

ОБОБЩЕНИ ПРИНОСИ КЪМ НАУЧНОТО ПОЗНАНИЕ

на чл.-кор. проф. дбн Илза К. Пъжева от ИБФБМИ-БАН
във връзка с участието ѝ в конкурса за избор на академици на БАН - 2021 г.

Основните ми научни приноси се отнасят до моделни изследвания на биологично активни съединения и експериментални изследвания на лекарствено-мембранни взаимодействия.

Основните обекти на изследване са: (i) малки биологично активни съединения (лекарства, лекарствено-подобни съединения и биологично активни вещества с природен произход); (ii) биомакромолекули (транспортни протеини, въввлечени в множествената лекарствена резистентност (multidrug resistance, MDR) в туморни клетки; нуклеарни рецептори и ензими, свързани със социално-значими заболявания).

Основните методи в моделните изследвания са т.нар. **компютърно-подпомогнати методи за лекарствен дизайн** (computer-aided или *in silico* drug design). Те се основават на зависимостите структура–активност и целят разработване на молекулни модели за целите на предсказване на биологичната активност и изясняване на молекулните механизми на действие на биологично активни съединения и взаимодействията им с биомакромолекулни мишени в живите организми. Моделните изследвания, където това е възможно, **са потвърдени с експериментални изследвания *in vitro***.

Приносите са обособени в следните две групи:

I. Приноси в периода до избора ми за член-корепондент (до м. януари 2015 г.):

1. Разработена е **първата у нас микрокомпютърна система за прогнозиране на зависимости структура-активност на противотуморни лекарства** (описана в дисертационния труд за научната степен “Доктор” (1989 г.). Системата реализира подход на подструктурен анализ и позволява достоверно предсказване на четири нива (високо, средно, ниско и отсъствие) на активност на съединения спрямо туморни модели *in vivo* и селектира съществени за противотуморната активност на съединенията структурни признаци.

2. Чрез експериментални изследвания на лекарствено-мембранни взаимодействия с методи на диференциалната сканираща калориметрия и ЯМР на примера на **стереоизомерни лекарствени съединения** от групата на фенотиазините и тиоксантените **е показано, че липидният двуслой проявява стереоспецифичност във взаимодействията си**. Показано е, че *in vitro* модулиращата активност на базични липофилни съединения корелира значимо с тяхната способност да взаимодействат с изкуствени мембрани, изградени от неутрални и отрицателно-заредени фосфолипиди. **Предложен е механизъм** за начина, по който взаимодействията на катамфилини лекарствени съединения с мембранните фосфолипиди могат да модулират MDR в туморни клетки.

3. Разработени са **първите, описани в литературата, 3D (тримерни) модели на модулатори на MDR от различни химически класове**, с които е показано, че различията в активността на модулаторите **се отнасят основно до различия в молекулните им полета**. Моделите са с висока предсказваща способност и са използвани за оценка на MDR-преодоляващата активност на нови, в това число и на

хипотетични структури, както и за предварителна селекция на структури за експериментално тестване.

4. За първи път е показана значимата роля на хидрофобните молекулни полета за активността на MDR модулаторите и е предложена концепцията “хидрофобен дипол” като характеристика на пространствената насоченост и разпределение на хидрофобността на лекарствените съединения. Показано е, че широко прилаганият във фармакологията коефициент на разпределение в системата “вода-октанол” ($\log P$) не описва добре липофилните свойства на лекарствата, ако те зависят нелинейно от приносите на заместителите в структурите на съединенията.

5. Разработен е обобщен фармакофорен модел на съединения, взаимодействащи с транспортния П-гликопротеин, който обяснява широката субстратна специфичност на протеина, т.е. способността му да взаимодейства с много и разнообразни по структура химически съединения. Изследването, което описва този модел, е публикувано през 2002 г. и се цитира активно. Моделът се използва от фирми, които разработват проблемно-ориентиран софтуер за молекулно моделиране. Компанията Accelrys, Cambridge-UK, например, използва модела за проверка на приложимостта на разработвания от фирмата софтуер за фармакофорно моделиране (вж. приложените материали).

