

Голові разової спеціалізованої вченої ради
Державної наукової установи
«Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів»
Національної академії наук України»
проф. ЧЕБАНОВУ Валентину
пр. Науки 60, м. Харків, 61072, Україна

ВІДГУК

офіційного опонента – доктора хімічних наук, професора кафедри хімічного матеріалознавства Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна проф. Іванова Володимира Венедиктовича
на дисертацію

Коваленко Світлани Вікторівни

«Нові біологічно активні речовини – модулятори сіртуїну-1 та сполуки з потенційною противірусною (COVID-19) дією»,

подану до захисту у спеціалізовану вчену раду Державної наукової установи «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» Національної академії наук України» на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 10 – природничі науки за спеціальністю 102 – Хімія

1. Актуальність обраної теми дисертаційної роботи визначається необхідністю розробки нових лікарських сполук які можуть бути модуляторами ферменту сіртуїн-1 (SIRT1) який в свою чергу є регулятором багатьох життєво-важливих процесів, таких як старіння, запалення, відповідь на вірусні інфекції тощо. Активація сіртуїну є перспективною в лікуванні таких хвороб як серцево-судинні захворювання, включно атеросклероз, серцева недостатність, гіпертонія а також сахарний діабет, онкологічні захворювання *та ін.*

Іншим аспектом дисертації є пошук перспективних лікарських молекулярних структур які можуть впливати на перебіг такого тяжкого захворювання як COVID-19. Відомі на сьогоднішній день рентгенівські дані щодо будови комплексу глікопротеїну Spike вірусу SARS-CoV-2 із рецептором ACE2 створили підґрунтя для розробки відповідних інгібіторів.

2. Мета та завдання дослідження полягали в пошуку і вивченню методами молекулярного докінгу перспективних сполук модуляторів (активаторів, інгібіторів) SIRT1, а також сполук з ймовірною противірусною (COVID-19) дією з ряду N-ацилглідрозонів, імідазолів і бензодіазепінів та встановленні закономірностей і механізмів дії цих потенційних лікарських сполук.

Планувалось зокрема: методом молекулярного докінгу *дослідити* механізм зв'язування низькомолекулярних сполук з ряду N-ацилглідрозонів, імідазолів і бензодіазепінів з SIRT1; *дослідити* зв'язування низькомолекулярних сполук з ряду N-ацилглідрозонів, імідазолів і бензодіазепінів з рецептор-зв'язуючим доменом RBD спайкового білка S коронавірусу SARS-CoV-2; *синтезувати* ряди окремих представників класів N-ацилглідрозонів, імідазолів і бензодіазепінів, перспективних з точки зору модулювання сіртуїна-1 та інгібування можливості зв'язування спайкового білка S-RBD коронавірусу SARS-CoV-2 з білком ACE2 людини; провести біологічний скринінг нових сполук з ряду N-ацилглідрозонів, імідазолів і бензодіазепінів щодо SIRT1.

3. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є складовою частиною планових досліджень відділу органічної та біоорганічної хімії НТК «Інститут монокристалів» НАНУ і виконувалась у рамках НДР відомчого замовлення НАН України «Створення сучасних основ одержання та аналізу речовин і компонентів матеріалів фармацевтичного призначення» (2019-2021рр., номер державної реєстрації 0119U100727).

4. Загальні дані про структуру дисертаційної роботи та аналіз її змісту

Робота складається зі вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та одного додатку, в якому вказано публікації здобувачки. Обсяг загального тексту дисертації складає 242 сторінки, з них основного тексту 187 сторінки. Робота ілюстрована 30 схемами, 11 таблицями та 64 рисунками. Список використаних джерел містить 358 найменувань.

В першому розділі проаналізовано наукову літературу присвячену пошуку нових біологічно-активних сполук – модуляторів SIRT1 людини як самостійної мішені, так і в контексті впливу на перебіг захворювання на SARS-CoV-2. Доведено перспективність вибору низькомолекулярних сполук з ряду імідазолів, бензодіазепінів та N-

ацилгідразонів. Такий вибір заснований на їх відомих фармакологічних властивостях та потенціалі щодо взаємодії з різними типами молекулярних мішеней. Вказано, що N-ацилгідразони можуть впливати на активність SIRT1 через свою хімічну структуру, яка містить гідразоновий зв'язок між азотом та карбонільною групою. Ці сполуки також можуть бути легко модифіковані шляхом хімічних реакцій, що дозволяє отримати ряд структур з потенційною біологічною активністю. Ряд структур мають антибактеріальні, протипротозойні, противірусні, протипухлинні та інші властивості.

