

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Котея Ігоря Михайловича «Нові інгібітори протеїнкіназ FGFR1 та CK2 на основі похідних тієно[2,3-*d*]піримідину», 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.

Однією з важливих задач біоорганічної хімії є синтез нових ефективних та нетоксичних біоактивних сполук. Саме в цій області виконана дисертаційна робота І. М. Котея, яка присвячена пошуку низькомолекулярних інгібіторів протеїнкіназ FGFR1 та CK2 людини на основі похідних тієно[2,3-*d*]піримідину. За останні роки вказані протеїнкінази активно використовувалися для мішень-спрямованого синтезу відповідних інгібіторів та створення на їх основі лікарських препаратів нової генерації.

Протеїнкіназа FGFR1 належить до родини рецепторних тирозинкіназ. Взаємодія ліганда FGF з рецептором призводить до активації внутрішньоклітинного протеїнкіназного домену, що залучений до подальшої трансдукції сигналу. Активація цих сигнальних каскадів відіграє важливу роль у регуляції різних процесів у клітині, таких як проліферація, диференціація та апоптоз. Експериментальні факти свідчать, що надекспресія або підвищена активність FGFR1 обумовлює розвиток різних пухлин, включаючи рак легень, молочної залози, простати, а також мієлопроліферативних захворювань. Зважаючи на значну роль FGFR1 у процесі канцерогенезу, цей фермент є перспективною молекулярною мішенню для розробки нових протиракових препаратів.

Протеїнкіназа СК2, яка належить до класу серин-треонінових кіназ, бере участь у регуляції транскрипції, клітинного циклу, контролі росту клітин, морфогенезі і таке інше. Незважаючи на те, що СК2 є об'єктом інтенсивного вивчення протягом останніх десятиліть, її біологічна роль та способи регуляції активності залишаються не до кінця зрозумілими. Отже, нові ефективні й селективні інгібітори СК2 можуть бути корисним інструментом для розширення знань стосовно функцій СК2.

Актуальність теми дисертаційної роботи як з наукової, так і з практичної точок зору, не викликає сумнівів оскільки онкологічні захворювання займають друге місце серед причин смертності людей у всьому світі.

Дисертація І.М. Котей є комплексним дослідженням, в якому вдало поєднано дизайн та хімічний синтез похідних тієно[2,3-*d*]піримідину, з методами їх молекулярного моделювання та біологічного тестування, що є характерною ознакою сучасних підходів пошуку потенційних терапевтичних засобів

При виконанні дисертаційної роботи автором власноруч здійснено органічний синтез, проведено аналіз спектральних досліджень і встановлено структури отриманих сполук. І.М. Котей створив віртуальні бібліотеки хімічних сполук та підготував їх для подальшого використання у віртуальному скринінгу. Запропоновано також напрями хімічної оптимізації синтезованих похідних.

Дисертаційна робота викладена на 160 сторінках і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, які викладено у двох розділах, висновків, списку літератури, що містить 111 найменувань, та 2 додатків.

Перший розділ – огляд літератури присвячений похідним тієно-[2,3-*d*]піримідину, які виявляють інгібувальну активність щодо протеїнкіназ і володіють антипроліферативною активністю.

Другий розділ дисертаційної роботи – матеріали і методи досліджень дає змогу оцінити матеріально-технічну базу лабораторії. Слід зауважити, що для виконання роботи використовувалось сучасне програмне забезпечення, сертифіковані реактиви та матеріали для хімічних та біохімічних досліджень, що сприяло отриманню достовірних результатів.

В двох наступних розділах дисертантом представлені результати власних досліджень. Для пошуку нових інгібіторів протеїнкінази FGFR1 було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторної бібліотеки похідних N-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-аміну, що налічувала більше 2000 речовин. За результатами скринінгу для біохімічного тестування було відібрано 35 сполук. Проведене тестування *in vitro* виявило 14 сполук, що пригнічували активність FGFR1 у мікромольному діапазоні. На основі отриманих даних зроблені висновки стосовно залежності активності сполук від хімічної структури замісників. При дослідженні комплексів похідних N-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-аміну з АТФ-акцепторним сайтом FGFR1 виявилось, що міжмолекулярні водневі зв'язки між лігандом та рецептором роблять основний внесок у стабілізацію інгібіторів в активному сайті протеїнкінази FGFR1. Дві сполуки досліджено на інгібувальну активність щодо шести протеїнкіназ людини. З одержаних результатів тестування випливає, що вони є селективними інгібіторами FGFR1. П'ять похідних, які мають інгібувальну активність щодо FGFR1 у субмікромольному діапазоні, додатково було протестовано на антипроліферативну активність щодо клітинної лінії гострої мієлоїдної лейкемії KG1. Показано, що дві з них найкраще

інгібують ріст ракових клітин зі значеннями IC_{50} рівними 26,2 та 16,2 мкМ відповідно.