6. Получени са оригинални QSAR и 3D QSAR модели (QSAR, количествени зависимости структура-активност, quantitative structure-activity relationships) на съединения, принадлежащи към 3-то поколение модулатори на MDR, в т.ч. производни на тарикидар и елакридар (tariquidar и elacridar), едни от най-мощните в момента MDR модулатори. Към тези модели има интерес от фармацевтични фирми, които разработват MDR модулатори като, например, Xenova Group Ltd., –MedKoo Biosciences, Chapel Hill, NC, USA и др. (вж. приложените материали).

7. Изведени са оригинални 3D QSAR модели на съществуващи и новосинтезирани флаваноиди със структурно-различен скелетон (флавонони, флаволи, флавоноли, гликозиди, изофлаволи и бифлавоноиди) с инхибиторно действие спрямо протеина на резистентност при рак на гърдата BCRP (Breast Cancer Resistance Protein). Моделите позволяват оценка на ролята на определени заместители в структурите на изследваните флавоноиди като най-съществени за инхибиторния им ефект върху транспортната активност на BCRP.

8. Разработени са едни от първите тримерни молекулни модели на човешката форма на П-гликопротеина, най-изследвания за MDR транспортен протеин. Моделите съответстват на две различни функционални състояния (респективно различни конформации): несвързана с нуклеотида апо-форма и АТФ-свързана форма. Въз основа на сравнение на моделите са очертани различията в потенциалните места на свързване на лиганди в протеиновата кухня. Установени са важни контакти между аминокиселини, съществени за комуникацията между трансмембранните и нуклеотид-свързващите домени и тяхната стабилност е потвърдена с молекулно-динамични симулации. Въз основа на тези изследвания са предложени аминокиселини за по-нататъшни насочени мутагенни експерименти. Експериментални изследвания потвърждават моделните прогнози.

9. Идентифицирани са ключови места на свързване на субстрати на П-гликопротеина, известни като R-място, H-място и «регулаторно» място в модела на апо-формата, смятана за «компетентна» за взаимодействие с лиганди.

Идентификацирани са също **местата на взаимодействие MDR-модулатори от 3-то поколение** тарикидар и елакридидар. Разположението на тези места е в съгласие с експериментални данни за тяхната локализация и **обяснява експериментални наблюдения за взаимодействие между местата**. Резултатите допринасят за изясняване на връзката структура–функция на П-глицопротеина и имат важна роля за оценка на способността на лекарствено-подобни съединения да взаимодействат с него. Те са от съществено значение за разработването на високо специфични и ефективни модулатори при лекарственото лечение на рака.

10. Изведени са **зависимости структура-активност** и са разработени **фармакофорни модели на агонисти и антагонисти на ядрения рецептор PPAR гама** въз основа на анализ на експериментални данни за лиганд-белтъчни комплекси от базата данни с кристалографски структури PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Изведени са и **модели на значими за лекарственото лечение на рака** други съединения като инхибитори на рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR) и Braf протеина, а също и на протеини, **свързани с регулиране на сърдечната дейност** като миозин и ZASP. Резултатите обясняват механизми на действие на протеините и техните лиганди и имат значение за предсказване на потенциален лекарствен и токсичен ефект на съединения в светлината на съвременните токсикологични концепции за описание на пътища, водещи до нежелан изход (Adverse Outcome Pathways).

11. Разработени са **модели на редица класове биологично активни съединения (синтезирани и тествани от колеги от различни институти на БАН и университети), които са допринесли за изясняването на механизмите на действие и подпомагането на насочения дизайн на нови съединения**, сред тях: инхибитори на УДФ-глюкуронозилтрансфераза (съединенията са синтезирани и тествани фармакологично в Институт по молекулярна биология, БАН); инхибитори на изоензима 2B1 на цитохром P450 (съединенията са синтезирани и тествани фармакологично в Институт по невробиология, БАН); инхибитори на ензима циклооксигеназа (съединенията са синтезирани от колеги в ХТМУ-София и тествани фармакологично в Института по невробиология-БАН); пиролови хидразони като потенциални антитуберкулозни съединения (синтезирани от колеги в ХТМУ-София); нестероидни противовъзпалителни лекарствени съединения за изясняване на база кристалните им структури на разликите във взаимодействията им с поливинилпиролидон (смесите са приготвени и охарактеризирани във Фармацевтичен факултет, МУ-София). **С тези изследвания е развита широка мрежа от научни сътрудничества с колективи от различни академични институции у нас, осъществяваща синергизъм и ефективно комбиниране на моделни и експериментални изследвания.**