Структурні особливості імідазольного кільця сприяють гідрофобним взаємодіям, утворенню водневих зв'язків та π - π стекингу із амінокислотними залишками активного сайту SIRT1. Завдяки цьому похідні імідазолу можуть функціонувати і як активатори і як інгібітори сіртуїнів. Також, відомі дані щодо різноманітних активностей (протипаразитарну, протигрибкову, антибактеріальну, протималарійну, протитуберкульозну, противірусну активності тощо), є вагомим фактором для створення нових сполук та вивчення їх активностей.

Аналогічний аналіз даних щодо бензодіазепінів також продемонстрував значну перспективу таких похідних як противірусних сполук.

Загалом в розділі доводиться що N-ацилгідразони, імідазоли та бензодіазепіни є перспективними кандидатами в якості модуляторів SIRT1 та активності проти вірусу SARS-CoV-2.

Другий розділ дисертації присвячено віртуальному скринінгу бібліотеки низькомолекулярних сполук щодо здатності до модуляції SIRT1. Описано основні технічні етапи проведення докінгу. Наведено аналіз сайту зв'язування SIRT1. Вказано алостеричну область, та каталітичний сайт зв'язування. Було визначено 13 сполук-хітів з ряду імідазолів, N-ацилгідразонів та бензодіазепінів для подальшого вивчення, які на основі розрахованої афінності показали найкращий потенціал взаємодії з SIRT1 (афінність зв'язування від 6 ккал/моль).

Третій розділ присвячено дослідженню здатності зв'язування сполук-лідерів з SIRT1. Зокрема встановлено, що ряд сполук похідних імідазолу можуть давати досить великі енергії зв'язування порядку 8 – 9 ккал/моль, що може бути співствлено із даними для відомих інгібіторів (S-селізистат (Ex527)). Детально проаналізовано параметри взаємодії лігнд-білок в кармані зв'язування. Також в третьому розділі описано синтез нових похідних імідазолу та експериментальний скринінг відносно SIRT1. Інгібуючу здатність похідних імідазолів і деяких похідних N-ацилгідразону, а також здатність

похідних бензодіазепіну активувати SIRT1 підтверджено експериментально (High-throughput screening).

У **четвертому розділі** дисертації проведено дослідження здатності зв'язування сполук-лідерів зі спайковим білком SARS-COV-2 методами молекулярного докінгу. Детально описано сайт зв'язування, представлено результати докінгу нових синтезованих сполук похідних імідазолу, N-ацилгідрозону та бензодіазепінів із відповідним білковим комплексом. Загалом у розділі, за результатами *in silico* досліджень методом молекулярного докінгу виявлено ряд сполук які здатні до міцного зв'язування з білком Spike-RBD, що може привести до блокування його подальшої взаємодії з рецептором ACE2 людини.

У **п'ятому розділі** наведено методи синтезу сполук, що досліджувались та відповідні спектральні характеристики. Коротко описано методику «високопродуктивного» скринінгу.

5. Головні результати здобувача, що викладені у цих розділах:

В роботі за допомогою методу молекулярного моделювання (докінг) знайдено ряд низькомолекулярних сполук (серед імідазолів, N-ацилгідрозонів та бензодіазепінів) які можуть мати високу активність щодо модуляції (активізації, інгібування) SIRT1 та протівірусну (анти COVID-19) активність.

