

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт
молекулярной генетики
Российской академии наук
член-корр. РАН
С. В. Костров

« 09 » 09 2014 года

ОТЗЫВ

Ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук на диссертационную работу «Синтез и изучение фрагментов РНК-полимеразы вируса гриппа А» Матусевича Олега Владимировича, представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Грипп и ОРВИ являются заболеваниями, наносящие вред здоровью людей и приводящие к громадным экономическим потерям. В России на грипп и ОРВИ ежегодно приходится до 90% от всей регистрируемой инфекционной заболеваемости, ежегодно экономические потери от них составляют ~85% от всего ущерба, наносимого инфекционными заболеваниями. По данным ВОЗ ежегодная смертность от гриппа в мире составляет 250-500 тыс. человек. Несмотря на большие достижения в создании средств, имеющиеся лекарственные препараты и вакцины имеют серьезные недостатки и ряд ограничений. В связи с этим актуальность работы посвященная изучению фундаментальных молекулярных основ взаимодействия вируса гриппа с клеткой, целью которой является выявление уязвимого участка вирусной репродукции и создание противовирусного средства блокирующего этот этап и в конечном этапе вирусную репликацию не вызывает сомнений. Геном вируса гриппа А кодирует 16 белков, которые обеспечивают репликацию вируса в клетке хозяина. Это дает большое число потенциальных мишеней для химиотерапии. Однако в клинической практике используется лишь несколько препаратов воздействующих на белковые мишени, а именно на белок M₂ и нейроминидазу.

Перспективной мишенью для создания лекарственных препаратов для лечения гриппа, как справедливо отмечает диссертант на основе тщательного анализа литературных данных, являются вирусные консервативные белки или их фрагменты и в первую очередь РНК-полимераза вируса. РНК-полимераза вируса гриппа состоит из

трех белков (субъединиц) PA-PB₁- PB₂ образующих гетеротримерный комплекс за счет белок-белкового взаимодействия. В основу диссертационной работы О.В. Матусевича положена научная идея, заключающаяся в направленном подавлении самосборки вирусной РНК полимеразы за счет конкуренции с короткими пептидами гомологичными участкам белок-белкового взаимодействия гетеротримерного комплекса полимеразы вируса гриппа. Белки PA и PB₁ образуют стабильный комплекс для образования которого достаточно сегменты из первых 48 N- концевых аминокислотных остатков, а по некоторым данным даже 25 N-концевых аминокислотных остатков. При этом в белок – белковом взаимодействии PB₁ и PA участвует относительно небольшое число аминокислотных остатков, что делает возможным дизайн малых молекул ингибиторов этого взаимодействия. Аминокислотные остатки N- концевой части белка PB₁ взаимодействующие с белком PA консервативные во всей группе вирусов гриппа А, В, С. Поэтому предполагается, что ингибиторы, разработанные на основе аминокислотной последовательности N-концевой части белка PB₁ будут эффективны в отношении большинства штаммов вируса гриппа. Не менее важным для репликации вируса является образование комплекса между РНК связывающей субъединицы PB₂. Этот короткий N-концевой участок открывает также возможность ингибирования короткими пептидными аналогами. Важным результатом диссертационной работы является выявление в N-концевой части белка PB₁ фрагмента 6-25 содержащего зеркально-симметричный мотив, которые как известно встречаются в функционально значимых участках. Компьютерное моделирование методами молекулярной динамики позволило выделить фрагменты 6-13, 6-25 белка PB₁ ответственные за образование шпильки, стабилизирующий этот белок. Выбор пептидов, не принадлежащих к N-концевому фрагменту белка PB₁ был во многом произвольным и определялся во многом такими факторами, как гидрофобность, растворимость, наличие кластеров повторов аминокислот. Вышеописанные подходы, основанные на литературных, данных функционального биоинформационного анализа приемов фармакологической оптимизации пептидов, позволили определить аминокислотную последовательность 34 пептидов, потенциальных ингибиторов РНК полимеразы вирусов гриппа А.

