

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Булденка Владислава Миколайовича «Сульфонілкалікс[4]арен як платформа для конструювання інгібіторів фосфатаз», поданої до спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01 при Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В. П. Кухаря НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Актуальність теми. Одним із надважливих фундаментальних і одночасно прикладних напрямків досліджень в сучасній біоорганічній хімії, а разом з тим і в органічній хімії та медичній хімії – є пошук та ідентифікація нових платформ для дизайну лікарських сполук. Тому актуальними є дослідження біологічної активності макроциклічних сполук каліксаренового ряду, які обумовлені просторовою тривимірною будовою даних макроциклів та можливістю їх полі- та гетерофункціоналізації однаковими та різними фармакофорними групами. При цьому саме завдяки кооперативному ефекту макроциклічної платформи та замісників на неї і досягається їх значна біологічна активність, підтверджена численними дослідженнями в тому числі і клінічними. Тому, дисертаційна робота Булденка В.М. яка присвячена дослідженню тетрагідроксисульфонілкаліксаренів як інгібіторів фосфатаз є актуальною та перспективною для пошуку нових селективних інгібіторів окремих представників таких ферментів. Відомо, що гіперекспресія, мутації чи інші зміни в активності протеїнтирозинфосфатаз можуть сприяти розвитку патологій, включаючи рак, метаболічні та автоімунні хвороби. Підвищена активність лужних фосфатаз спостерігається при патологіях кісткової системи, печінки та інших органів. До класу лужних фосфатаз відносяться і нуклеотидпірофосфатази/фосфодіестерази, незначне зростання експресії яких спричиняє порушення процесів ангиогенезу, кісткової мінералізації тощо.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Ще одним доказом актуальності та перспективності роботи є те що вона мала значне грантове фінансування. Так робота була складовою частиною науково-дослідних робіт Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В.П. Кухаря НАН України (тема 2.1.10.13-15 «Дослідження механізмів біологічної активності органічних сполук в модельних системах», № держреєстрації 0115U002593; тема ЦНП 9.1-12 «Розвиток методів синтезу, дослідження властивостей і механізмів дії нових потенційно біоактивних сполук», № держреєстрації

0112U002657; тема ЦПФД 1-17 «Синтези азотистих гетероциклів і фосфороорганічних сполук та дослідження їх біологічної активності», № держреєстрації 0117U000096).

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, які викладені у дисертаційній роботі. Дисертаційна робота Булденка Владислава Миколайовича добре спланована як стратегічно, так і тактично. Автором вдало обрано об'єкти дослідження, коректно підібрані методи біохімічних досліджень ензиматичних реакцій, квантово-хімічних розрахунків, докінгу та флюоресцентну спектроскопію. Автор дисертації провів систематичне дослідження впливу незаміщеного тетрагідроксисульфонілкалікс[4]арену та його фосфорильованих, *трет*-бутильних та трифторацетамідних похідних на ряд людських протеїнтирозинфосфатаз (TC-PTP, SHP2, MEG2, MEG1, PTP1B та PTP β), лужні фосфатази, нуклеотидпірофосфатазу I (NPP1). Вагомими є також досліди по зв'язуванню з людським сироватковим альбуміном. Важливо, що ці дослідження підкріплені теоретичними розрахунками з докінгу та є порівняльними відносно раніше досліджуваних платформ калікс[4]арену та тіакалікс[4]арену. Дисертант при виконанні та написанні дисертаційної роботи дотримувався принципів академічної доброчесності. Наукові положення обґрунтовані наявним експериментальним матеріалом. На отриманих результатах базуються і зроблені висновки.

