

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Заремби Андрія Анатолійовича

«Структуро орієнтована розробка і пошук таргетних антивірусних сполук проти вірусу Епштейна-Барр та SARS-CoV-2»,

що подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія»

Актуальність теми дисертаційної роботи

Дисертаційна робота Заремби Андрія Анатолійовича присвячена актуальній проблемі розробки антивірусних препаратів проти двох соціально значущих інфекційних агентів — вірусу Епштейна-Барр (ВЕБ) та SARS-CoV-2. Роботу виконано з використанням сучасних методів структуро-орієнтованого дизайну ліків, обчислювальної хімії, молекулярної динаміки та віртуального скринінгу.

Актуальність теми дослідження є безсумнівною. ВЕБ інфікує близько 90% населення планети і асоціюється з розвитком лімфопроліферативних захворювань та низки онкологічних патологій (лімфома Беркітта, назофарингеальна карцинома, посттрансплантаційне лімфопроліферативне захворювання тощо). Класичні підходи до протидії ВЕБ шляхом застосування інгібіторів вірусної ДНК-полімерази не мають належного клінічного ефекту через складний життєвий цикл патогену і особливо через його здатність до майже повного маскування в латентній фазі. SARS-CoV-2, своєю чергою, спричинив найпотужнішу у новітній історії людства пандемію, і попри значні зусилля міжнародної наукової спільноти, ефективна етіотропна терапія для всіх категорій пацієнтів досі не розроблена.

Таким чином, тема дисертації повністю відповідає сучасним міжнародним тенденціям розвитку вірусології, біоінформатики та обчислювальної медичної хімії, а отримані результати мають як фундаментальне, так і прикладне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційну роботу виконано у відділі репродукції вірусів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України у рамках освітньо-наукової програми «Вірусологія» третього (освітньо-наукового) рівня вищої освіти за галуззю знань 09 — Біологія, спеціальністю 091 — Біологія та біохімія.

Наукова новизна одержаних результатів

Наукова новизна дисертаційної роботи полягає у наступному:

1. Уперше запропоновано цілісну модель життєвого циклу вірусу Епштейна-Барр від молекулярного до організменного рівня з визначенням ключових точок потенційного терапевтичного втручання.
2. Розроблено новий клас селективних ДНК-поліінтеркаляторів (HASDI, HASDI-G2), здатних до високоспецифічного розпізнавання послідовностей ДНК у великій борозенці подвійної спіралі. Запропонований підхід теоретично дозволяє протидіяти ВЕБ навіть у стані його максимальної латентності, коли класичні підходи є неефективними.
3. Методом ітеративного *de novo* дизайну з використанням симуляції молекулярної динаміки розроблено низькомолекулярний інгібітор ЕВАІ — потенційний інгібітор антиапоптотичного фактору ВЕБ BHRF1.

4. Ідентифіковано консервативну серед варіантів Ухань, Р.1, Кластер 5 кишеню в рецептор-зв'язуючому домені (RBD) S-глікопротеїну SARS-CoV-2, придатну для розробки інгібіторів взаємодії RBD/hACE2.
5. De novo розроблено низькомолекулярну структуру, здатну до стабільної взаємодії з RBD варіантів Ухань, Омикрон, Дельта та Кластер 5 у зоні ідентифікованої кишені.
6. Методом віртуального скринінгу FDA-затверджених препаратів ідентифіковано кетодаролутамід як потенційний інгібітор взаємодії RBD/hACE2, що відкриває можливості для репозиціонування цього препарату.
7. Встановлено епідеміологічні закономірності поширення різних варіантів SARS-CoV-2 залежно від ступеня вакцинованості населення; доведено таку залежність для варіанту Дельта.

Оцінка публікаційної активності

Результати дисертаційних досліджень А.А. Заремби опубліковано у 12 наукових працях, серед яких 7 статей, що індексуються міжнародною наукометричною базою Scopus, зокрема три статті у журналах квартилю Q1, дві статті у Q2, одна стаття у Q4 та одна публікація у фаховому періодичному виданні категорії «Б». Здобувачем також представлено результати роботи на низці міжнародних і національних конференцій. Така публікаційна активність переконливо засвідчує високий науковий рівень проведених досліджень, їх актуальність та визнання науковою спільнотою.