Зокрема встановлено, що:

- 1.** Високий потенціал інгібування SIRT1 в сполуках ряду N-ацилгідрозонів зумовлений їх зв'язуванням з каталітичним сайтом рецептора та спорідненістю похідних N-ацилгідрозону до SIRT1 яка пов'язана із піран-2-оновим та нафтольним або гідроксифенільним фрагментами сполук.
- 2.** В зв'язку із стеричними особливостями R-енантіомери піразолінів демонструють значно вищу спорідненість до зв'язування з SIRT1 у порівнянні з S-енантіомерами.
- 3.** Виявлені за результатами розрахунків нові сполуки з ряду імідазолів здатні діяти як високоефективні інгібітори SIRT1. Серед кращих інгібіторів - 4-імідазо[1,2-a]піридин-2-ілфеніл-1,2-діол та 4-імідазо[2,1-b][1,3]тіазол-6-ілфеніл-1,2-діол.
- 4.** Досліджені сполуки з ряду бензодіазепінів мають здатність активувати SIRT1. Наявність бензенових та піран-2-онових фрагментів у структурі досліджуваних бензодіазепінів відіграє ключову роль в забезпеченні високого рівня зв'язування. Запропонована нова похідна бензодіазепіну, 3-[4-(4-дифлуорометоксифеніл)-1,3,4,5-

тетрагідро-2Н-1,5-бензодіазепін-2-іліден]-6-метил-2Н-піран-2,4(3Н)-діон, має найбільшу зв'язуючу афінність з SIRT1.

5. Афінність зв'язування оптичних енантіомерів досліджуваних похідних бензодіазепіну суттєво не відрізняється.

6. Вивчені низькомолекулярні сполуки з ряду імідазолів, N-ацилгідрозонів та і бензодіазепінів мають значний потенціал як інгібітори проникнення вірусу SARS-CoV-2 в організм людини, що досягається через блокування взаємодії рецептор-зв'язуючого домену спайкового білка S-RBD з ангіотензинперетворювальним ферментом ACE2 людини.

7. Узгодженість результатів експериментального скринінгу (*High-throughput screening*) із результатами докінгу характеризує досліджувані сполуки як перспективні для подальшого розвитку як лікарських засобів.

6. Достовірність, наукова новизна та практичне значення одержаних результатів

Достовірність одержаних результатів і висновків підкріплені експериментальними дослідженнями з використанням підходів сучасної фізико-органічної хімії, *High-throughput скринінгу* та методів молекулярного моделювання.

Наукова новизна роботи полягає в тому, що вперше досліджено здатність сполук з ряду N-ацилгідрозонів ефективно інгібувати активність сіртуїну-1; вперше запропоновано та досліджено нові сполуки з ряду імідазолів, що мають здатність ефективно інгібувати сіртуїн-1; вперше здійснено синтез нових похідних з ряду імідазолів; вперше методами молекулярного моделювання досліджено сполуки з ряду бензодіазепінів, що мають здатність ефективно активувати сіртуїн-1; здійснено синтез досліджуваних похідних з ряду бензодіазепінів, в тому числі вперше синтезовано 3-[4-(4-дифлуорометоксифеніл)-1,3,4,5-тетрагідро-2Н-1,5-бензодіазепін-2-іліден]-6-метил-2Н-піран-2,4(3Н)-діон; За допомогою *in silico* моделювання запропоновано та обґрунтовано використання досліджуваних сполук з ряду N-ацилгідрозонів, імідазолів і бензодіазепінів як потенційних противірусних кандидатів проти SARS-CoV-2.

7. Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях. Результати дослідження достатньо повно опубліковані в наукових виданнях:

1. Kumar, S.; **Kovalenko, S.**; Bhardwaj, S.; Sethi, A.; Gorobets, N.Yu.; Desenko, S.M.; Poonam; Rathi, B. Drug Repurposing against SARS-CoV-2 Using Computational Approaches. *Drug Discov. Today* **2022**, 27, 2015–2027, doi:10.1016/j.drudis.2022.02.004.
2. V.V. Lipson, F.G. Yaremenko, V.M. Vakula, **S.V. Kovalenko**, A.V. Kyrychenko, S.M. Desenko, V.I. Musatov, P.O. Borysko, S.O. Zozulya Imidazole Derivatives as Potent Inhibitors of Sirtuin-1. *Funct. Mater.* **2023**, 30, doi:10.15407/fm30.04.486.
3. Lipson, V.V.; Yaremenko, F.G.; Vakula, V.M.; **Kovalenko, S.V.**; Kyrychenko, A.V.; Desenko, S.M.; Borysko, P.O.; Zozulya, S.O. Discovery of Novel N-Acylhydrazone Derivatives as Potent Inhibitors of Sirtuin-1. *SynOpen* 2024, 08, 100–108, doi:10.1055/s-0043-1763747.