12. Проведени са изследвания, свързани с **развитие и валидизиране на софтуер със свободен достъп**. Изследванията **имат приложен принос**, с който се постига оптимизация на процеса на търсене на биологично активни съединения с методите на виртуален скрининг. В колектива ни е разработен софтуер със свободен достъп, който позволява отчитане на различни нива на гъвкавост на белтъка. Показано е, че при повечето от изследваните протеин-лигандни комплекси, пост-докинг оптимизацията подобрява резултатите от виртуалния скрининг (част от изчисленията са извършени с помощта на изчислителния ресурс на кластер “Мадара”, ИОХЦФХ-БАН).

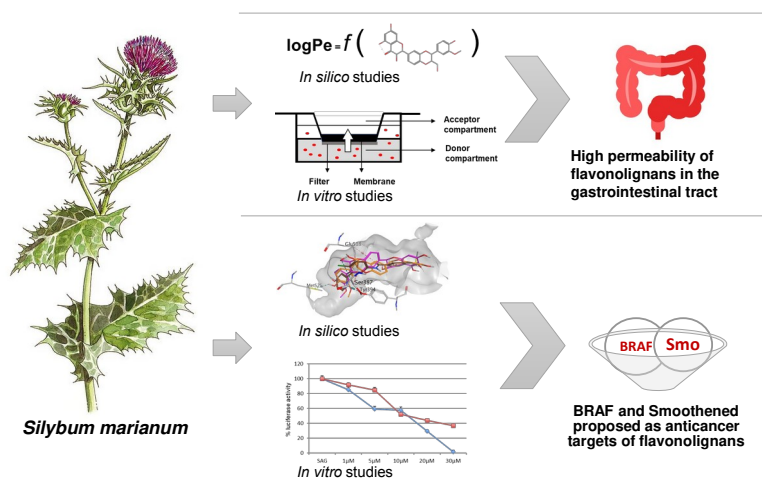
II. Основни приноси в периода след избора ми за член-кореспондент (2015-2021 г.):

Продължени са изследванията, започнати преди избора, като са стартирани и нови изследвания, в т.ч. насочени към изучаване на **биологично активни съединения с природен произход** и взаимодействията им с целеви (таргетни) протеини в човешкия организъм. Приносите могат да се обобщят, както следва:

1. Предложени и доказани са **нови целеви протеини на природни съединения от класа на флавонолигнаните** (извлечени от силимарин, екстракт от растението „бял трън“), свързани с противотуморното им действие. Чрез оценка на сходство с известни лекарствени молекули и докинг симулации са идентифицирани потенциални общи таргетни протеини (BRAF киназа и Smoothened) за лекарствата и изследваните флавонолигнани. Ефектите на флавонолигнаните върху активността на тези протеини и върху жизнеността на туморни клетъчни култури са изследвани *in vitro* (съвместно с колеги от Института по микробиология на БАН и колеги от италиански академични организации) и е потвърдено, че BRAF киназата и Smoothened имат роля за противотуморната активност на изследваните съединения. Въз основа на получените резултати **са идентифицирани и предложени съединения от класа на флавонолигнаните, които могат да се използват като водещи структури за разработване на противотуморни лекарства.**

2. Обяснена е **разликата в начина на взаимодействие на природните стереоизомери силибин А и силибин В**, основни компоненти на силимарина, с нуклеарния **естрогенов рецептор алфа (ER α)**. Установено е, че двете съединения имат **стереоспецифични взаимодействия** в активното място на рецептора, водещи до разлика в ефектите им, в съответствие с публикувани в литературата и необяснени досега потенциални токсични ефекти на съединенията.