Синтез пептидов проводили твердофазным методом на 2- хлортритилхлоридной и Ринк-амидной смолах по Fmoc-/t-Bu стратегии с использованием, как стандартных методик последовательного наращивания цепи, так и конвергентного подхода. Очистку

полученных пептидов проводили методом препаративной обращеннофазной ВЭЖХ, их структура подтверждена масс-спектрометрически (ESI).

Для фрагментов 6-13, 6-14, 26-30, 395-400 и 531-540 были получены амиды, а также N-ацетилированные производные пептидов и их амидов.

Синтез каждого пептида при всей кажущейся одинаковости синтеза это своя технология со своими проблемами и особенностями, что подробно и профессионально отражено в диссертации.

Все синтезированные пептиды были испытаны на противовирусную активность в НИИ гриппа на культурах клеток МДСК в отношении вируса гриппа H1N1 pdm09. Оценку противовирусной активности проводили по стандартной схеме, определяя индекс селективности (SI) по отношению 50% цитотоксической (CTD₅₀) к эффективной дозе (ED₅₀). Активными считали препараты с SI > 10. В качестве препаратов сравнения использовали ремантадин и осельтамивир. Прделанная работа показала, что все синтезированные пептиды нетоксичны для клеток. Отобрано 5 пептидов с высоким индексом селективности. Для увеличения стабильности и биодоступности для наиболее активных соединений синтезированы ацетилированные по N-концевой аминогруппе и амидированные по C-концевой карбоксильной группе. Этот подход позволяет защитить пептиды от действия экзопептидаз, что пролонгирует их действие в клетке. Действительно данная модификация позволила значительно повысить SI этих пептидов и отобрать модифицированную последовательность 6-14 N-концевой части белка PB₁ в качестве кандидатного для лекарственного препарата пептида.

В диссертации показано, что индекс селективности SI для последовательности 6-13 и 6-14 белка PB₁ отличаются почти в три раза, что как справедливо замечено, возможно, связано с проницаемостью пептидов в клетку. В работе проведено изучение способности модифицированного пептида 6-14 белка PB₁ к проникновению в клетку. Для этого в амидную группу пептида введена флуоресцентная метка. Это не отразилось на противовирусной активности. Изучение окрашенных клеток с помощью флуоресцентной метки подтвердило проникновение пептида в клетку. Далеко не все пептиды обладают этими свойствами. Это довольно важный результат, который определил успех всей работы. К сожалению, аналогичная работа не сделана с пептидом 6-13 белка PB₁. Представляет большой интерес сравнение этих пептидов отличающихся лишь одной аминокислотой способностью проникновения в клетку, так как их индекс селективности отличается ~ в три раза.

В целом работа О.В. Матусевича является новой как в фундаментальном, так и в прикладном плане. По существу определены новые мишени действия при создании новых противовирусных препаратов, показан эндоцитоз наиболее активного пептида, определена структура кандидатного пептида для профилактики и лечения гриппа. Синтез нескольких десятков пептидов, сильно отличающихся по аминокислотной последовательности является существенным вкладом в пептидную химию.

Результаты работы могут быть использованы при планировании и проведении научно-исследовательских работ в организациях занимающихся разработкой новых лекарственных препаратов, таких как Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» Российской академии медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.


Диссертация написана логично и достаточно лаконично, экспериментальные данные соответствуют заявленной теме работы, выводы отражают основные полученные автором результаты. Достоверность результатов и личное участие автора в получении экспериментальных данных подтверждается списком опубликованных по теме диссертации работ во многих, из которых диссертант является первым автором и списком научных конференций, в которых автор принимал участие и представлял основные научные результаты. Автореферат работы полностью отражает представленные в диссертации результаты.

Работа Матусевича О.В. на тему «Синтез и изучение фрагментов РНК-полимеразы вируса гриппа А» представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук, является законченной научной работой вносящей большой фундаментальный вклад в биологию и химию пептидов и полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Ее автор – Матусевич Олег

Владимирович, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре Отдела химии физиологически активных веществ ИМГ РАН « 01 » сентября 2014 года.

Заведующий Отделом химии
физиологически активных веществ
Института молекулярной генетики РАН
академик РАН, профессор,
доктор химических наук



Н.Ф. Мясоедов