

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Пустюльги Егора Сергеевича «Моделирование олигопептидных лигандов, синтез и создание на их основе новых биоспецифических сорбентов для связывания иммуноглобулинов класса G»**, представленную в Совет по защите диссертаций Д 01.21.01 на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.0010 – биоорганическая химия

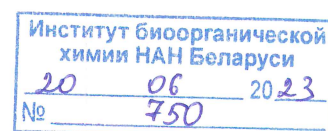
Цель диссертационной работы **Пустюльги Егора Сергеевича «Моделирование олигопептидных лигандов, синтез и создание на их основе новых биоспецифических сорбентов для связывания иммуноглобулинов класса G»** – использование комплексного подхода, включающего методы молекулярного докинга и пептидного синтеза, для поиска новых лигандов, что позволило идентифицировать перспективные молекулы, осуществить синтез этих молекул и на их основе создать экспериментальные образцы иммуносорбентов. Исследования свойств экспериментальных образцов иммуносорбентов *in vitro* показали высокую аффинность идентифицированных молекул, сорбционную емкость, высокую селективность к подклассам иммуноглобулинов G и низкую к другим белкам плазмы крови. Разработка на основе синтезированных олигопептидов новых биоспецифических сорбентов позволяет селективно удалять иммуноглобулины класса G и их подклассы из биологических жидкостей. Работа представляет собой законченное квалификационное исследование, которое посвящено решению важной научной задачи – усовершенствованию методов получения иммуносорбентов на основе олигопептидов для нужд современной молекулярной биологии, белковой химии и медицины.

**Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которым присуждается искомая степень.** На основе анализа содержания диссертационной работы, автореферата, оценки опубликованных результатов и оформления диссертации и автореферата считаю, что работа **Пустюльги Егора Сергеевича «Моделирование олигопептидных лигандов, синтез и создание на их основе новых биоспецифических сорбентов для связывания иммуноглобулинов класса G»**, соответствует заявленной специальности – 02.00.10 биоорганическая химия, отрасли – химические науки и требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Экспериментальные и теоретические материалы диссертации соответствуют приоритетным направлениям: 3.5. органический синтез новых веществ; 4.1. биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты, направленный синтез биомолекул и субстанций медицинского назначения; 4.6. медицинская техника, изделия медицинского назначения, включая молекулярно-генетические разработки.

Название диссертации соответствует ее содержанию, хотя и не совсем удачно.

Таким образом, по предмету и объему исследования, кругу решаемых задач и самым современным методам, используемым для достижения поставленной задачи, рецензируемая диссертационная работа и автореферат, несомненно, соответствуют отрасли – химические науки и специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, в частности, пункту 5. Создание высокоэффективных биотехнологических процессов; пункту 6. Компьютерное моделирование структуры биологических молекул и их комплексов с лигандами и гомологичное моделирование белков, молекулярный докинг, молекулярная динамика, квантово-химические расчеты. Компьютерное конструирование и тестирование потенциальных лекарственных препаратов.



**Актуальность темы диссертации.** Несмотря на значительный прогресс в области исследования белок-лигандных взаимодействий и наличие значительного количества имеющихся иммуносорбентов, поиск новых сорбентов, способных связывать большие количества IgG, имеющих высокую селективность и простоту производства, является **актуальной** задачей научных исследований, для решения которой может быть использован целый ряд методов, включая молекулярное моделирование лиганд-рецепторных взаимодействий, модификация химических структур и дальнейший виртуальный скрининг лиганд-рецепторных комплексов. В связи с этим, диссертационная работа **Пустюльги Егора Сергеевича «Моделирование олигопептидных лигандов, синтез и создание на их основе новых биоспецифических сорбентов для связывания иммуноглобулинов класса G»,** посвященная разработке новых подходов к идентификации, синтезу и применению олигопептидных лигандов, безусловно, является **актуальной**, современной, востребованной и перспективной. Наибольший интерес представляют полученные автором матрицы, способные селективно удалять из биологических жидкостей иммуноглобулины класса G, которые найдут свое применение в медицинской практике.

**Актуальность** настоящей диссертационной работы также подтверждена ее связью с плановыми исследованиями лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси, выполненными в рамках ГПНИ «Химические технологии и материалы» на 2016-2020 гг., подпрограммы «Биологически активные вещества», задание 2.12 «Разработка гемосорбентов для избирательного удаления иммуноглобулинов класса G» (№ г.р. 20162000); гранта на выполнение научно-исследовательских работ аспирантами, кандидатами и докторами наук НАН Беларуси «Изучение свойств экспериментальных образцов сорбентов для удаления IgG на основе ароматических аминокислот в качестве лигандов» на 2018 год. (№ г.р. 20180834); грантов на выполнение научно-исследовательских работ аспирантами, кандидатами и докторами наук Национальной академии наук Беларуси «Изучение свойств экспериментальных образцов сорбентов для удаления IgG на основе ароматических аминокислот в качестве лигандов» № 2018-27-039 от 02.04.2018, № г.р. 20180834 и № 2019-27-119 от 15.04.2019 и № г.р. 20191531.

Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 гг. (Указ Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 № 166): «Медицина, фармацевтика, медицинская техника: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний, фармацевтические технологии, медицинские биотехнологии, лекарственные средства, диагностические препараты и тест-системы»; приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг. (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190): «Химический синтез и продукты» и «Медицина и фармацевтика».

**Цель исследования** – разработать на основе синтезированных олигопептидов новые биоспецифические сорбенты для связывания иммуноглобулинов класса G и их подклассов из биологических жидкостей, а задачи исследования – осуществить поиск пептидных лигандов и смоделировать их взаимодействие с Fc-фрагментами иммуноглобулинов класса G, синтезировать олигопептиды и создать на их основе экспериментальные образцы сорбентов для связывания IgG и подклассов и определить параметры связывания общего иммуноглобулина G экспериментальными образцами сорбентов, а также их удельную насыщенность и оценить селективность экспериментальных образцов сорбентов к подклассам иммуноглобулинов класса G, общему белку плазмы крови, альбумину, а также другим классам иммуноглобулинов.

**Степень новизны результатов диссертации и научных положений, выносимых на защиту.** **Новизна** рецензируемой работы состоит в том, что автором впервые идентифицированы олигопептидные лиганды, способные селективно взаимодействовать с иммуноглобулинами

класса IgG и представителями его подклассов, разработаны и оптимизированы методы синтеза и установлены закономерности функциональных свойств лигандов, состоящих из трех аминокислотных остатков формулы Phe-Хаа-Tyr, где Хаа – Ala, Asn, Asp, Gln, Gly, к связыванию с иммуноглобулинами класса G. Автором осуществлен синтез новых трипептидов Phe-Trp-DTyr, Trp-Phe-DTyr и Phe-Хаа-Tyr-OMe, где Хаа – Ala, Asn, Asp(OBzl), Gln, Gly. Методом стендовых испытаний на плазме крови с варьирующим уровнем антител, получена сравнительная характеристика параметров селективности новых экспериментальных сорбентов с различными классами и подклассами иммуноглобулинов. Установлено, что экспериментальные сорбенты обладают высокой селективностью к IgG и его подклассам и почти не взаимодействуют с другими классами иммуноглобулинов – IgE, IgM, а также с альбумином.

**Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Обоснованность и достоверность результатов исследования и выводов не вызывает сомнений, так как в работе использованы самые современные подходы и методы. Научные положения и выводы, представленные в работе, основываются на конкретном экспериментальном материале, полученном с применением современных физико-химических методов исследования органических и биоорганических соединений, и являются достоверными. Обсуждение полученных результатов выполнено корректно, выводы аргументированы и обоснованы.

**Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию.** Научная значимость диссертационной работы Пустюльги Егора Сергеевича «Моделирование олигопептидных лигандов, синтез и создание на их основе новых биоспецифических сорбентов для связывания иммуноглобулинов класса G» состоит в том, что в ней получены следующие новые научные результаты:

- методом молекулярного докинга идентифицированы новые потенциальные лиганды на основе ди- и трипептидов, содержащие аминокислоты ароматической группы и обладающие высоким сродством к Fc-фрагментам подклассов иммуноглобулинов класса G;
- впервые новые ди- и трипептидные соединения на основе аминокислот ароматической группы, получены классическими методами пептидного синтеза и использованы в качестве биоспецифических сорбентов;
- впервые созданные на основе синтезированных лигандов и матриц в виде активированных полиэтиленовых гранул экспериментальные образцы сорбентов для избирательного связывания общего иммуноглобулина класса G и его подклассов;
- новые сорбенты охарактеризованы по их сродству к иммуноглобулинам класса G, их подклассам, а также селективности относительно других классов иммуноглобулинов и белков, содержащихся в плазме крови человека.