Для пошуку нових інгібіторів СК2 серед похідних (тієно[2,3-*d*]-піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти було синтезовано й досліджено на інгібувальну активність щодо протеїнкінази СК2 28 похідних цього класу. Проведені експерименти продемонстрували, що 21 сполука пригнічує активність СК2 більш ніж на 50 % у діапазоні концентрацій від 0,1 до 33 мкМ. Результати кінетичних досліджень найбільш активної похідної (тієно[2,3-*d*]піримідин-4-ілтію)карбонової кислоти свідчать про АТФ-конкурентний спосіб інгібування протеїнкінази СК2. Значення K_i становить 40 нМ.

Цікавими виявилися результати пошуку інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 4-амінотієно[2,3-*d*]піримідину. Для ретельного дослідження цього класу сполук синтезовано 39 похідних та досліджено їх інгібувальні властивості. Серед них ідентифіковано 7 високоактивних інгібіторів протеїнкінази СК2 ($IC_{50} = 0,83-0,008$ мкМ). До найактивніших інгібіторів СК2 належать сполуки 3-{{5-(4-метилфеніл)тієно[2,3-*d*]піримідин-4-іл}аміно}бензойна кислота ($IC_{50} = 0,01$ мкМ), 3-(5-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-іламіно)бензойна кислота ($IC_{50} = 0,065$ мкМ) і 3-(6-метил-5-фенілтієно[2,3-*d*]піримідин-4-іламіно)бензойна кислота ($IC_{50} = 0,008$ мкМ). При дослідженні активності цих інгібіторів на панелі з семи протеїнкіназ (FGFR1, Tie-2, HGFR1, Aurora A, JNK3, ROCK1 і ASK1) було виявлено, що вони демонструють хорошу селективність щодо СК2.

Таким чином, у дисертаційній роботі за допомогою рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу, біохімічного тестування та хімічної оптимізації отримано нові інгібітори протеїнкіназ FGFR1 та СК2. Вивчено способи зв'язування цих сполук з АТФ-акцепторними сайтами ферментів. Встановлено залежність інгібувальної дії інгібіторів від їх структурних

особливостей. Будова синтезованих сполук не викликає сумнівів. Їх структура доведена використанням сучасних методів. Ці здобутки І.М.Котея свідчать про те, що автор прекрасно володіє різноманітними методами та прийомами біоорганічної хімії.

Високо оцінюючи експериментальний рівень дисертаційної роботи, слід, проте, відмітити, що вона містить деякі недоліки та викликає низку запитань:

1. З даних, наведених у таблицях 3.2 та 4.3, випливає, що у присутності деяких похідних тієно[2,3-*d*]піримідину залишкова активність кіназ перевищує 100%. Як можна пояснити цей факт?

2. Результати роботи свідчать про те, що інгібувальна активність сполук 3.35 та 3.36 майже однакова (табл. 3.1), тоді як їх антипроліферативний ефект відрізняється майже удвічі. Як би Ви це прокоментували?

3. В роботі зустрічаються невиправлені помилки. Вони є, наприклад, у тексті роботи (ст. 107, 110, 120, 124). З помилками наведено будову деяких замісників у таблицях 3.1, 4.1 та 4.2, а також на схемах 3.2, 4.1 і 4.3. Ці зауваження не мають кваліфікаційного характеру, вони не стосуються суті роботи, а відносяться до її оформлення і тому не впливають на високу позитивну оцінку виконаних досліджень. Дисертація є змістовим, продуманим і ретельно виконаним дослідженням і завершеною науковою роботою, в якій одержано фундаментальні результати щодо структури і властивостей інгібіторів FGFR1 та CK2. Достовірність одержаних даних та наукових положень і висновків роботи ґрунтується на ретельно виконаних експериментах (які доповнюють один одного), та на коректній їх інтерпретації.

Автореферат повністю відображає зміст дисертації.

Враховуючи актуальність теми роботи, наукову новизну і значимість отриманих результатів та їх практичну цінність, можна стверджувати, що дисертаційна робота Котея Ігоря Михайловича відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 07.03.2007 р № 423 щодо присудження наукового ступеня кандидата хімічних наук. Котей І. М., безумовно, заслуговує присудження йому наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Офіційний опонент:

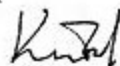
доктор біологічних наук, професор

старший науковий співробітник

відділу синтезу фізіологічно активних сполук фосфору

Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії

ім. В.П. Кухаря НАН України



Кібірев В. К.

Підпис Кібірева В.К.
З А С В І Д Ч У Ю
Учений секретар
ІБОНХ ім. В.П. Кухаря НАН України
" " " " 20 " " " "