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна роботи не викликає сумнівів, тому що в роботі вперше досліджено інгібуючу здатність та закономірності впливу сульфонілкалікс[4]арену на протеїнтирозинфосфатази (TC-PTP, SHP2, MEG2, MEG1, PTP1B та PTP β). Було показано, що незаміщений сульфонілкалікс[4]арен здатний вибірково інгібувати протеїнтирозинфосфатазу MEG2. На основі кінетичних досліджень і результатів молекулярного докінгу обґрунтовано механізми інгібування PTP1B, MEG2 і NPP1 похідними сульфонілкалікс[4]арену. Встановлено закономірності впливу сульфонілкалікс[4]арену та його похідних на активність NPP1 як селективних інгібіторів цього ферменту. Виявлено, що вони є ефективними інгібіторами ферменту з мікромолярними значеннями IC₅₀. Отримані результати вказують на здатність функціоналізованих сульфонілкалікс[4]аренів селективно по відношенню до лужних фосфатаз інгібувати активність NPP1. За допомогою методу гасіння флуоресценції білків. Показана здатність сульфонілкалікс[4]арену та його похідних утворювати комплекси з людським сироватковим альбуміном, що також підтверджується результатами комп'ютерного моделювання та їх впливом на протікання псевдоферментативних реакцій альбуміну. На основі експериментальних даних та молекулярного докінгу показана роль біоізостерних фосфоновокислих та фосфіновокислих замісників та макроциклічної

платформи в механізмах утворення фермент-інгібіторного комплексу. Продемонстрована, перспективність фосфінових кислот на платформі калікс[4]аренів як інгібіторів людських РТРаз. При цьому сульфонілкалікс[4]арен із фрагментами метилен(феніл)фосфінової кислоти був найефективнішим, а відповідна похідна тіакалікс[4]арену демонструвала найкращу селективність щодо РТР1В у порівнянні з ТС-РТР, МEG1, МEG2 і SHP2.

Теоретичне та практичне значення результатів дослідження. Очевидно, ці та інші вперше опубліковані автором результати дисертаційного дослідження створюють підґрунтя для дизайну високоефективних та селективних інгібіторів ряду фосфатаз на основі сульфонілкаліксарену, а з огляду на систематичні дослідження відділу механізмів біоорганічних реакцій, в якому виконана дисертаційна робота, і для створення каліксаренових регуляторів активності будь-яких фосфатаз. Результати дисертаційної роботи обґрунтовують зв'язок між структурою та інгібувальною здатністю калікс[4]аренів і формують підходи до створення нових ефективних і селективних інгібіторів фосфатаз серед похідних сульфонілкалікс[4]арену, що може бути важливим при розробці нових лікарських засобів для лікування діабету 2 типу, ожиріння та раку.

Аналіз дисертаційної роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, шести розділів, висновків та списку використаних джерел, до складу якого входить 227 найменувань. Дисертаційна робота викладена на 143 сторінках машинопису і містить 16 таблиць, та 33 рисунки.

Вступ за змістом і об'ємом повністю відповідає існуючим вимогам.

В **першому розділі** (огляд літератури „Фосфатази як біомішені та їх інгібітори”) автор послідовно і критично аналізує стан літератури до 2019 року, щодо піднятої наукової проблеми, акцентує увагу на перспективах створення нових інгібіторів, в тому числі на платформі каліксаренів. В цілому огляд побудований на вдало класифікованому і значному фактичному матеріалі, формуючи враження про дисертанта як кваліфікованого дослідника.

Другий розділ присвячено опису матеріалів дослідження і методів, що були використані. Слід відмітити, що такі дослідження є технічно непростими, достатньо дорогими і, безперечно, здобутком дисертанта є опанування прийомами роботи з препаратами ферментів та білків. З іншого боку, В. М. Булденко показав, що може використовувати спектрофотометричний і спектрофлуориметричний методи, раціонально застосовувати кінетичні обрахунки, молекулярний докінг, статистичний аналіз.

