

Российско-Армянского университета

д. филос. н., профессор, П.С. Аветисян

Научная новизна

Главным теоретическим и практическим результатом работы является разработка вычислительного фреймворка, включающий подход без пространственного выравнивания (alignment-free) где карман связывания представляется в виде трехмерного облака точек, аннотированного физико-химическими свойствами (включая электростатические потенциалы по уравнениям Пуассона–Больцмана и Кулона). Так же использованием спектральных отпечатков (Spectral-DNA), на основе которого карман центра моделируется как геодезический граф, а его геометрия и химические свойства кодируются с помощью спектрального анализа Лапласиана графа. Новизна работы включает использование методов кластеризации и отбора медиан, где матрица спектральных расстояний кластеризуется (методами Affinity Propagation), сжимая ансамбль из сотен кристаллографических структур до компактного набора репрезентативных конформаций. На примере 342 структур главной протеазы SARS-CoV-2 соискатель показал, что высокое разрешение кристаллической структуры не гарантирует ее эффективность в виртуальном скрининге. Конформации с низким показателем обогащения (EF) и ROC-AUC воспроизводимо демонстрировали слабые результаты на трех независимых программах докинга (AutoDock Vina, rDock, Glide). В работе показана, что фреймворк успешно апробирован на протеазе HIV-1 PR (684 структуры), где 4 доминирующих состояния охватили 85% всех конформаций и выявили ядро из 12 ключевых остатков, совпадающих с сайтами мутаций лекарственной устойчивости. Впервые показана Применение для мультисубтиповых мишеней на нейраминидазе вирусов гриппа (IAV/IBV), где фреймворк позволил отобрать конформации для алгоритмов глубокого обучения с подкреплением (*de novo*).

Практическое значение работы

Работа отличается мультидисциплинарностью и сочетанием *in silico*, *in vitro* и *in vivo* методов. Скрининг против SARS-CoV-2, комбинация фармакофорного фильтра и многоконформационного докинга 198 млн соединений позволила отобрать 16 кандидатов, 7 из которых показали микромолярное ингибирование фермента *in vitro* (успешность / hit rate/ в пределах 43,7%). Дизайн ингибиторов нейраминидазы гриппа, где сгенерированы принципиально новые не-сиаловые структуры, подавляющие нейраминидазы вирусов гриппа А и В, включая устойчивый к озельтамивиру штамм с мутацией H275Y35, эффективность которых подтверждены на клеточных культурах и в *in vivo* модели выживаемости мышей при летальной инфекции.

Диссертационная работа Хачатряна Гамлета Нарековича состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, насчитывающего 174 наименований. Диссертация изложена на 103 страницах, включает 35 рисунков, 7 таблиц, и 10 графиков. Материалы диссертации были представлены на научных семинарах в Институте Молекулярной биологии НАН РА, в рабочих встречах в Варшаве в 2024 и в Кембридже 2022. По теме диссертации опубликовано 4 работы, где в 2 статьях он является первым автором.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ построен достаточно логично. В ней последовательно излагаются теоретические и практические основы структуры-ориентированного дизайна противовирусных средств, описываются исследуемые вирусные мишени и формулируется научная проблема.

В главе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ дано обоснование выбора инструментария для достижения поставленной цели и решения задач. Подробно описывается математический аппарат фреймворка, алгоритмы обработки структурных данных, схемы проведения виртуального скрининга и генеративного дизайна, а также протоколы молекулярного моделирования и лабораторных экспериментов. Описана методология подготовки структурных данных вирусных белков — 342 структуры главной протеазы SARS-CoV-2, 684 структуры протеазы ВИЧ-1 (HIV-1 PR) и 55 структур нейраминидаз вирусов гриппа А и В. Описан математический фреймворк платформы, описан протокол виртуального скрининга библиотеки из 198 млн соединений против отобранных конформаций M^{pro} (фармакофорная фильтрация и докинг в ICM-Pro и Glide), а также алгоритм генеративного дизайна *de novo* ингибиторов нейраминидазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ, приведенные в работе:

Полученные в течение выполнения исследования результаты приведены в трех ключевых блоках, это Валидация фреймворка *in silico*, где для SARS-CoV-2 M^{pro} из 342 кристаллографических структур главной протеазы выделены 8 репрезентативных конформационных кластеров. Показано, что эффективность виртуального скрининга (ROC-AUC, Enrichment Factor, предсказание поз) резко различается между конформациями и не коррелирует с кристаллографическим разрешением или R-фактором. Например, для структуры 7DDC ни одна программа не смогла точно предсказать позы, в то время как структура 7RFS показала наивысшую точность (29.02% в Glide).

Во втором блоке соискатель описывает применение фреймворка для поиска биоактивных соединений и экспериментальная валидация результатов многоэтапного виртуального скрининга для ингибиторов SARS-CoV-2 M^{pro}. В ферментативном FRET-анализе 7 соединений показали микромолярное ингибирование M^{pro} (успешность отбора / hit rate составила > 40% против стандартных ~10%). Показаны результаты *De novo* ингибиторов нейраминидазы вирусов гриппа (*in vitro* и *in vivo*) А и В из 209 структур были сгенерированы принципиально новые не-сиаловые соединения. Лидерные соединения DS-22-inf-009 и DS-22-inf-021 сохранили высокую активность против штамма с мутацией устойчивости H275Y. *In vivo* исследования на мышях показали, что при летальной инфекции вирусами гриппа А и В лечение соединениями в

дозе 100 мг/кг обеспечило выживаемость мышей до 65–85% (IAV) и 65–100% (IBV), а также достоверное снижение вирусной нагрузки в легких.

В третьем блоке описаны ограничения работы, которые выявлены в процессе исследования, связанные с пространственными нюансами структуры исследуемых молекулярных моделей, валидации полученных микромолярных скаффолдов и проблемами применением фреймворка для плоских белок-белковых интерфейсов

ВЫВОДЫ. приведенные в завершение диссертационной работы, соответствуют логике анализа полученных данных.

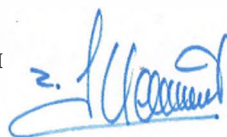
Замечания и предложения

В оформлении работы отмечены некоторые опечатки и малочисленные грамматические ошибки, что не составляет практического значения в оценке научной ценности исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Гамлета Напека Хачатряна на тему: «Active Site Conformational Analysis Framework of Viral Proteins for Structure-Based Antiviral Drug Discovery» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, по специальности 03.00.03 – молекулярная и клеточная биология является полноценной и самостоятельно выполненным научным трудом. Научное значение полученных результатов, новизна исследования, практическая ценность и качество оформления работы полностью соответствуют требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям со стороны ВАК Армении, а автор достоин присуждения степени кандидата биологических наук, по специальности **03.00.03** – молекулярная и клеточная биология.

Ст. преподаватель кафедры биоинженерии,
биоинформатики и молекулярной биологии
ИБМиФ РАУ



к.б.н. Л. Унанян

Заведующая кафедрой ОФХ
ИБМиФ РАУ



к.х.н., доцент А. Григорян

Подписи Л. Унаняна и А. Григоряна заверяю
уч. секретарь Российско-Армянского
университета



к.фил.н. Р. Касабабова