**Практическая** значимость работы заключается в разработке коммерчески доступных иммуносорбентов на основе лигандов Phe-Trp-DTyr, Phe-Gln-Tyr-OMe, Phe-Ala-Tyr-OMe, Phe-Asn-Tyr-OMe, Trp-Phe-DTyr, Phe-Gln-Tyr-OMe, Phe-Asp(OBzl)-Tyr-OMe для избирательного удаления общего IgG и его подклассов из биологических жидкостей, а также эффективный метод их получения. Разработанные эффективные методы поиска олигопептидных лигандов, заключающиеся в комплексном применении молекулярного моделирования и химического синтеза, могут использоваться для дальнейших исследований и подбора соединений, обладающих высокой активностью к белкам-мишеням. Полученные результаты могут быть использованы для учебных и методических программ высшей школы. Опытные образцы сорбентов на основе олигопептидов для удаления IgG из биологических жидкостей, полученные в результате исследований, использовались в деятельности научно-

исследовательской лаборатории производственной трансфузиологии ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» и показали свою эффективность. Результаты работы защищены патентом Республики Беларусь.

**Экономическая и социальная значимость результатов диссертации** состоит в создании научной платформы для внедрения самых современных методов иммуносорбции в практику, что имеет значительное значение для обеспечения демографической безопасности в Республике.

Результаты исследования **могут быть использованы** в молекулярной биологии и биоорганической химии при исследовании структуры и функции сложных белков и их взаимодействия с партнерами.

**Опубликованность результатов диссертации в научной печати.** По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 4 статьи в научных журналах, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (2,0 авторских листа), 5 статей в сборниках конференций и тезисы 5 докладов в материалах конференций. Результаты работы защищены 1 патентом Республики Беларусь. Общий объем опубликованных материалов – 3,3 авторских листа.

**Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК.** Диссертация и автореферат оформлены в соответствии с Инструкцией о порядке оформления диссертации и автореферата диссертации, утвержденной ВАК Республики Беларусь, и отвечают всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук.

**Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует.** Основываясь на анализе диссертационной работы и автореферата, количестве и качестве опубликованных работ, набору методов, используемых для достижения поставленной задачи, научная квалификация диссертанта, безусловно, соответствует квалификации кандидата химических наук по специальности 02.0010 – биоорганическая химия, отрасли – химические науки и требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Рецензируемая диссертация, безусловно, является квалификационной работой высокого уровня, который на данном этапе развития науки предполагает, что для получения конкретного весомого результата следует основываться на достижениях в области смежных специальностей и наук органической химии и биоорганической химии для решения практических задач.

**Научный вклад** соискателя в решение научной задачи и значимость диссертационной работы заключается в разработке эффективных методов дизайна и синтеза олигопептидных лигандов и создании на их основе эффективных иммуносорбентов, что имеет значительный фундаментальный интерес и несомненную практическую значимость.

**Оценка содержания диссертации.** Диссертация изложена на 127 страницах и состоит из перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, библиографического списка (включающего 114 процитированные работы и 15 публикаций соискателя) и 3 приложений. Работа содержит 17 таблиц, 4 схемы и 27 рисунков.

Глава 1 посвящена анализу литературных данных, где проведен анализ современной литературы, посвященной проблеме связывания иммуноглобулинов класса G, существующие на данный момент, а также существующие экспериментальные и выведенные на рынок иммуносорбенты, способные связывать как класс иммуноглобулинов G, так и его подклассы. К

настоящему времени создано большое количество сорбентов для связывания подклассов иммуноглобулинов. К настоящему времени создано большое количество сорбентов для связывания подклассов иммуноглобулинов G, однако большинство из них имеет свои недостатки, связанные либо с низкими результатами сорбции, либо с особенностями производства. Литературный обзор может послужить основой для написания обзора о методах синтеза и применения иммуносорбентов для нужд современной молекулярной биологии и практической медицины.

Глава 2 посвящена изложению основных методов, используемых в работе. Теоретический поиск лигандов и моделирование взаимодействий с молекулами белков проводились с помощью программ докинга. Синтез пептидов проведен классическими методами пептидной химии. Прививку акриловой кислоты на полиэтиленовые гранулы проводили прямым радиационным методом. Для иммобилизации полученных олигопептидов в гранулы последние предварительно модифицировали N-гидроксисукцинимидом с помощью N,N'-диизопропилкарбодиимида. Определение концентрации общего иммуноглобулина G и его подклассов производили иммуноферментным анализом, определение концентрации общего белка проводили методом Лиама, определение концентрации альбумина наборами для определения альбумина. Определение сорбционных свойств экспериментальных образцов осуществляли стендовыми статистическими динамическими экспериментами.