Зроблено доповіді на міжнародних конференціях

8. Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації

Загалом високо оцінюючи дисертаційну роботу варто зазначити окремі побажання та дискусійні питання:

- 1) В роботі для ряду комплексів проведено процедуру редокінгу яка є важливим етапом молекулярного моделювання. Однак, нажаль, не представлено кількісних характеристик яві визначають геометричну відмінність теоретично реалізованої стиковки від експериментально визначеної позиції (RMSD).
- 2) Добре відомо, що процедура докінгу, яка використовує так звані «генетичні алгоритми» оптимізації не відповідає, взагалі кажучи, найкращій в енергетичному сенсі геометрії ліганду і його розташування у кармані зв'язування. В зв'язку із цим в відповідних програмах вводиться такий параметр як exhaustiveness. Крім того, зазвичай, використовують певну кількість «прогонів» процедури докінгу. Було б добре, якщо б в дисертації було наведено величину exhaustiveness та кількість прогонів. Наскільки великий розкид в результатах докінгу було отримано? Разом із тим в роботі систематично наводяться дані щодо параметрів сітки де проводиться докінг, що має незначний інформаційний сенс.
- 3) SIRT1 має два важливих карманів зв'язування. Один з них алостеричний регіон, є відповідальним за активізацію ферменту а іншій за ігібування його дії. Було б дуже цікаво співставити афінність досліджених сполук для обох сайтів.
- 4) Деякі дані недостатньо висвітлені в дисертації. Так в третьому розділі вказується, що «...для визначення гнучкого та незв'язаного (?) обертання молекул були

розраховані торсійні кути...». Що це означає ? Як були розраховані ці кути ? І якими вони власне виявились ?

- 5) До цього я б додав дискусійне питання щодо конформаційної жорсткості молекул-лігандів в процедурі докінгу. Адже використання нежорсткої молекули з «вільними» торсійними кутами зовсім не гарантує отримання найкращої моди зв'язування. Чи можливо геометрія ліганду була оптимізована і далі використовувалась у «жорсткому» варіанті ? Ці питання треба було б висвітлити.
- 6) Знається в дисертації зовсім не було використано гнучкий за амінокислотними залишками (flexible) докінг. А жаль! У купі із розрахунками для «жорсткого» та «нежорсткого» ліганду, а також розрахунок при наявності кількох молекул води в кармані зв'язування (таке було зроблено в роботі), отримані дані могли б бути цінними з методичної точки зору. Крім того гнучкість рецептору може бути важливим фактором для розуміння біохімічного процесу активації ферменту.

Вказані зауваження, є більш технічними або носять характер побажань. Вони не зачіпають суті роботи, її принципових положень та висновків і не впливають на її високу оцінку.

9. Загальний висновок та оцінка дисертації

Загалом дисертаційна робота Світлани Коваленко представляє собою самостійне, цілісне та завершене наукове дослідження з хімії і біологічної дії імідазолів, N-ацилгідразонів та бензодіазепінів щодо біологічних мішеней – SIRT1 та спайкового білка S-RBD коронавірусу SARS-CoV-2. Робота виконана на високому сучасному рівні. Поставлені задачі дисертаційного дослідження успішно реалізовані. Анотація повною мірою відповідає змісту дисертації і не містить інформації, яка була б відсутньою в роботі. Зроблені автором висновки є обґрунтованими. Текст дисертації оформлений відповідно до вимог діючого Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567 «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів».

В зв'язку з вищевказаним я вважаю, що дисертаційна робота Коваленко Світлани Вікторівни повністю відповідає вимогам Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у вищих навчальних закладах (наукових установах) затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 року №261 (зі змінами і доповненнями від 03 квітня 2019 року №283), пунктам 6-9 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової

спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 10, за спеціальністю 102 – Хімія.

Офіційний опонент,
професор кафедри хімічного матеріалознавства
Харківського національного університету
імені В. Н. Каразіна,
доктор хімічних наук, професор

Володимир ІВАНОВ