Структура, обсяг та зміст дисертаційної роботи

Дисертаційна робота має класичну структуру, що відповідає вимогам до кваліфікаційних наукових праць. Робота містить вступ, шість розділів, висновки, список використаних джерел та додатки.

У вступі обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету та завдання дослідження, визначено об'єкт і предмет дослідження, наведено методи дослідження та визначено наукову новизну і практичне значення одержаних результатів.

У першому розділі проведено ґрунтовний аналіз сучасного стану таргетної антивірусної терапії, детально описано життєві цикли ВЕБ та SARS-CoV-2, молекулярні механізми взаємодії цих вірусів з клітиною-господарем, а також існуючі підходи до розробки відповідних терапевтичних засобів. Огляд літератури є вичерпним, логічно структурованим і містить критичний аналіз актуальних наукових джерел, у тому числі останніх років.

У другому розділі автором систематизовано теоретичні основи структуро-орієнтованого дизайну ліків (СОДЛ). Детально охарактеризовано методи підготовки мішеней, віртуального скринінгу, молекулярного докінгу, симуляції молекулярної динаміки та розрахунку вільної енергії зв'язування методами ММ-PBSA/ММ-GBSA. Особлива увага приділяється сучасним тенденціям розвитку СОДЛ, зокрема застосуванню методів машинного навчання та генеративного штучного інтелекту.

У третьому розділі описано методологію роботи. Автор застосував сучасні валідовані обчислювальні підходи: пакет GROMACS 2019.6 для симуляції молекулярної динаміки; відповідні силові поля (CHARMM36 для білків, AMBER99SB — для нуклеїнових кислот із додатковою валідацією OL15); AutoDock Vina 1.1.2 для віртуального скринінгу; gmx_MMPBSA 1.6.3 для розрахунку вільної енергії зв'язування. Параметри симуляцій, включаючи алгоритми термостатування (Bussi-Donadio-Parrinello), баростатування (Parrinello-Rahman), моделювання нековалентних взаємодій (PME-електростатика, Van der Waals із cutoff 1.0–1.2 нм), відповідають сучасним стандартам якості в галузі молекулярної динаміки.

У четвертому розділі представлено результати розробки інгібіторів репродукції ВЕБ. Методом ітеративного de novo дизайну розроблено ЕВАІ — потенційний інгібітор антиапоптотичного фактору BHRF1. Шляхом

поглибленого подвійного симуляційного експерименту довжиною 120 нс підтверджено здатність EBAI до самостійного відновлення конформації, необхідної для успішної взаємодії з цільовим білком, зокрема через утворення водневих та іонних зв'язків з ключовими залишками R100 та N61. Окремий блок досліджень присвячено розробці селективних ДНК-поліінтеркаляторів HASDI та HASDI-G2. Послідовно проведена робота від тестової конструкції на основі XR5944 до повноцінної молекулярної структури HASDI, здатної розпізнавати послідовність довжиною 16 п.н., а надалі — до HASDI-G2 з покращеною селективністю за рахунок заміни феназинових хромофорів на індазольні. Підтверджено диференційне розпізнавання цільової та випадкової послідовностей ($\Delta G = -235,3 \pm 7,77$ ккал/моль проти $-193,47 \pm 14,09$ ккал/моль).

У п'ятому розділі викладено результати дослідження SARS-CoV-2. Проведено статистичний аналіз динаміки поширення варіантів патогену в різних країнах із використанням даних CoVariants, Johns Hopkins Coronavirus Resource Center, Our World in Data і Google COVID-19 Community Mobility Reports. Ідентифіковано консервативну кишеню у RBD S-глікопротеїну, придатну для націлювання. Шляхом *de novo* дизайну розроблено молекулярну структуру, здатну до стабільної взаємодії з RBD. Додатково, методом віртуального скринінгу бібліотеки FDA-затверджених препаратів виявлено кетодаролутамід як потенційний інгібітор RBD/hACE2-взаємодії з розрахованою вільною енергією зв'язування $-11,33 \pm 3,41$ ккал/моль.

У шостому розділі (обговорення результатів) здобувач детально аналізує отримані результати у контексті сучасних літературних даних, обґрунтовує вибір молекулярних мішеней, порівнює свій підхід з альтернативними стратегіями (зокрема з поліпептидним інгібітором BINDI, розробленим американською групою), а також критично оцінює обмеження власних підходів.

Висновки дисертації конкретні, логічно випливають з проведеного дослідження та відповідають поставленим завданням.