В наступних розділах наведено результати виконаних біоорганічних досліджень. В **третьому розділі** досліджено вплив сульфонілкалікс[4]арену та його похідних на активність ряду протеїнтирозинфосфатаз. Показано, що на відміну від калікс[4]арену та

тіакалікс[4]арену, сульфонілкалікс[4]арен здатен інгібувати ці ферменти і проявляє селективність відносно MEG2. Значення IC_{50} для даного ферменту (1.4 мкМ) більше ніж у шість разів нижче за РТР1В фосфатазу і в десять та більше разів за інші ферменти. Цікаво, що результати докінгу добре узгоджуються з експериментальними даними. Комплекс з MEG2 має меншу вільну енергію та в ньому реалізується більша кількість водневих зв'язків між ферментом та інгібітором. Тому були проведені подальші дослідження фосфоновокислої, фосфонатної, *трет*-бутильованої та трифтороацетамідної похідних сульфонілкалікс[4]арену. Було встановлено, що всі сполуки інгібують дані ферменти, але найбільшу активність, з IC_{50} від 0.17 до 0.4 мкМ проявляє фосфонова кислота. Також серед цих похідних було знайдено сполуку що володіє більше ніж семикратною селективністю до РТР1В, це полярна але неіоногенна тетракіс-трифтороацетамідна похідна сульфонілкалікс[4]арену. Як і для незаміщеного сульфонілкалікс[4]арену були обчислені константи інгібування для фосфоновокислої та трифтороацетамідної похідних. Були проведені ґрунтовні теоретичні розрахунки: докінг та молекулярна динаміка і показано способи і шляхи облаштування інгібіторів у активному центрі ферменту, причому проаналізовані всі чотири можливі конформації інгібітора.

В **четвертому розділі** автор досліджує новий ряд каліксаренових похідних, а саме макроцикли тетразаміщені по верхньому вінцю залишками фосфінових кислот. Було досліджено інгібуючу дію на протеїнтирозинфосфатази відповідного калікс[4]арену, тіакалікс[4]арену та сульфонілкалікс[4]арену. І в цьому ряду чітко виявлена така закономірність: із збільшенням розмірів макроциклу та його конформаційної рухливості значно зростає біологічна дія. Найбільш ефективним але неселективним виявився сульфонілкаліксарен з IC_{50} до 79 нМ. А тіакаліксарен показав майже десятикратну селективність по відношенню до РТР1В. Аналогічно попередній групі каліксаренів були обчислені константи інгібування та проведені теоретичні розрахунки з докінгу і показано місця облаштування інгібіторів у активному центрі ферменту.

В **п'ятому розділі** досліджувалась інгібіційна здатність ряду сульфонілкалікс[4]аренів відносно нуклеотидпірофосфатази/фосфодіестерази 1, яка розглядається як потенційна терапевтична мішень. Але літературні дані про інгібування цього ферменту не є надто чисельними. Враховуючи той факт, що NPP1 належить до надродини лужних фосфатаз і існує певна подібність у структурі активних центрів цих ферментів, сульфонілкалікс[4]арен та його похідні є перспективними інгібіторами NPP1. Результати попередніх кінетичних дослідів, показали, що сульфонілкалікс[4]арен із фосфоновокислими групами виявляє інгібувальну активність тільки відносно NPP1 і не впливає на активність лужних фосфатаз з кишок бика та з плаценти людини. Це свідчить

про те, що селективність інгібування дійсно може бути обумовлена особливостями макроциклічного каркасу, модифікованого сульфонільними групами. В той же час значно сильнішу інгібуючу дію показала неіоногенна трифтороацетамідна похідна. Були проведені теоретичні розрахунки з докінгу і показано місця можливого облаштування інгібітору у активному центрі NPP1. Але найбільш цікавим є дослідження не на чистому ферментів, а на сироватці крові. В цих дослідженнях фосфонова кислота підтвердила свою активність, в той час як трифтороацетамід не показав здатності до інгібування фосфодіестеразної активності сироватки крові людини.

