

## ВІДГУК

на дисертаційну роботу Приходька А.О. “Пошук нових інгібіторів протеїнкінази СК2 серед похідних 4*H*-4-хроменону”, представлену на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія

Поєднання методів молекулярного моделювання, хімічного синтезу та біологічного тестування є характерною ознакою сучасних підходів пошуку потенційних терапевтичних засобів. Ферменти найчастіше виступають у ролі молекулярних мішеней. Одним із таких ферментів, що належить до класу серин-треонінових протеїнкіназ, є протеїнкіназа СК2, яка контролює значну кількість клітинних процесів. 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. Одним із підходів, який застосовують для вивчення функцій протеїнкіназ, є використання специфічних низькомолекулярних інгібіторів, але поки що жоден із відомих інгібіторів СК2 не використовують у клінічній практиці. Отже, пошук нових специфічних інгібіторів СК2 з високою активністю залишається актуальним.

Дисертаційна робота Приходька А.О. присвячена пошуку нових інгібіторів протеїнкінази СК2 в ряду похідних 7-гідрокси-3-арилокси-4*H*-4-хроменону, флавону та тетрагалогенофталіміду.

Автором проведено розрахунок та дослідження молекулярної динаміки протеїнкінази СК2 та її комплексів з низькомолекулярними інгібіторами, побудовано модель взаємодії синтезованих інгібіторів з амінокислотними залишками активного сайту ферменту та вивчено селективність отриманих інгібіторів СК2 в ряду протеїнкіназ. Здобувач досконало володіє методами комп'ютерного моделювання та органічного синтезу, розробив методики і вперше отримав ряд невідомих раніше гетероциклічних сполук та дослідив закономірності їх зв'язування в АТФ-акцепторному сайті протеїнкінази СК2.

Дисертаційна робота викладена на 167 сторінках і складається зі вступу, 6 розділів, висновків, списку літератури, що містить 117 найменувань, та 3 додатків.

Перший розділ – огляд літератури, в якому систематизовано відомості про інгібітори протеїнкінази СК2. В огляді узагальнено дані стосовно більш як 20 класів відомих інгібіторів гетероциклічної природи. Дисертант ретельно обробив значний об'єм літератури, проаналізував величезний спектр АТФ-конкурентних інгібіторів протеїнкінази СК2 та виявив, що фактично всі інгібітори мають ті чи інші недоліки і потребують подальшої оптимізації. Критична оцінка здобутків колег дала можливість автору спланувати власні дослідження.

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 трьох наступних розділах дисертантом представлені результати власних досліджень. На основі даних молекулярного докінгу комбінаторної бібліотеки похідних 3-арилокси-4*H*-4-хроменону для біохімічного тестування було відібрано 90 сполук. У результаті досліджень *in vitro* встановлено, що 13 із цих сполук інгібують активність протеїнкінази СК2 зі значенням  $IC_{50}$  менше ніж 33 мкМ. На основі отриманих даних зроблені висновки стосовно залежності активності сполук від хімічної структури замісників. При дослідженні комплексів похідних 3-арилокси-4*H*-4-хроменону з АТФ-акцепторним сайтом СК2 виявилось, що міжмолекулярні водневі зв'язки між лігандом та рецептором були відсутні. Таким чином, автор вважає, що гідрофобні взаємодії роблять основний внесок у стабілізацію інгібіторів в активному сайті протеїнкінази СК2.

Для пошуку нових інгібіторів протеїнкінази СК2 було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг комбінаторної бібліотеки, яка включала близько тисячі похідних флавонів. За результатами докінгу було синтезовано 13 похідних флавону, проведено біохімічне тестування *in vitro*.

Виявлено, що 5 карбоксиловмісних флавонів із 13 протестованих інгібували протеїнкіназу СК2 з  $IC_{50}$  менш ніж 10 мкМ.

За результатами біологічного скринінгу та розробленою моделлю взаємодії найбільш важливими замісниками є гідроксильна група в положенні 3 гетероциклу та 4'-карбоксильна група в фенільному ядрі. Усі досліджувані сполуки мали субмікромолярні значення  $IC_{50}$ . Кінетичні дослідження двох найбільш активних похідних флавону продемонстрували АТФ-конкурентний спосіб інгібування протеїнкінази СК2. Значення  $K_i$  становили 13 нМ і 2.5 нМ.

Зважаючи на те, що флавонові інгібітори протеїнкінази СК2 природного походження широко використовуються в дослідженнях, розроблені нові синтетичні похідні 4'-карбоксифлавону розширюють межі застосування цього класу сполук. Подальша оптимізація похідних флавону з карбоксильною групою в фенільному заміснику дозволила отримати сполуки, що володіють значно вищою інгібувальною активністю, ніж їхні природні похідні. Значення  $IC_{50}$  (4нМ) є приблизно в 100 разів нижчим, ніж фізетину, найбільш активного серед відомих природних флавонів, здатних інгібувати СК2.

Цікавими виявилися результатами рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу комбінаторної бібліотеки, що налічувала близько 1000 похідних тетрагалогенфталіміду. Для ретельного дослідження цього класу сполук синтезовано комбінаторну бібліотеку, що налічувала 68 похідних тетрагалогенофталіміду та досліджено їх інгібувальні властивості. Шість сполук пригнічували активність протеїнкінази СК2 більше, ніж на 80% при концентрації 10 мкМ. Значення  $IC_{50}$  цих сполук знаходилися в діапазоні від 0.15 мкМ до 1.5 мкМ. При дослідженні активності цих сполук на панелі з п'яти протеїнкіназ (СК2, CDK5, GSK3, DYRK1 $\alpha$  і MSK1) 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 протеїнкінази СК2. Вивчено способи

зв'язування цих сполук з АТФ-акцепторним сайтом фермента. Встановлено залежність інгібувальної дії інгібіторів від їх структурних особливостей.

Звичайно дисертаційна робота не позбавлена деяких недоліків. Наприклад, актуальність теми у вступі дисертаційної роботи та авторефераті відрізняються. В огляді літератури доречно було б систематизувати гетероциклічні системи в залежності від природи гетероатома та їх кількостей в циклічних фрагментах. Доречність розділу 3.3 в дисертаційній роботі потребує додаткових пояснень. При отриманні водорозчинних сполук навряд чи можна було сподіватись, що введення 3-діалкіламіно-2-гідроксипропільних замісників вплине тільки на розчинність похідних 3-арилоксихромону. Крім того, в дисертаційній роботі трапляються невдалі висловлювання та неточності: "Піроло[1,2-а]хіноксаліновий гетероцикл є основою важливого класу сполук, що володіє багатьма біологічними властивостями"; "АмінOMETИЛОВАННЯ проводили при кип'ятінні 0.1 моль відповідного 6-гідроксифлавоу в розчині абсолютного діоксану (10-20 мл, при необхідності додавали абс. ДМФА)"; "Аналіз (C<sub>17</sub>H<sub>9</sub>I<sub>4</sub>NO<sub>4</sub>) C,H, N,I. Found (%) C 25.8; H 1.15; N 1.77; I 63.52. Вихід 88%". Елементний аналіз варто привести для всіх синтезованих сполук.

В цілому робота не містить суттєвих недоліків і заслуговує на позитивну оцінку.

Приходько А.О. виконав цікаве синтетичне дослідження на високому науковому рівні і заслуговує присудження наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Офіційний опонент:

доктор хімічних наук,  
старший науковий співробітник,  
завідувач відділу хімії білків та пептидів  
ІБОНХ НАН України

О.Б. Смолій