3. Разработен е **ефективен подход, комбиниращ *in vitro* и *in silico* методи**, за оценка на гастроинтестинална абсорбция на флавонолигнани от бял трън. Разработен е **QSAR модел за предсказване на мембранен пермеабилитет** и резултатите, получени чрез модела и чрез *in vitro* PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) измервания, установяват, че основните флавонолигнани преминават добре през гастроинтестиналния тракт, което е предпоставка за **добрата им бионаличност**. *In vitro* изследванията с PAMPA са проведени в Биофарма-комплекса на София-ТехПарк.



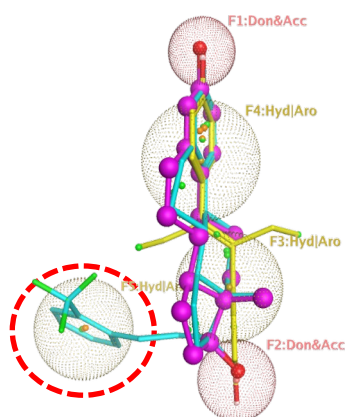
Обобщено представяне на изследванията на съединения - компоненти на силимарина, получен от растението бял трън (*Silybum marianum*)

4. Изведени са **оригинални класически и тримерни QSAR модели за оценка на антирадикален капацитет** на моно- и полифенолни съединения в стехиометрични тестове. Предложен е **нов подход, базиран на класификация на отделните ОН-групи като реактивни или нереактивни** чрез параметри, отнасящи се към съответните ОН-групи, като е тествана класификация на съединенията с тях. Получените класификационно-регресионни модели са с висока предсказваща способност. Резултатите позволяват да се оценят **полezni биохимични и фармакологични ефекти** на фенолните съединения с природен произход, за които се предполага, че са свързани със способността им да прехващат свободни радикали в хидрофилна среда.

5. Предложен е **протокол за *in silico* предсказване на метаболити на сапонин** от пречистена сапонинова смес от растението *Astragalus glycyphylloides*, както и на техния токсикологичен профил и начини на молекулно действие. Експериментално са потвърдени хипогликемични, хиполипидемични и антиоксидантни ефекти на сместа, сравними с тези на пиоглитазон (лекарствен продукт за PPAR γ -прицелна терапия на диабет тип 2), както и хепатопротективно действие (съвместно с колеги от Фармацевтичен факултет на Медицински университет, София). Резултатите подпомагат **приоритизацията на молекули от природен произход** с потенциал за разработване на лекарства, хранителни добавки или като компоненти на нови функционални храни.

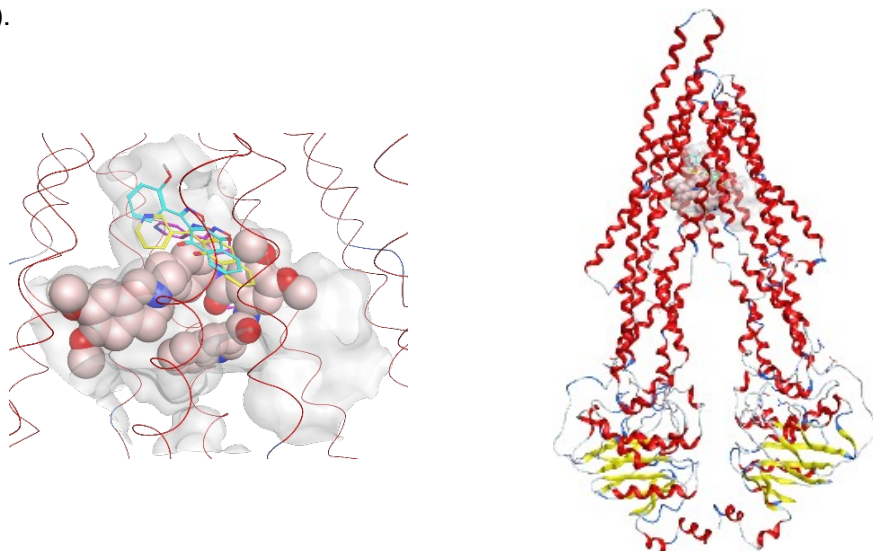
6. Изяснен е **начинът на свързване на PPAR γ антагонисти с рецептора** като посредством молекулно-динамични симулации **за първи път е показано**, че антагонистите, които се свързват с PPAR γ могат да проявяват множество различни начини на свързване с различна вероятност за случване. Построен е **фармакофорен модел на агонисти на PPAR γ , позволяващ провеждане на ефективен виртуален скрининг** на съединения с потенциално хепатотоксично действие, осъществявано посредством дисрегулация на PPAR γ . Резултатите са част от дейността по проект, финансиран по 7-ма Рамкова програма на Европейската комисия, **целящ заместване/редуциране на тестването на токсични ефекти върху животни**.

