальными для биоинформатики. Считаю, что представленная диссертации полностью соответствует паспорту специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика по следующим направлениям.

п.1. Математическое и компьютерное моделирование живых систем: биомолекул, ферментативных реакций, метаболических и сигнальных путей, субклеточных структур, клеток, тканей, органов, систем органов, организмов, популяций, биоценозов.

п.3. Математическое и компьютерное моделирование структурно-функциональных взаимоотношений отдельных биомолекул и их взаимодействий в клетке (интерактомика).

п.4. Математическое и компьютерное моделирование биологического действия ксенобиотиков. Компьютерное конструирование лекарств. Анализ взаимосвязей «структура-активность». Компьютерная фармакология и токсикология.

п.5. Идентификация потенциальных биомаркеров с целью диагностики заболеваний и перспективных молекулярных мишеней новых лекарств.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

По теме исследования опубликовано 9 работ, из них 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Основные положения диссертации докладывались на 2 международных конференциях.

Структура и оформление работы

Диссертация оформлена в классическом стиле, в соответствии с существующими требованиями, изложена на 128 страницах, включает 57 рисунков и 9 таблиц. Работа состоит из Введения; главы 1 «Обзор литературы», включающей шесть разделов; главы 2 «Материалы и методы», включающей четыре раздела; главы 3 «Результаты и обсуждение», включающей три раздела самостоятельно полученных данных; Заключение; Выводов; Списка сокращений и условных обозначений; Списка

использованной литературы; Благодарностей.

Список литературы включает в себя 158 источников и охватывает период в 46 лет с 1977 по 2022 гг. – существенный объем и значительную временную широту литературного поиска следует особо отметить.

В первой главе проведен обзор и анализ литературных данных по теме диссертации. Представлены основные механизмы патогенеза РПЖ. Изложены структура и функции АР и описано значение этих рецепторов и их пяти мутантных форм как мишеней для разработки новых противоопухолевых препаратов. Изложены структура и функции цитохромов Р450 и описана релевантность их стероидметаболизирующих форм в качестве мишеней для разработки новых средств для лечения РПЖ. Отражена значимость шаперона HSP90 как мишени для разработки новых лекарственных соединений против РПЖ. Отдельно описаны современные методы молекулярного моделирования, в частности, метод докинга и метод молекулярной динамики.

Во второй главе подробно описаны материалы и методы проведенных исследований. Следует отметить, что примененные диссертантом методики весьма разнообразны, валидны и соответствуют задачам исследования.

В первом разделе главы 2 описаны использованные экспериментальные 3D-модели пространственной структуры АР, восьми форм цитохрома Р450 и шаперона HSP90 – с различными лигандами. Изложен метод построения 3D-моделей семи структур изучаемых новых и известных низкомолекулярных соединений.

Во втором разделе главы 2 описаны основные применяемые компьютерные программы молекулярного моделирования – докинга Vina Autodock и молекулярной динамики GROMACS-2020, и приведены параметры их использования. Изложены методики: расчета энергии взаимодействия в комплексах (метод MM-GBSA); анализа распределения конформаций спирали H12 (метод главных компонент PCA); доли нативных контактов (оригинальный скрипт на Python); генерации молекул *de novo*

(программа AutoGrow4); генерации моделей фармакофора (веб-сервис PharmaGist); расчетов сети взаимодействий остатков (программа RING).

В третьем разделе главы 2 перечислено оборудование, использованное для выполнения расчетных исследований.

В четвертом разделе главы 2 описаны экспериментальные методы. Кратко изложены данные о синтезе соединений D4G (выполнен сотрудниками лаборатории феромонов АО «Щёлково Агрохим»), 171 и 172 (выполнен сотрудниками лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии Республики Беларусь). Изложены методы определения активности абиратерона, галетерона, D4A и D4G в отношении CYP51A1, CYP11A1, CYP19A1, CYP21A1 и CYP3A4 (выполнены сотрудниками лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ). Описаны методы изучения токсичности соединений 171 и 172 на клетках линий рака простаты LnCap и PC-3 и на клетках рака молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231 (выполнены сотрудниками лаборатории синтеза физиологически активных соединений ИБМХ).

В третьей главе представлены результаты проведенных исследований и их обсуждение.

В первом разделе главы 3 описаны и обсуждены результаты моделирования методом докинга и последующей молекулярной динамики взаимодействия соединений 171K, 171E, 172, бикалутамида и тестостерона с нативным лиганд-связывающим доменом AR и двух его мутантных форм.

Показано, что молекулярный механизм связывания соединений 171 и 172 примерно одинаков, а их антагонистическое воздействие обусловлено не взаимодействием со спиралью H12, а гидрофобным связыванием с петлей L11_12. Построены паттерны взаимодействий исследуемых соединений с лиганд-связывающим доменом AR и его мутантных форм, определены ключевые связывающие аминокислоты.

По результатам расчёта энергий связывания установлено, что соединение 171 будет являться сравнительно более слабым антагонистом AR

дикого типа, а соединение 172 будет являться более выраженным антагонистом как АР дикого типа, так и его мутантных форм.