Позитивні аспекти роботи

1. Новизна застосованого підходу. Запропонований дисертантом підхід до протидії ВЕБ шляхом розробки селективних ДНК-поліінтеркаляторів є оригінальним і потенційно відкриває новий напрям у терапії латентних вірусних інфекцій.
2. Комплексність проведеного дослідження. Робота демонструє системний багатокроковий підхід: від аналізу структури мішені до *de novo* дизайну лігандів, їх оптимізації, валідації методом молекулярної динаміки та розрахунку енергетичних параметрів.
3. Методична обґрунтованість. Автор застосував сучасні валідовані методологічні підходи з коректною параметризацією систем і дотриманням протоколів врівноваження.
4. Практична значущість. Ідентифікація кетодаролутаміду як потенційного інгібітора взаємодії RBD/hACE2 є цінним результатом з точки зору репозиціонування ліків.
5. Публікаційна активність. Наявність низки високоякісних публікацій у журналах квантилів Q1–Q2 свідчить про міжнародне визнання наукового рівня роботи.
6. Логіка викладу. Робота добре структурована, логічно побудована, містить необхідні ілюстрації та детальні методологічні описи.
7. Баланс *de novo* дизайну та репозиціонування лікарських засобів як двох комплементарних стратегій у межах однієї роботи.

Дискусійні положення та зауваження

Попри загалом високий рівень виконання роботи, вона не позбавлена дискусійних положень, які слід відзначити.

1. Перспективи експериментальної валідації.

Робота виконана як обчислювальне дослідження, що є цілком прийнятним для дисертацій з молекулярного моделювання. Проте бажано було б у висновках більш чітко сформулювати конкретні рекомендації щодо експериментальної верифікації результатів (наприклад, ITC/SPR/DSF/EMSA/FP для ДНК-лігандних систем; BLI/SPR для RBD-пов'язаних досліджень; клітинні репортери апоптозу для перевірки функціональної активності EBAl), а також коротко обговорити ключові обмеження застосованих *in silico* методів.

2. Синтетична доступність HASDI та HASDI-G2.

Автор коректно відзначає виклики синтезу. Доцільно було б додати *in silico* оцінки *synthetic accessibility score* (SA score), QED, а також фільтрів PAINS/aggregator для варіантів модульного спрощення конструкції. Такий аналіз дозволив би обґрунтувати пріоритетність тестування окремих модулів (наприклад, біс-інтеркаляторів) як проміжного кроку перед повноцінним синтезом HASDI-G2.

3. Фармакокінетичні властивості та drug-likeness.

Для EBAl та *de novo* інгібітора RBD зроблено базові висновки, однак для HASDI/HASDI-G2 бракує ґрунтовного обговорення очікуваних параметрів проникності, розподілу та токсикологічного профілю. HASDI-G2 як молекулярна конструкція для розпізнавання 16 нуклеотидів матиме значну молекулярну масу, що суттєво виходить за межі класичних критеріїв *drug-likeness*. Варто було би провести *in silico* аналіз ADMET-властивостей (SwissADME, pkCSM, admetSAR) та оцінити ризики hERG-блокади, генотоксичності та фототоксичності.

4. Селективність до вірусної ДНК.

У роботі підкреслено здатність HASDI-G2 розпізнавати послідовності довжиною 16 п.н. Розрахунок автора базується на припущенні випадкового розподілу нуклеотидів, проте геном людини має високо структуровані нерівномірні розподіли послідовностей. Бажано провести сканування геному людини на наявність часткових збігів (Hamming-відстані 15/16, 14/16, 13/16

тощо) та додати *in silico* моделювання «scrambled» послідовностей як негативних контролів.

5. Доступ до епісоми ВЕБ у контексті хроматину.

Для латентної епісоми ВЕБ, що асоційована з нуклеосомами, доступ до Q_r-промотора може залежати від стану конденсації хроматину. Наступним логічним кроком могло б бути повноатомне моделювання HASDI-G2 у комплексі з нуклеосомою (наприклад, NCP 147 п.н.) або coarse-grained моделювання у контексті фрагмента хроматину. Також бажано обговорити вплив епігенетичних модифікацій (зокрема метилювання 5-mC) на ефективність розпізнавання послідовності.

6. Методологічні зауваження.