Глава 3 посвящена описанию теоретического поиска и моделированию взаимодействия аминокислотных лигандов с молекулами Fc-фрагментов подклассов иммуноглобулинов G. В результате выявлены ди- и три-пептидные последовательности, показавшие высокую аффинность связывания и предположительную селективность в отношении молекул-мишеней. Поиск олигопептидных соединений, в качестве лигандов обладающих сродством к IgG и подклассам, диссертантом проведен путем скрининга поверхности взаимодействия белковой молекулы FcγRI-рецептора. Для реализации скрининга взята за основу модель FcγRI-Fc(IgG) (код:4W4O в Банке данных белков). Скрининг поверхности взаимодействия и дальнейший сравнительный анализ состава последовательностей аминокислотных остатков показали, что пептидные последовательности Lys128-Tyr129-Phe130-His131-His132, Ser161-Ser162-Glu163-Thr164, Gly156-Ser157-Lys158-Asn159, Trp110-Lys111-Asn112-Thr113, Tyr129-Phe-130-His131-His132, Asn112-Thr113-Ala114, Gly124-Lys125-Asp126, Asn123-Gly124-Lys125, Ile85-Gly86-Trp87 можно использовать для дальнейших исследований в качестве лигандов.

В главе 4 диссертант приводит результаты синтеза пептидных лигандов классическими методами пептидной химии, а также создания экспериментальных образцов сорбентов с использованием полиэтиленовых матриц. Для получения используемых пептидов разработаны две основные схемы их синтеза с использованием незащищенной карбоксильной группы C-концевой аминокислоты или карбоксила, защищенного этерификацией, с образованием метилового эфира.

В главе 5 диссертант приводит собственные результаты оценки свойств созданных экспериментальных образцов сорбентов, таких как сорбционная емкость, насыщаемость, специфичность сорбента к IgG относительно общего белка и альбумина в плазме крови, специфичность к IgG относительно других классов IgG, специфичность к подклассам IgG. В результате статических экспериментов получены данные концентрации общего IgG в контрольных пробах плазмы, а также пробах плазмы, подвергшихся воздействию образцов сорбентов на основе аминокислотных лигандов. Результаты свидетельствуют о том, что высокую сорбционную активность проявляют образцы сорбентов на основе аминокислот ароматического ряда (Tyr, Trp, Phe). Количество сорбированного ароматическими аминокислотами общего IgG составляет  $8,13 \pm 0,04$ ,  $7,56 \pm 0,85$  и  $6,44 \pm 0,28$  мг, соответственно.

### Замечания.

По рецензируемой работе можно сделать следующие замечания:

1. В тексте диссертации и автореферате встречаются опечатки, ошибки и неудачные выражения.
2. На взгляд оппонента, название работы хотя и соответствует содержанию, но является не совсем удачным.
3. Известно, что для реализации белок-лигандного взаимодействия необходимо участие, как минимум, 8-10 аминокислотных остатков, и диссертант указывает на то, что со стороны рецептора вовлекаются несколько фрагментов структуры, а для селективного взаимодействия используются ди- и три-пептиды. Диссертант не рассматривает вклад электростатических взаимодействий в реализацию комплексообразования.
4. Хотелось бы узнать, что это за метод Лиамы определения белка?

**Формулировка конкретных научных результатов** (с указанием их новизны и практической значимости), **за которые соискателю может быть присуждена ученая степень.** На основании вышеизложенного считаю, что ученая степень кандидата химических наук по специальности 02.0010 – биорганическая химия, отрасли – химические науки может быть присуждена соискателю **Пустульге Егору Сергеевичу** за новые научно-теоретические и экспериментальные результаты в области моделирования пространственной структуры, синтеза олигопептидных лигандов и применения иммуносорбентов для выделения иммуноглобулинов класса G и его подклассов, **включающие:**

- идентификацию новых потенциальных лигандов для биоспецифических сорбентов на основе ди- и три-пептидов, содержащих ароматические аминокислоты и обладающих высоким сродством к Fc-фрагментам подклассов иммуноглобулинов класса G, методом молекулярного докинга;
- синтез новых ди- и трипептидных соединений на основе аминокислот ароматической группы, полученных классическими методами пептидного синтеза и используемых в качестве лигандов сорбентов;
- впервые созданные на основе синтезированных лигандов и матриц в виде активированных полиэтиленовых гранул экспериментальные образцы сорбентов для избирательного связывания общего иммуноглобулина класса G и его подклассов;
- характеристику новых сорбентов по их активности к иммуноглобулинам класса G, их подклассам, а также селективности относительно других классов иммуноглобулинов и белков, содержащихся в плазме крови человека,

**что в совокупности** вносит существенный вклад в развитие методов создания высоко-селективных иммуносорбентов для нужд биорганической химии и медицинской практики.

Главный научный сотрудник лаборатории белковой инженерии,  
ИБОХ НАН Беларуси, член-корреспондент НАН Беларуси,  
доктор химических наук, профессор

С.А. Усанов

Текст отзыва и подпись официального оппонента заверяю  
Ученый секретарь ИБОХ НАН Беларуси, к.х.н.

Н.П. Башко