7. Предложен е **разширен структура-базиран фармакофорен модел на естрогеновия рецептор алфа (ER α)**, който добавя **нов съществен признак** с хидрофобно/ароматен характер към известните до момента фармакофорни признаци на ER α агонистите. С молекулно-динамични симулации е показано, че **той стабилизира позицията на агониста в мястото на свързване**. Показано е, че новият фармакофорен модел подпомага **селектирането на потенциални силни агонисти** на ER α , както и по-прецизното дискриминиране на вещества, които не се свързват с ER α . В комбинация със структурни дескриптори за форма и полярност той позволява и разграничаване на съединения с потенциална про- и антиестрогенова активност.



3D фармакофорен модел на силно активни ER α агонисти: новият фармакофорен признак е очертан с червена прекъсната линия

8. Проведени са за първи път с човешката структура на транспортния П-гликопротеин (депозирани в PDB през 2019 г.), структура-базирани изследвания на новосинтезирани съединения - инхибитори на протеина Hsp90 като потенциални инхибитори на П-гликопротеина. Докинг-симулациите и анализът на контактите лиганд-протеин изясняват начина на свързване и възможните взаимодействия на дуалните инхибитори с транспортния протеин. Резултатите в областта на *in silico* изследване на П-гликопротеина са признати с покана за участие в обзор на списанието *Drug Resistance Update* (IF=11) през 2020 г. (с равен принос на всички автори); **статията е в класацията на топ 1% на най-цитираните публикации в Web of Science** (вж. Приложение 1.3 в Справката).



Пози на свързване на Hsp90 инхибитори (структури в жълто, зелено и лилаво, структурата на съединението тарикадар е показана като атомни сфери) в кухината на човешкия П-гликопротеин (вляво); цялостната структура на протеина със свързаните лиганди (вдясно)

9. Разработена е нова версия на софтуера за пост-докинг оптимизация на протеин-лигандни комплекси, която позволява отчитането на водни молекули и метални йони в местата на взаимодействие между лигандите и протеините. **Проверена е приложимостта на подхода за интеркритериален анализ на данни**, разработен от чл.-кор проф. Красимир Атанасов от ИБФБМИ-БАН, с цел подпомагане на вземане на решение за избор на подходяща оценъчна (scoring) функция при виртуален скрининг на биологично активни съединения.

Всички изброени по-горе приноси в периода след избора ми за член-кореспондент са получени в резултат от колективния труд на членовете на ръководената от мене секция по „QSAR и молекулно моделиране“ (проф. д-р Иванка Цаковска, проф. д-р Таня Пенчева, гл. ас. д-р Мерилин Ал Шариф, специалист Петко Алов, д-р Иглика Лесигярска и асистенти Антония Дюкенджиева и Десислава Жерева). Изследванията са финансирани по международни и национални проекти, подпомогнати от ФНИ и Национални научни програми, в т.ч. за подпомагане на млади учени (изброени подробно в Справката). Резултатите са публикувани в реномирани международни списания и книги, представени са на авторитетни научни форуми и са получили награди и признания. **Създаването, развитието и постиженията на секция „QSAR и молекулно моделиране“**, първата такава в БАН и пионерска за страната, считам за най-големия си принос.

Изброените в т. II приноси се базират на научни трудове, публикувани след 2014 – номера 59-77; 80-84, 106, 127-130, 137 и 138, съгласно приложения **Списък на трудовете** с документите по конкурса.

В **Справката** за изпълнение на критериите за оценка на кандидатите за академици и член-кореспонденти на БАН са представени доказателствени материали и положителни цитирания в подкрепа на формулираните по-горе приноси.

чл.-кор. проф. дбн И. К. Пъжева.....