Во втором разделе главы 3 описаны и обсуждены результаты моделирования методом докинга взаимодействия абиратерона, галетерона и их метаболитов D4A и D4G со стероид-метаболизующими цитохромами P450.

Расчеты показали, что все четыре соединения ингибируют CYP17A1 по типу II (образуют координационную связь с железом гемма), однако D4A и D4G проявляют более высокую аффинность, и это подтверждается экспериментальными данными.

По результатам докинга установлено, что абиратерон, галетерон, D4A и D4G взаимодействуют и с другими стероид-метаболизующими CYP, однако, в зависимости от мишени и структуры лиганда, могут выступать как субстратами, так и ингибиторами.

В третьем разделе главы 3 описаны и обсуждены результаты поиска ингибиторов фосфорилирования шаперона HSP90 с апробацией оригинального алгоритма поиска соединений, способных связываться с заданным участком белка, для которого ранее не были описаны известные лиганды.

Поиск в этом алгоритме выполняется в три этапа: 1) генерация новых молекул *de novo*; 2) построение с их использованием фармакофорной модели; 3) выявление в базах данных активных соединений с помощью построенной фармакофорной модели.

С использованием программы AutoGrow4 сгенерировано 429118 структур, из которых по показателям аффинности отобрано 2042 структуры. На их основе были сконструированы 18 прототипов, по которым с помощью веб-сервиса PharmaGist и последующей модификации были построены 7 фармакофорных моделей. В результате виртуального скрининга в базе данных ZINC с применением программы ZINCPharmer найдены 803 структуры, соответствующих трем построенным фармакофорным моделям.

Из них с помощью докинга, с учетом значений скоринг-функции энергии связывания, были отобраны 16 молекул. По результатам молекулярной динамики из этих молекул, по показателям стабильности белок-лигандного комплекса, были отобраны два наиболее перспективных соединения с возможной высокой активностью, которые были рекомендованы для последующего экспериментального тестирования на способность ингибировать фосфорилирование HSP90.

Диссертация завершается заключением и выводами с практическими рекомендациями, которые логично вытекают из результатов работы, отражают поставленные задачи, аргументированы и имеют научно-практическую значимость.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат адекватно отражает основное содержание диссертационного исследования, полностью соответствует разделам, положениям и выводам диссертационной работы и оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний и возражений по диссертационной работе нет, однако в процессе ознакомления с ней возникли следующие вопросы, требующие дополнительного уточнения, но не затрагивающие существа работы.

1. В работе использовано ограниченное число полученных из PDB экспериментальных рентгеноструктурных 3D-моделей изучаемых белков в комплексе с соответствующими лигандами, в то время как в PDB их значительно больше. Поясните, по каким критериям отбирались используемые модели?

2. Минимальные значения свободной энергии связывания ΔG_{bind} со всеми формами AP для соединений 171 и 172 сопоставимы и превышают соответствующие показатели аффинности в отношении дикого типа AP для

тестостерона и бикалутамида. (таблица 3). В соответствии с этими данными, оба соединения должны проявлять одинаковую и достаточно высокую АР-антагонистическую активность. Однако экспериментальная активность на клетках линии рака простаты Lncap у соединения 172 выше, чем у соединения 171 (таблица 2). Какими еще эффектами воздействия на АР, кроме энергии связывания, можно объяснить более высокую активность соединения 172?

3. Апробации алгоритма поиска соединений, способных связываться с новым выявленным, но не исследованным сайтом связывания, выполнялась на примере поиска ингибиторов фосфорилирования HSP90. Одним из этапов этой методологии является построение и использование фармакофорных моделей. На первом шаге было построено четыре таких моделей, про которые автор указывает, что «... поиск по этим фармакофорным моделям не дал положительного результата» (стр. 99). Каким образом оценивалось качество фармакофорного поиска, применялись ли для этого какие-либо количественные оценки?

Заключение

Диссертация Щербакова Кирилла Андреевича на тему «Исследование антиандрогенной активности стероидных гибридов методами молекулярного моделирования» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи биоинформатики, направленной на изучение механизмов взаимодействия стероидных соединений с молекулярными мишенями, важными для лечения рака предстательной железы, при помощи методов молекулярного моделирования.

С учетом актуальности, высокого методического уровня, научной новизны, теоретической и практической значимости исследования считаю, что представленная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (в редакции постановления

Правительства РФ № 101 от 26.01.2023), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Щербаков Кирилл Андреевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. – Математическая биология, биоинформатика.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией

информационных технологий в фармакологии

и компьютерного моделирования лекарств

НЦИЛС ФГБОУ ВО «Волгоградский

государственный медицинский университет»

Минздрава России,

доктор биологических наук



Васильев Павел Михайлович

15. 09. 2023 г .

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России

Адрес: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, д. 1

Тел: +7 (8442) 38-50-05

E-mail: post@volgmed.ru

<https://www.volgmed.ru/>