У досить великому **шостому розділі** досліджувалась взаємодія похідних сульфонілкалікс[4]арену з людським сироватковим альбуміном (ЛСА). Відомо, що головною функцією, яку виконує альбумін, є транспорт наявних в кровеносному та лімфатичному руслі сполук екзогенного і ендогенного походження. Як виявляється, сильна чи слабка асоціація сполук з альбуміном має ряд недоліків. Так, сполуки зі слабкою спорідненістю гірше транспортуються до мішені та швидше зазнають метаболічних перетворень, що обумовлює, наприклад, низький терапевтичний ефект лікарських засобів. З іншого боку, міцно зв'язані лікарські агенти не досягають мішені, оскільки, перебуваючи в комплексі, не можуть перетнути мембрани капілярів, нефронів, чи гемато-енцефалічний бар'єр. Крім того альбумін виявляє псевдоферментативну активність, він здатен гідролізувати естери (естеразна активність); іншою ферментативною реакцією сироваткового альбуміну є так звана реакція елімінування Кемпа, в основі якої лежить каталітичне перетворення 5-нітробензізоксазолу до 2-гідрокси-5-нітробензонітрилу.

Дослідження зв'язування ЛСА з калікс[4]ареном, тіакалікс[4]ареном і сульфонілкалікс[4]ареном, їх фосфонатними та фосфоновокислими похідними досліджували різними фізико-хімічними та біохімічними методами. З використанням флуоресцентної спектроскопії були знайдені константи гасіння Штерна-Вольмера, які характеризують силу зв'язування. Подальші дослідження залежності даної константи від температури дозволили встановити, що ефект гасіння флуоресценції білка за наявності як незаміщених, так і заміщених калікс[4]аренів обумовлено швидше утворенням комплексу, ніж просто зіткненнями з флуорофором. Крім того, спектри поглинання ЛСА, отримані за наявності вихідних макроциклів та без них, не виключають можливості утворення комплексів між білком та лігандами, що досліджувались. Подальший аналіз рівноважного стану між вільними і зв'язаними молекулами з урахуванням кількості центрів зв'язування дозволив розрахувати константу зв'язування K_b . Для всіх каліксаренів вона є в межах $10^4 - 10^6$ Л/моль, але найсильніше зв'язується сульфонілкалікс[4]арен з

константою $2.73 \cdot 10^6$ Л/моль. Наступні дослідження були направлені на встановлення ймовірного місця зв'язування, або деяких з них. Для цього були використані вже раніше згадані псевдоестеразна активність альбуміну та елімінування Кемпа. Відомо, що каталітичні центри даних реакцій знаходяться у в сайті Судлоу II субдомену IIIA альбуміну, де знаходиться залишок Tyr411, та сайті Судлоу I субдомену IIА, в якому знаходиться залишок Lys119, які і забезпечують (псевдо)ферментативні перетворення. Згідно експериментів сульфонілкалікс[4]арен та інші каліксарени інгібували дані перетворення. Отже, експериментальні дані, а також комп'ютерне моделювання показали, що досліджені калікс[4]арени можуть взаємодіяти з людським сироватковим альбуміном і зв'язування значно зростає при переході від калікс[4]арену до сульфонілкалікс[4]арену. При цьому згідно результатів інгібування псевдоферментативної активності альбуміну, сайт Судлоу II субдомену IIIA альбуміну та сайт Судлоу I субдомену IIА можуть бути найбільш сприятливим місцем для облаштування калікс[4]аренів. При цьому результати молекулярного докінгу також вказують на можливість облаштування молекули сульфонілкалікс[4]арену в області сайту IIВ.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах і авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 11 робіт, з них 4 статті у фахових наукових журналах, 2 статті в науковому збірнику і тези 4 доповідей. Отримано 1 патент України на винахід. Опубліковані результати достатньо повно відображають зміст дисертаційної роботи. Автореферат дисертації як за структурою, так і за змістом відповідає основним положенням дисертації.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом виконано експериментальну частину роботи, проведено теоретичні розрахунки, а також здійснено аналіз результатів кінетичних досліджень та докінгу. Планування досліджень, обговорення отриманих результатів та механізмів відбувалося спільно з науковим керівником – чл. кор. НАН України А.І. Вовком. Молекулярний докінг і розрахунки методом молекулярної динаміки було проведено дисертантом за участю к.х.н. О.Л. Кобзаря.