Більшість симуляцій проводилися протягом 50–120 нс, що для складних систем типу ДНК-поліінтеркаляторних комплексів може бути недостатнім. Варто було би уточнити кількість незалежних повторів з різними seed та критерії конвергенції (плато енергії/RMSD/контактів). Крім того, міксування параметризації (GAFF/SwissParam/MMFF) може створювати систематичні зміщення — рекомендується обговорити можливий вплив на абсолютні значення ΔG та підкреслити, що основний акцент роботи — на відносних порівняннях.

Для сильнозаряджених ДНК-комплексів абсолютні значення ΔG , отримані методом ММ-РBSA, можуть бути значно завищеними. У роботі це частково компенсується акцентом на порівняннях, однак у тексті дисертації цей момент доцільно би було пояснити прямо. У перспективі для невеликого піднабору систем було б корисно застосувати більш точні методи (ABFE, FEP, метадинаміку) як еталонний розрахунок.

7. Валідація віртуального скринінгу.

Для етапу віртуального скринінгу бажано було би застосувати формальні метрики збагачення (EF1%, ROC-AUC, BEDROC) з використанням загальноприйнятих наборів декоїв (DUD-E, LIT-PCBA), а також обґрунтувати

вибір параметру exhaustiveness=40 через аналіз чутливості (порівняння 8/40/100).

8. Актуальність варіантів SARS-CoV-2.

Робота аналізує варіанти Ухань, P.1, Дельта, Омикрон та Кластер 5, однак станом на 2026 рік циркулюють значно новіші субваріанти. Бажано коротко обговорити стійкість ідентифікованої кишені RBD до сучасних підваріантів (за MSA/структурними моделями) та долучити оцінку druggability (DoGSiteScorer/FTMap/SiteMap) для підсилення висновків.

9. Кетодаролутамід — обережність інтерпретації.

Ідентифікація кетодаролутаміду як потенційного інгібітора RBD/hACE2 є перспективною, однак слід обережно інтерпретувати перехід від розрахункового ΔG до прогнозу наномолярної IC50. Терапевтичні концентрації цього препарату розраховані на антиандрогенну дію; доцільно чітко позиціонувати кетодаролутамід не як готовий анти-SARS-CoV-2 засіб, а як lead-сполуку для подальшої оптимізації.

10. Оформлювальні дрібниці.

У тексті дисертації трапляються окремі типографічні помилки («віртальний» замість «віртуальний»); у деяких місцях відсутні посилання на рисунки; не завжди уніфіковано формат одиниць (Å vs нм) та позначення варіантів. Доцільно додати окремий блок «Відтворюваність» з PDB-ідентифікаторами, параметрами докінгу, seed-ами МД та версіями ПЗ (за можливості — посиланнями на відкритий репозиторій). Зазначені зауваження мають редакційний характер і легко усуваються.

Наведені зауваження у жодному разі не ставлять під сумнів наукову цінність та завершеність роботи, а радше окреслюють природні напрямки її подальшого розвитку та практичного впровадження.

Питання до захисту

У процесі ознайомлення з дисертаційною роботою в офіційного опонента виникли такі питання:

1. Який мінімальний набір експериментів (по одному на мішень) Ви пропонуєте для швидкої валідації EBAI-BHRF1, HASDI-G2-ДНК-ціль, *de novo* інгібітора RBD та кетодаролутамід-RBD?
2. Якою Ви бачите стратегію спрощення HASDI-G2 (модульний підхід) із збереженням селективності, але кращою синтетичною доступністю?
3. Чи виконувалось сканування людського геному на off-target 16-мери для обраних цілей? Яка очікувана кількість часткових збігів (15/16, 14/16 тощо)?
4. Наскільки стійким є «сигнал селективності» за умов моделювання нуклеосоми/локальної гетерохроматинізації?
5. Як протонні стани гістидину та інших іоногенних груп на RBD/ACE2 (та рН) можуть вплинути на зв'язування кетодаролутаміду та *de novo* інгібітора?
6. Які метрики й контрольні набори (декої) Ви б обрали для кількісної валідації протоколу віртуального скринінгу на RBD?
7. Чи плануються ABFE/FEP або метадинаміка для невеликого піднабору систем як еталонний розрахунок вільної енергії зв'язування?
8. Чи розглядався вплив гліканив (наприклад, N343) на доступність кишені RBD та водну мережу?
9. Як Ви оцінюєте ризик перехресного зв'язування EBAI з людськими BCL-2-партнерами і яким міг би бути мінімальний профіль безпеки *in vitro*?
10. Для кетодаролутаміду: яку експериментальну концентрацію Ви вважаєте реалістичною для інгібування RBD/ACE2 без надмірного виходу за терапевтичне вікно?

Відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертація Заремби А.А. відповідає «Вимогам до оформлення дисертації», затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 (зі змінами). Структура роботи, обсяг, оформлення тексту, рисунків, таблиць і списку використаних джерел відповідають встановленим нормативам.

Зміст дисертації повністю відповідає обраній спеціальності 091 «Біологія та біохімія» та галузі знань 09 «Біологія». Основні результати дисертаційної роботи опубліковані у достатній кількості наукових праць, серед яких переважають публікації у високорейтингових журналах, що індексуються міжнародною наукометричною базою Scopus.

Дисертація є самостійною завершеною науковою працею, має внутрішню єдність та містить нові науково обґрунтовані теоретичні та/або практичні результати, що в сукупності розв'язують конкретне наукове завдання в галузі структуро-орієнтованого дизайну антивірусних препаратів. Автореферат (анотація) повно відображає основні положення дисертації.

Висновок

Дисертаційна робота Заремби Андрія Анатолійовича «Структуро орієнтована розробка і пошук таргетних антивірусних сполук проти вірусу Епштейна-Барр та SARS-CoV-2» є завершеним самостійним науковим дослідженням, яке містить нові, науково обґрунтовані теоретичні та практичні результати в галузі молекулярного моделювання та комп'ютерного дизайну ліків, що в сукупності розв'язують конкретне наукове завдання з розробки нових підходів до протидії вірусу Епштейна-Барр та SARS-CoV-2.

Робота виконана на високому методичному рівні з використанням сучасних валідованих підходів комп'ютерного моделювання. Автор продемонстрував глибоке розуміння біології досліджуваних вірусів, впевнене володіння сучасними методами структуро-орієнтованого дизайну ліків,

здатність до критичного аналізу результатів та вміння працювати зі складними молекулярними системами.

Наведені зауваження мають дискусійний характер та не знижують загальної високої оцінки дисертаційної роботи. Зазначені в цьому відгуку зауваження стосуються переважно можливостей розширення та поглиблення окремих аспектів дослідження, зокрема у напрямку майбутньої експериментальної валідації, і спрямовані на підготовку розроблених молекулярних кандидатів до наступної (експериментальної) фази.

Підсумовуючи все вищезазначене, вважаю, що дисертаційна робота Заремби Андрія Анатолійовича «Структуро орієнтована розробка і пошук таргетних антивірусних сполук проти вірусу Епштейна-Барр та SARS-CoV-2» за своїм змістом, практичною значущістю, науковим рівнем та новизною результатів повністю відповідає вимогам пунктів 10, 11 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44, а її автор Заремба Андрій Анатолійович заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія».

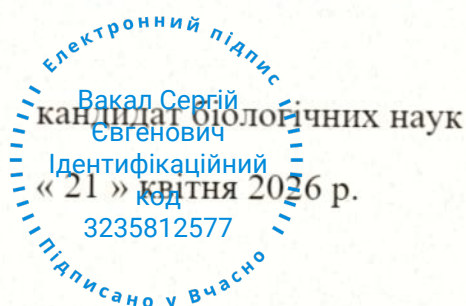
Офіційний опонент:

Lead ML/AI Scientist,
Molecular Intelligence and Data,
Medicine Design, Orion Pharma,
Tengströminkatu 8, 20520 Turku, Finland

Signed by:

Serhii Vakal

9BCDBD6ACFFC4DC...



ВАКАЛ С.Є.

Документ підписано у сервісі Вчасно (продовження)

Opponent_Review_Vakal_Zaremba_ORIGINAL-UKR-signed-12.pdf

Документ відправлено (05417087): 13:00 30.04.2026

Документ отримано (05417087): 13:00 30.04.2026

Відправник документу

Електронний підпис

13:00 30.04.2026

Ідентифікаційний код: 3235812577

Вакал Сергій Євгенович

Власник ключа: Вакал Сергій Євгенович

Час перевірки КЕП/ЕЦП: 13:00 30.04.2026

Статус перевірки сертифікату: Сертифікат діє

Серійний номер: 2DBD5940D955E12A040000000140080097733100

Тип підпису: кваліфікований

Тип сертифікату: кваліфікований