Зауваження та загальна оцінка роботи. Робота містить багато пізнавального матеріалу, написана гарною українською мовою, добре вичитана, має мінімальну кількість друкарських помилок. Необхідно зазначити, що наукові положення, висновки, практичні рекомендації, які сформульовані в дисертації цілком обґрунтовані і не викликають сумнівів. Це підтверджується результатами ретельно виконаних експериментальних досліджень інгібуючої дії сульфонілкалікс[4]аренів на ряд протеїнтирозинфосфатаз, лужні фосфатази та нуклеотидпірофосфатазу/фосфодіестеразу I

та на людський сироватковий альбумін, які доповнені комплексними розрахунками констант інгібування та докінгу найбільш сильних інгібіторів в активний сайт ензиму

Загальна оцінка роботи є беззаперечно **позитивною**. Високо оцінюючи експериментальний рівень дисертаційної роботи, слід, проте, відмітити деякі зауваження та запитання:

- У розділах 3-6 проводяться теоретичні дослідження методом докінгу зв'язування найбільш активних сульфонілкалікс[4]аренів в активні центри ферментів. При цьому для розрахунків використовуються всі чотири можливі конформації макроциклів. Але спектральні дані свідчать, що дані макроцикли існують у розчинах у вигляді однієї високосиметричної конформації, а дані рентгеноструктурних досліджень однозначно вказують що це конформація конус (*сплощений* або *регулярний*). Тому виникає запитання, які є підстави використовувати для розрахунків докінгу всі відомі конформації, адже експериментальні дані вказують лише на конусоподібну будову?
- У п'ятому розділі показано, що найбільш сильними інгібіторами нуклеотидпірофосфатази/фосфодіестерази I (NPP1) є сульфонілкалікс[4]арен тетрафосфонова кислота та сульфонілкалікс[4]арен тетра(трифторо)ацетамід (останній є більш ефективним). Подальші дослідження з інгібування фосфодіестеразної активності сироватки людини виявили, що серед цих двох сполук тільки фосфонова кислота здатна інгібувати дану активність, а у амідної похідної ця дія повністю відсутня. На мій погляд це є дуже дивним, адже певна кореляція повинна зберегтись. Чим можна пояснити повну відсутність інгібуючого впливу трифтороацетамідної похідної сульфонілкалікс[4]арену на діестеразну активність сироватки, з огляду на значне інгібування активності ізольованої нуклеотидпірофосфатази/фосфодіестерази I?
- У шостому розділі експериментально знайдено константи зв'язування різних калікс[4]аренів з людським сироватковим альбуміном. Виявилось що менш полярні макроцикли (незаміщені каліксарени, естери фосфонових кислот) зв'язуються міцніше ніж більш полярні каліксаренфосфонові кислоти. Але на поверхні цього протеїну багато позитивно-заряджених ділянок і ми повинні очікувати обернені результати: більш сильне комплексоутворення з фосфовими кислотами завдяки водневим зв'язкам підсиленням іонними (зарядовими) взаємодіями. Чим можна пояснити такі експериментальні дані?

Ці зауваження не торкаються основних досягнень дисертаційної роботи, яка оформлена у відповідності з діючими вимогами.

Відповідність дисертації п.11 «Порядку присудження наукових ступенів». На підставі вищевикладеного вважаю, що представлена дисертаційна робота Булденка

Владислава Миколайовича «Сульфонілкалікс[4]арен як платформа для конструювання інгібіторів фосфатаз», є закінченою науково-дослідною роботою і за актуальністю тематики, обсягом виконаних досліджень, новизною отриманих результатів, ступенем обґрунтованості наукових положень і рекомендацій, повнотою викладення результатів роботи у фахових виданнях теоретичним і практичним значенням відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 року зі змінами внесеними згідно з постановою КМУ №656 від 19.09.2015р., №1159 від 30.12.2015р., та №567 від 27.07.2016р., які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор Булденко Владислав Миколайович заслуговує присудження ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Офіційний опонент:

завідуючий лабораторії медико-біологічних досліджень

відділ №5, Інституту органічної хімії НАН України

старший науковий співробітник,

кандидат хімічних наук



Родік Р.В.

